

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-308757**(P2005-308757A)**

(43) 公開日 平成17年11月4日(2005.11.4)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 D	4 B O 2 4
CO 7 K 16/24	CO 7 K 16/24	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/02	C 1 2 P 21/08	4 H O 4 5
C 1 2 P 21/08	GO 1 N 33/543 5 4 5 Z	
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/577 B	
審査請求 有 請求項の数 9 O L (全 16 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2005-154801 (P2005-154801)	(71) 出願人	000001029
(22) 出願日	平成17年5月27日 (2005. 5. 27)		協和醗酵工業株式会社
(62) 分割の表示	特願平6-311763の分割		東京都千代田区大手町1丁目6番1号
原出願日	平成6年12月15日 (1994. 12. 15)	(72) 発明者	花井 陳雄
			神奈川県相模原市大野台7-9-15
		(72) 発明者	古谷 安希子
			東京都町田市木曽町1464-49
		(72) 発明者	山▲崎▼ 基生
			東京都町田市中町3-9-13
		(72) 発明者	小林 智
			静岡県駿東郡長泉町上土狩614-11
		(72) 発明者	▲桑▼原 隆
			静岡県駿東郡長泉町下土狩1064-8-201
		Fターム(参考)	4B024 AA01 AA11 BA44 GA03 HA11
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子の定量法

(57) 【要約】

【課題】 PEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体のみを高感度に定量する。

【解決手段】 ヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体およびPEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体に反応する抗体とヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体に特異的に反応し、PEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体に反応しないモノクローナル抗体とを用いた免疫学的測定法によるPEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体の定量法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト顆粒球コロニー刺激因子、その誘導体ND28またはND28の部分ペプチドで非ヒト動物を免疫して得られるヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28およびPEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28に反応するポリクローナル抗体と、ヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28に特異的に反応し、PEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28に反応しないモノクローナル抗体とを用いた免疫学的測定法によるPEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28の定量法。

【請求項 2】

以下の工程からなる免疫学的測定法によるPEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28の定量法。

[1] ヒト顆粒球コロニー刺激因子、その誘導体ND28またはND28の部分ペプチドで非ヒト動物を免疫して得られるヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28およびPEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28に反応するポリクローナル抗体を用いて、試料中のヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28およびPEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28を定量する工程、

[2] ヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28に反応し、PEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28に反応しないモノクローナル抗体を用いて、[1]の試料中のヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28を定量する工程、

[3] [1]の工程で求められる値から、[2]の工程で求められる値を差し引くことにより、試料中に含有されるPEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28を定量する工程。

【請求項 3】

免疫学的測定法が固相サンドイッチ法による酵素免疫測定法である請求項1または2記載の定量法。

【請求項 4】

定量するPEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28が血中のものである請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

ヒト顆粒球コロニー刺激因子、その誘導体ND28またはND28の部分ペプチドで非ヒト動物を免疫し、免疫した非ヒト動物から得られた抗血清または抗血清から精製したポリクローナル抗体のPEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28に対する反応性を調べ、PEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28に反応する抗血清またはポリクローナル抗体を選択することを特徴とする、ヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28およびPEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28に反応するポリクローナル抗体の製造方法。

【請求項 6】

ヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28およびPEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28に反応するモノクローナル抗体。

【請求項 7】

PEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28が、1分子のヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ND28に対し分子量約10000のPEGが3分子結合しているものである請求項6記載のモノクローナル抗体。

【請求項 8】

ハイブリドーマKM509(FERM BP-4774)が生産し、ヒト顆粒球コロニー刺激因子、ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体ND28、PEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子、PEG化したヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体ND28に反応する請求項

10

20

30

40

50

6 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 9】

ヒト顆粒球コロニー刺激因子、その誘導体 ND 28 または ND 28 の部分ペプチドで非ヒト動物を免疫し、免疫した非ヒト動物から得られる脾細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合し、得られたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマからモノクローナル抗体を調製し、調製したモノクローナル抗体の PEG 化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体 ND 28 に対する反応性を調べ、PEG 化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体 ND 28 に反応するモノクローナル抗体を選択することを特徴とするヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体 ND 28 および PEG 化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体 ND 28 に反応するモノクローナル抗体の製造方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はポリエチレングリコール化したヒト顆粒球コロニー刺激因子（以下、PEG 化した G - C S F と略記する）またはその誘導体の定量法ならびにそれに用いるモノクローナル抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

PEG 化した G - C S F および PEG 化したヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体 ND 28（特許文献 1、2 および 3；以下、PEG 化した ND 28 と略記する）は、ヒト顆粒球コロニー刺激因子（特許文献 4；以下、G - C S F と略記する）またはヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体 ND 28（特許文献 5；以下、ND 28 と略記する）に較べて血中半減期が長いなどの利点があり、治療効果が高いことが期待されている。PEG 化した G - C S F および PEG 化した ND 28 の臨床応用の際には、その血中での動態を知るためなどに抗体を利用した特異的な定量系が必要である。しかしながら、PEG 化された分子は宿主の免疫機構に認識されにくく、抗体を作製することが困難である（非特許文献 1）。G - C S F および ND 28 の場合もこれらに対するモノクローナル抗体は得られている（抗 G - C S F モノクローナル抗体；特許文献 6、非特許文献 2 および非特許文献 3、抗 ND 28 モノクローナル抗体；特許文献 7 および非特許文献 4）が、PEG 化した G - C S F、PEG 化した ND 28 に反応する抗体は得られていない。

20

30

【0003】

【特許文献 1】特開平 1 - 3 1 6 4 0 0 号公報

【特許文献 2】国際公開第 9 0 / 0 6 9 5 2 号パンフレット

【特許文献 3】特開平 5 - 3 2 5 5 9 号公報

【特許文献 4】米国特許第 4 8 8 3 1 2 7 号明細書

【特許文献 5】特開昭 6 3 - 2 6 7 2 9 2 号公報

【特許文献 6】特開昭 6 3 - 1 8 0 8 6 0 号公報

【特許文献 7】特開平 1 - 2 2 5 4 9 5 号公報

【非特許文献 1】「リンフォカイン・アンド・サイトカイン・リサーチ (Lymphokine and Cytokine Research)」, (米国), 1991 年, 第 10 巻, 第 6 号, p. 475 - 480

40

【非特許文献 2】「ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (Journal of Immunological Methods)」, (オランダ), 1990 年, 第 128 巻, 第 2 号, p. 211 - 217

【非特許文献 3】「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」, (米国), 1991 年, 第 266 巻, 第 35 号, p. 23815 - 23823

【非特許文献 4】「アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry)」, 1989 年, 第 53 巻, p. 1095 - 1101

50

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の目的は、G - C S Fまたはその誘導体およびP E G化したG - C S Fまたはその誘導体に反応するモノクローナル抗体を作製し、それを用いてP E G化したG - C S Fまたはその誘導体を定量する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、G - C S Fまたはその誘導体およびP E G化したG - C S Fまたはその誘導体に反応する抗体とG - C S Fまたはその誘導体に特異的に反応し、P E G化したG - C S Fまたはその誘導体に反応しないモノクローナル抗体とを用いた免疫学的測定法によるP E G化したG - C S Fまたはその誘導体の定量法に関する。 10

本発明に用いられるG - C S Fの誘導体としては、例えば、特開昭63-267292に記載のG - C S F誘導体があげられる。その一例として記載されているN D 2 8は、G - C S Fのアミノ酸配列のうち、第1番目、第3番目、第4番目、第5番目、第17番目のアミノ酸残基がそれぞれアラニン(Ala)、スレオニン(Thr)、チロシン(Tyr)、アルギニン(Arg)、セリン(Ser)に置換されたポリペプチドである。

【0006】

本発明に用いられるP E Gの分子量はとくに限定されないが、通常300 ~ 30000であり、とくに1000 ~ 20000が好ましい。P E G化の方法は、公知の方法〔特開平1 - 31640、Biotech. Lett., 14, 559-564 (1992)、Bio/technology, 8, 343-346 (1990)等〕が用いられる。 20

P E G分子は、G - C S FまたはG - C S F誘導体分子のアミノ基、カルボキシル基、メルカプト基またはグアニジノ基と結合する。P E G化したG - C S FまたはP E G化したG - C S F誘導体は、通常P E Gが1分子 ~ 5分子結合している。本発明に用いられるP E G化したG - C S FまたはP E G化したG - C S F誘導体は、結合しているP E Gの結合数が同一のものを分離して用いるか、または、P E Gの結合数が異なるものの混合物をそのまま用いる。

【0007】

本発明に用いられるG - C S Fまたはその誘導体およびP E G化したG - C S Fまたはその誘導体に反応する抗体(以下、抗体Aと記す)は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。抗体Aの具体例としては、後記のごとくして製造されるウサギ抗N D 2 8抗体およびハイブリドーマ細胞株K M 5 0 9が産生するモノクローナル抗体K M 5 0 9をあげることができる。ハイブリドーマ細胞株K M 5 0 9は平成6年8月9日付でブダペスト条約に基づき工業技術院生命工学工業技術研究所にF E R M B P - 4 7 7 4として寄託されている。 30

【0008】

本発明に用いるG - C S Fの誘導体に特異的に反応し、P E G化したG - C S Fまたはその誘導体に反応しないモノクローナル抗体(以下、抗体Cと記す)としては、例えば、N D 2 8に特異的に反応し、P E G化したG - C S FまたはN D 2 8に反応しないモノクローナル抗体であるハイブリドーマ細胞株K M 5 1 1が生産するモノクローナル抗体K M 5 1 1があげられる。また、G - C S Fに特異的に反応し、P E G化したG - C S Fまたはその誘導体に反応しないモノクローナル抗体(以下、抗体Bと記す)としては、G - C S Fと特異的に反応し、P E G化したG - C S FまたはN D 2 8に反応しないモノクローナル抗体であるハイブリドーマ細胞株K M 3 4 3が生産するモノクローナル抗体K M 3 4 3があげられる。ハイブリドーマ細胞株K M 5 1 1、K M 3 4 3は平成6年11月10日付でブダペスト条約に基づき工業技術院生命工学工業技術研究所にそれぞれF E R M B P - 4 8 8 0、F E R M B P - 4 8 7 9として寄託されている。 40

【0009】

本発明の免疫学的測定法としては、固相サンドイッチ法などを用いたラジオイムノアッ 50

セイ、酵素免疫測定法 (ELISA) などがあげられる。

【発明の効果】

【0010】

本発明の定量法により、PEG化したG-CSFまたはその誘導体のみを高感度に定量することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明のPEG化したG-CSFまたはその誘導体の定量法は、G-CSFまたはその誘導体およびPEG化したG-CSFまたはその誘導体に反応する抗体 (抗体A) を用いた免疫学的測定法によるPEG化したG-CSFまたはその誘導体の定量系 (定量系1)、G-CSFと特異的に反応し、PEG化したG-CSFまたはその誘導体およびG-CSF誘導体に反応しない抗体 (抗体B) を用いたG-CSFに特異的な定量系 (定量系2) およびG-CSF誘導体に特異的に反応し、PEG化したG-CSFまたはその誘導体に反応しない抗体 (抗体C) を用いたG-CSF誘導体に特異的な定量系 (定量系3) を確立し、定量系1によって求められる値から、定量系2によって求められる値または定量系3によって求められる値を差し引くことにより、PEG化したG-CSFまたはその誘導体のみの量を求めることができる。以下にG-CSF誘導体としてND28を用いた場合の各々の定量系の確立方法について説明する。

【0012】

1. 各定量系の確立

(1) 抗体Aを用いたG-CSFまたはND28およびPEG化したG-CSFまたはPEG化ND28の定量系の確立

第一抗体として抗体Aを1~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で10~100 μl /穴ずつ96穴プレートに分注し、4で一晩放置してプレートにコートする。BSA溶液 (1%のウシ胎児血清 (BSA) を含むPBS溶液 (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)) などブロッキングした後、段階希釈したPEG化したG-CSFまたはPEG化したND28を50~100 μl /穴ずつ分注し、室温で2時間または4で一晩反応させる。PBSまたはPBSに0.05% Tween-20を加えた溶液 (PBS-Tween) で洗浄した後、第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質または放射線化合物等で標識した抗体A 1~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を50~100 μl /穴ずつ分注し、室温で1~2時間反応させる。よく洗浄した後、第二抗体の標識物質に応じた反応を行なう。このようにしてG-CSFまたはND28およびPEG化したG-CSFおよびPEG化したND28の定量系を確立する。

【0013】

(2) 抗体Cを用いたND28の定量系の確立

第一抗体として抗体Cを用い、(1) で得られる抗体Aを第二抗体に用いる以外は(1)と同様にしてサンドイッチELISA法によるND28の定量系を確立する。

(3) 抗体Bを用いたG-CSFの定量系の確立

第一抗体として抗体Bを用い、(1) で得られる抗体Aを第二抗体に用いる以外は(1)と同様にしてサンドイッチELISA法によるG-CSFの定量系を確立する。

次に本発明の方法に用いる抗体A、BおよびCの製造法をG-CSF誘導体としてND28を用いた場合を例にして示す。

【0014】

2. 抗体A、BおよびCの製造

(1) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

3~20週令のマウスまたはラットに組換えDNA技術により大腸菌で生産させたG-CSF、大腸菌で生産させたND28またはND28の部分ペプチド、例えば、ND28の第168~174番目のアミノ酸配列を有し、N末にシステイン (Cys) を付加したペプチド (PEG-5)、ND28の第59~70番目のアミノ酸配列を有するが、第6

10

20

30

40

50

4番目のCysがセリン(Ser)に置換され、N末にCysを付加したペプチド(PEG-9)、ND28の第92~99番目のアミノ酸配列を有し、N末にCysを付加したペプチド(PEG-10)等を免疫する。ND28の部分ペプチドは免疫原性を高める目的で、キーホールリンペットヘモシアニン(以下KLHと略記する)や牛血清アルブミン(BSA)とコンジュゲートし、免疫に用いる。免疫の方法は、動物の皮下、静脈内また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)または、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなど〕とともに投与する。免疫原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに5~10回行う。各投与後3~7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が免疫原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法)：医学書院刊 1976年〕などで調べる。 10

免疫原に対し、その血清が十分な抗体価を示したマウスまたはラットから脾臓を摘出して脾細胞を調製し、抗体産生細胞の供給源として供する。

【0015】

(2) 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)〔カレント・トピックス・イン・ミクロバイオロジィ・アンド・イムノロジィ(Current Topics in Microbiology and Immunology) 81, 1-7 (1978)〕、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジィ(European J. Immunology) 6, 511-519 (1976)〕、S 20
P2/O-Ag14(SP-2)〔ネイチャー(Nature) 276, 269-270 (1978)〕、P3-X63-Ag8653(653)〔ジャーナル・オブ・イムノロジィ(J. Immunology) 123, 1548-1550 (1979)〕、P3-X63-Ag8(X63)〔ネイチャー(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(1.5mM)、2-メルカプトエタノール(5×10^{-5} M)、ジェンタマイシン($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)および牛胎児血清(FCS)(CSL社製、10%)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($15 \mu\text{g}/\text{ml}$)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 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

【0016】

(3) 細胞融合

(1)で免疫した抗体産生細胞と(2)で得られた骨髄腫細胞をMEM培地(日水製薬社製)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℃でポリエチレングリコール-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HAT培地〔正常培地にヒポキサンチン(10^{-4} M)、チミジン(1.5×10^{-5} M)およびアミノプテリン(4×10^{-7} M)を加えた培地)100ml中に懸濁する。 40

【0017】

この懸濁液を96穴培養用プレートに200 μl /穴ずつ分注し、5%CO₂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以下の(4)に記載の酵素免疫測定法などにより、免疫原に対し特異的に反応する穴を選択する。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モノクローナル抗体 50

産生ハイブリドーマ株として選択する。

【0018】

(4) モノクローナル抗体の選択

モノクローナル抗体の選択は以下に示す酵素免疫測定法によるバインディングアッセイにより行う。

G - C S F、N D 2 8 または N D 2 8 の部分ペプチドをキャリア蛋白質と結合させたもの 1 ~ 5 0 μ g / m l を 1 0 ~ 1 0 0 μ l / 穴ずつ 9 6 穴プレートに分注し、4 で一晩放置してプレートにコートする。コントロールとして大腸菌夾雑蛋白質 N Y 4 9 を同様にプレートにコートする。B S A 溶液などでブロッキングした後、ハイブリドーマ培養上清もしくは後記 (5) で得られる精製抗体を第一抗体として 5 0 ~ 1 0 0 μ l / 穴ずつ分注し、室温で 2 時間または 4 で一晩反応させる。P B S または P B S に 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 を加えた溶液 (P B S - T w e e n) で洗浄した後、第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質または放射線化合物等で標識した抗マウスイムノグロブリン抗体 1 ~ 5 0 μ g / m l を 5 0 ~ 1 0 0 μ l / 穴ずつ分注し、室温で 1 ~ 2 時間反応させる。よく洗浄した後、第二抗体の標識物質に応じた反応を行ない、免疫原に対し特異的に反応する穴を選択する。

10

【0019】

(5) モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理 [2 , 6 , 1 0 , 1 4 - テトラメチルペンタデカン (P r i s t a n e) 0 . 5 m l を腹腔内投与し、2 週間飼育する] した 8 ~ 1 0 週令のヌードマウスに (3) で得られたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^6$ 細胞 / 匹を腹腔内注射する。1 0 ~ 2 1 日間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 , 0 0 0 r p m、5 分間) して固形分を除去後、4 0 ~ 5 0 % 飽和硫酸アンモニウムで塩析し、カプリル酸沈殿法により精製モノクローナル抗体とするか、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通塔し、I g G あるいは I g M 画分を集め、精製モノクローナル抗体とする。

20

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体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 2 8 0 n m での吸光度より算出する。

【0020】

30

(6) 抗体 A の選択

(1) で得られる抗血清または (5) で得られるモノクローナル抗体の P E G 化した G - C S F および P E G 化した N D 2 8 に対する反応性を酵素免疫測定法により調べる。P E G 化した G - C S F および P E G 化した N D 2 8 は E L I S A プレートに吸着されないため、インヒビションアッセイにより調べる。G - C S F、N D 2 8 または N D 2 8 の部分ペプチドをキャリア蛋白質と結合させたもの 1 ~ 5 0 μ g / m l を 1 0 ~ 1 0 0 μ l / 穴ずつ 9 6 穴プレートに分注し、4 で一晩放置してプレートにコートする。B S A 溶液などでブロッキングした後、段階希釈した P E G 化した G - C S F または P E G 化した N D 2 8 を 5 0 ~ 1 0 0 μ l / 穴ずつ分注し、さらに (1) で得られる抗血清または (5) で得られる精製抗体を 5 0 ~ 1 0 0 μ l / 穴ずつ分注して混合し、室温で 2 時間または 4 で一晩反応させる。P B S または P B S に 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 を加えた溶液 (P B S - T w e e n) で洗浄した後、第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質または放射線化合物等で標識した抗マウスイムノグロブリン抗体もしくは抗ラットイムノグロブリン抗体 1 ~ 5 0 μ g / m l を 5 0 ~ 1 0 0 μ l / 穴ずつ分注し、室温で 1 ~ 2 時間反応させる。よく洗浄した後、第二抗体の標識物質に応じた反応を行なう。P E G 化した G - C S F および P E G 化した N D 2 8 によって結合活性が阻害された抗血清あるいはモノクローナル抗体を抗体 A として選択する。

40

【0021】

(7) 抗体 B の選択

(5) で得られたモノクローナル抗体の G - C S F、N D 2 8、P E G 化した G - C S

50

F および P E G 化した N D 2 8 に対する反応性を酵素免疫測定法により調べる。P E G 化した G - C S F および P E G 化した N D 2 8 に対する反応性は (6) と同様にして行う。G - C S F のみに反応し、P E G 化した G - C S F および P E G 化した N D 2 8 に反応しないモノクローナル抗体を抗体 B として選択する。

【 0 0 2 2 】

(8) 抗体 C の選択

(7) と同様にして N D 2 8 にのみ反応し、P E G 化した G - C S F および P E G 化した N D 2 8 に反応しないモノクローナル抗体を抗体 C として選択する。

(9) ウサギ抗 N D 2 8 抗体の製造

3 ~ 3 0 週令のウサギに 1 ~ 1 0 0 0 μ g / 匹の N D 2 8 またはキャリア蛋白質と結合させた N D 2 8 の部分ペプチドを適当なアジュバンドとともに免疫し、血中抗体価の上昇を確認した後、抗血清を採取する。4 0 ~ 5 0 % 飽和硫酸アンモニウムで塩析し、カプリル酸沈殿法により精製し、ウサギ抗 N D 2 8 抗体とするか、D E A E - セファロースカラムあるいはプロテイン A - カラムに通塔し I g G 画分を集め、ウサギ抗 N D 2 8 抗体とする。

10

【 実施例 1 】

【 0 0 2 3 】

(1) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

8 週令の Balb/c 雌マウスに組換え D N A 技術により大腸菌で生産させた G - C S F 、大腸菌で生産させた N D 2 8 または N D 2 8 の部分ペプチドを免疫した。N D 2 8 の部分ペプチドは、免疫原性を高める目的で、m-マレイミド-ベンゾイル-n-ハイドロキシサクチル (M B S 、ナカライテスク社製) を架橋剤として K L H (CALBIOCHEM 社) とコンジュゲートし、免疫原とした。M B S との反応のため、ペプチドには N 末に Cys を加えて合成した。以下に、免疫原の作製方法を示した。

20

【 0 0 2 4 】

K L H を P B S に溶解して 10mg/ml に調整し、1/10 容量の 25mg/ml M B S を滴下して室温で攪拌して 30 分間反応させた。あらかじめ P B S で平衡化したセファデックス G-25 カラムで遊離している M B S を除き、得られた K L H - M B S 2.5mg を 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (P H 7.0) に溶解したペプチド 1mg と混合し、室温で 3 時間攪拌して反応させた。反応後、塩化ナトリウム 0.5M を加えた P B S で透析したものを免疫原とした。

30

【 0 0 2 5 】

免疫原 100 μ g / 匹を初回のみアルミニウムゲル 2 m g および百日咳ワクチン (千葉県血清研究所製) 1×10^9 細胞とともに投与し、2 週間後より 100 μ g / 匹の免疫原を 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に示す酵素免疫測定法で調べた。

免疫原に対し十分な抗体価の上昇を示したマウスから、最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。脾臓を M E M 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 2 0 0 r p m 、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 (p H 7 . 6 5) で 1 ~ 2 分間処理し赤血球を除去し、M E M 培地で 3 回洗浄し、細胞融合に用いた。

40

酵素免疫測定法 (バインディングアッセイ)

96 穴の E I A 用プレート (グライナー社製) に、G - C S F 、N D 2 8 、N D 2 8 の部分ペプチド - サイログロブリン (T H Y) コンジュゲート、ネガティブ抗原として大腸菌夾雑蛋白質 N Y 4 9 または免疫原とは異なるペプチド - T H Y コンジュゲート 10 μ g / ml を 50 μ l / 穴分注し、4 で一晩放置して吸着させた。N D 2 8 の部分ペプチド - T H Y コンジュゲートはグルタルアルデヒド法を用いて作製した。すなわち、ペプチド 1mg を 0.1M 酢酸アンモニウム緩衝液 (P H 7.0) に溶解し、同じ緩衝液に溶解した T H Y 5mg を加えて全量を 1ml にした。攪拌下、0.02M グルタルアルデヒド 540 μ l を滴下し、室温で 5 時間攪拌して反応させた。反応後、P B S で一晩透析したものを N D 2 8 の部分ペプチド - T H Y コンジュゲートとした。

50

【0026】

プレートを洗浄後、1% BSAを含むPBS溶液(BSA-PBS)を100 μ l/穴分注し、室温で1時間または4で1晩放置して、プレート上に残った蛋白質との結合残基をブロック(ブロッキング)した。その後、BSA-PBSを捨て、PBSでよく洗浄した後、第一抗体として、BSA-PBSで希釈した試料(マウス血清、ハイブリドーマ培養上清、精製モノクローナル抗体)を50 μ l/穴分注し、室温で2時間または4で一晩放置した。PBS-Tweenでよく洗浄した後、第二抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体〔ダコ(DAKO)社製〕を50 μ l/穴分注し、室温で1時間放置した。PBS-Tweenでよく洗浄した後、ABTS基質液〔2, 2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ニアンモニウム550 mgを0.1 Mクエン酸緩衝液(pH 4.2) 1リットルに溶かした溶液に、使用直前に過酸化水素1 μ l/mlを加えた溶液〕を用いて発色させ、OD_{415nm}の吸光度を測定した。

10

【0027】

(2) マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞株P3-U1を正常培地で培養し、細胞融合時に 2×10^7 以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

(3) ハイブリドーマの作製

(1)で得られたマウス脾細胞と(2)で得られた骨髓腫細胞とを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でポリエチレングリコール-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/ 10^8 をマウス脾細胞に加え、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100 ml中に懸濁した。

20

【0028】

この懸濁液を96穴培養用プレートに200 μ l/穴ずつ分注し、5% CO₂ インキュベーター中、37で10~14日間CO₂ 5%下で培養した。この培養上清を(1)に記載した酵素免疫測定法で調べ、免疫原に特異的に反応する穴を選び、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、ハイブリドーマ株を得た。

30

【0029】

図1に示したようにG-CSFおよびND28と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ハイブリドーマKM341、KM342、KM509及びKM510が、G-CSFと反応し、ND28と反応しないモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとしてKM343が、ND28と反応し、G-CSFと反応しないモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとしてKM498およびKM511がそれぞれ選択された。

【0030】

(4) 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(3)で得られた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(1~8ml/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%硫酸アンモニウムを用いて塩析し、塩化ナトリウム0.5Mを添加したPBSで透析後、セルロファイン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。

40

【0031】

50

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決定した。(3)で得られたハイブリドーマのサブクラスを第1表に示す。

【0032】

【表1】

モノクローナル抗体	サブクラス
KM341	G1
KM342	G1
KM343	G1
KM498	G1
KM509	G2a
KM510	G1
KM511	G1

10

【0033】

(5) PEG化したG-CSFおよびPEG化したND28に対する反応性の検討

(4)で得られたハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体のPEG化したG-CSFおよびPEG化したND28に対する反応性を酵素免疫測定法を用いたインヒビションアッセイにより以下のようにして調べた。なお、以下の実験に用いるPEG化したG-CSFおよびPEG化したND28に結合しているPEGの分子量は約10000であり、G-CSFまたはND28の1分子に対して3分子結合している。

20

【0034】

それぞれの免疫原を10 µg/mlで50 µl/穴ずつ96穴プレートに分注し、4で一晩放置してプレートにコートし、BSA-PBSでブロッキングした。100 µg/mlから0.1 µg/mlまで段階希釈したPEG化したG-CSFまたはPEG化したND28を50 µl/穴ずつ分注し、さらに(4)で得られた精製抗体を50 µl/穴ずつ分注して混合し、室温で2時間反応させた。PBS-Tweenでよく洗浄した後、第二抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体〔ダコ(DAKO)社製〕を50 µl/穴分注し、室温で1時間放置した。PBS-Tweenでよく洗浄した後、(1)と同様にして発色させ、OD_{415nm}の吸光度を測定した。図2に示したように、(3)で選択されたハイブリドーマのうち、ハイブリドーマKM341、KM509およびKM510がそれぞれ生産するモノクローナル抗体KM341、KM509およびKM510はPEG化したG-CSFおよびPEG化したND28によって濃度依存的に結合活性が阻害され、PEG化したG-CSFおよびPEG化したND28に対して反応することが示された。

30

【0035】

(6) ウサギ抗ND28抗体の作製

組換えDNA技術により大腸菌で生産させたND28の100 µg/匹を20週令のウサギにフロインドの完全アジュバント(Complete Freund Adjuvant; ナカライテスク社)とともに1週間間隔で4回皮下投与し、その後1000 µg/匹のND28をフロインドの不完全アジュバント(Incomplete Freund Adjuvant; ナカライテスク社)とともに2週間間隔で6回投与した。酵素免疫測定法により血中抗体価の上昇を確認後抗血清を採取した。カプリル酸沈殿法および50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析によりIgG画分を集め、ウサギ抗ND28抗体とした。図3にウサギ抗ND28抗体のND28、G-CSFおよびPEG化したND28に対する反応性を示す。

40

【0036】

(7) PEG化したG-CSFおよびPEG化したND28に反応するモノクローナル抗体を用いたG-CSF、ND28、PEG化したG-CSFおよびPEG化したND28

50

8 の定量系（定量系 1）の確立

（5）で選択された PEG 化した G - C S F および PEG 化した ND 28 に反応するモノクローナル抗体と（6）で作製したウサギ抗 ND 28 抗体を用い、サンドイッチ ELISA 法による PEG 化した ND 28 定量系を検討した。第一抗体として PEG 化した G - C S F および PEG 化した ND 28 に反応するモノクローナル抗体またはウサギ抗 ND 28 抗体 10 μ g / ml を 50 μ l / 穴ずつ 96 穴プレートに分注し、4 で一晩放置してプレートにコートした。B S A 溶液でブロッキングした後、160ng/ml から 2 倍希釈で 0.15625ng/ml まで段階希釈した PEG 化 ND 28 を 50 μ l / 穴ずつ分注し、4 で一晩反応させた。洗浄後、第二抗体としてビオチンで標識した PEG 化した G - C S F および PEG 化した ND 28 に反応するモノクローナル抗体またはウサギ抗 ND 28 抗体 10 μ g / ml を 50 μ l / 穴ずつ分注し、室温で 1 ~ 2 時間反応させた。よく洗浄した後、アビジン - ペルオキシダーゼ（VECTOR 社）を 50 μ l / 穴ずつ分注し、室温で 1 ~ 2 時間反応させた。P B S - T w e e n でよく洗浄した後、（1）と同様にして発色し、O D_{415nm} の吸光度を測定した。16 通りの第一抗体と第二抗体の組み合わせのうち、PEG 化した ND 28 を最も高感度に検出する組合せとして第一抗体が K M 5 0 9、第二抗体がウサギ抗 ND 28 抗体の組合せを選択した。この組合せを用いた系による G - C S F、ND 28、PEG 化 G - C S F、PEG 化 ND 28 およびインターフェロン の定量曲線を図 4 に示した。図 4 に示したようにこの系は ND 28、G - C S F、PEG 化 G - C S F および PEG 化 ND 28 をいずれも等しい感度で検出することができた。

10

【0037】

20

（8）抗 ND 28 モノクローナル抗体を用いた ND 28 定量系の確立

（3）で得られたハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体のうち、ND 28 に反応し、G - C S F に反応せず、PEG 化した G - C S F および PEG 化した ND 28 には反応しないモノクローナル抗体である K M 4 9 8 または K M 5 1 1 を第一抗体に用い、（6）で作製したウサギ抗 ND 28 抗体を第二抗体に用いてサンドイッチ ELISA 法による ND 28 に特異的な定量系を検討した。その結果、第一抗体として K M 5 1 1、第二抗体としてウサギ抗 ND 28 抗体の組合せを選択した。この組合せを用いた定量系による G - C S F、ND 28、PEG 化 G - C S F、PEG 化 ND 28 およびインターフェロン の定量曲線を図 5 に示した。図 5 に示したようにこの定量系は、ND 28 を特異的に定量することができた。

30

【0038】

（9）抗 G - C S F モノクローナル抗体を用いた G - C S F 定量系の確立

（3）で得られたハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体のうち、G - C S F に反応し、ND 28 に反応せず、PEG 化した G - C S F および PEG 化した ND 28 には反応しないモノクローナル抗体であるモノクローナル抗体 K M 3 4 3 を第一抗体に用い、（6）で作製したウサギ抗 ND 28 抗体を第二抗体に用いてサンドイッチ ELISA 法による G - C S F に特異的な定量系を確立した。この定量系による G - C S F、ND 28、PEG 化 G - C S F、PEG 化 ND 28 およびインターフェロン の定量曲線を図 6 に示した。図 6 に示したようにこの定量系は、G - C S F を特異的に定量することができた。

40

【0039】

（10）PEG 化した ND 28 の定量

（7）で確立した定量系 1 によって求められる値より（8）で確立した ND 28 に特異的な定量系（定量系 3）によって求められる値と（9）で確立した G - C S F に特異的な定量系（定量系 2）によって求められる値とを差し引くことにより、PEG 化した ND 28 を高感度に定量することができた。

【実施例 2】

【0040】

（1）抗 ND 28 抗体を用いた PEG 化した ND 28 および ND 28 の定量系（定量系 1）の確立

実施例 1 の（6）で得られた抗 ND 28 抗体よりヒンジ法（酵素免疫測定法、第 3 版、

50

医学書院刊)を用いてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ND28抗体Fab'を作製した。

【0041】

第一抗体としてウサギ抗ND28抗体を用い、第二抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ND28抗体Fab'を用いてサンドイッチELISA法によるPEG化したND28およびND28の定量系を確立した。この定量系によるPEG化ND28およびND28の定量曲線を図7に示した。図7に示したようにこの定量系は、ND28およびPEG化したND28を定量することができた。

【0042】

(2) ND28の定量系の確立

第一抗体として、ND28に反応し、G-CSFに反応せず、PEG化したG-CSFおよびPEG化したND28には反応しないモノクローナル抗体であるKM511を用い、第二抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ND28を用いたサンドイッチELISA法によるND28の定量系を確立した。この定量系によるPEG化ND28およびND28の定量曲線を図8に示した。図8に示したようにこの定量系は、ND28を定量することができた。

【0043】

(3) PEG化したND28の定量系の確立

実施例1と同様にして、(1)で確立したND28およびPEG化したND28の定量系によって求められる値より(2)で確立したND28に特異的な定量系によって求められる値を差し引くことにより、PEG化したND28を高感度に定量することができた。

【実施例3】

【0044】

PEG化したND28を投与したラットの血中PEG化ND28量の測定

実施例2の(3)で確立した定量系を用いて、PEG化したND28を投与したラットの血中のPEG化したND28量の測定を行った。また、実施例2の(2)で確立した定量系を用いて、ND28を投与したラットの血中のND28の量を測定した。PEG化したND28またはND28は、50 μ g/kgでラットの静脈内に投与し、投与後、経時的に血清を採取して、血清中のPEG化したND28またはND28量を測定した。その結果を図9に示した。図9に示したように、PEG化ND28は、ND28と比較して血中クリアランスが著しく低下した。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】モノクローナル抗体KM341、KM342、KM343、KM498、KM509、KM510およびKM511のバインディングアッセイによるG-CSF、ND28および大腸菌夾雑蛋白質NY49との反応性を示す。

【図2】モノクローナル抗体KM341、KM342、KM343、KM498、KM509、KM510およびKM511のインヒビションアッセイによるPEG化したG-CSFとの反応性(A)およびPEG化したND28との反応性(B)を示す。

【図3】ウサギ抗ND28抗体のバインディングアッセイによるG-CSF、ND28および大腸菌夾雑蛋白質NY49との反応性(A)およびインヒビションアッセイによるPEG化したND28との反応性(B)を示す。

【図4】第一抗体にKM509、第二抗体にビオチン化ウサギ抗ND28を用いたサンドイッチELISA系によるG-CSF、ND28、PEG化したG-CSF、PEG化したND28およびインターフェロンの定量曲線を示す。

【図5】第一抗体にKM511、第二抗体にビオチン化ウサギ抗ND28を用いたサンドイッチELISA系によるG-CSF、ND28、PEG化したG-CSF、PEG化したND28およびインターフェロンの定量曲線を示す。

【図6】第一抗体にKM343、第二抗体にビオチン化ウサギ抗ND28を用いたサンドイッチELISA系によるG-CSF、ND28、PEG化したG-CSF、PEG化したND28およびインターフェロンの定量曲線を示す。

10

20

30

40

50

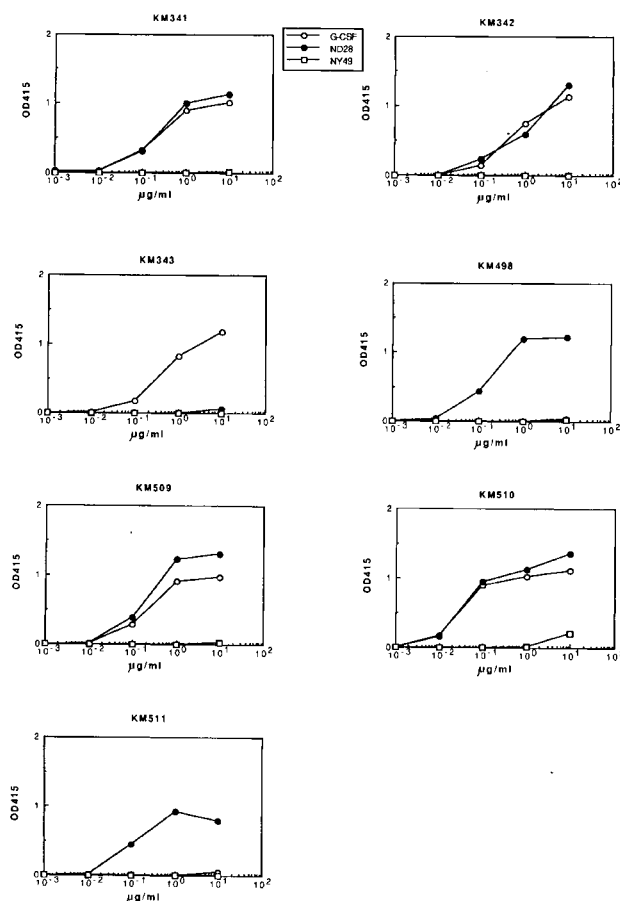
【図 7】第一抗体にウサギ抗ND28抗体、第二抗体にペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ND28Fab'を用いたサンドイッチELISA系によるND28およびPEG化したND28の定量曲線を示す。

【図 8】第一抗体にKM511、第二抗体にペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ND28を用いたサンドイッチELISA系によるND28、PEG化したND28の定量曲線を示す。

【図 9】PEG化したND28およびND28を投与したラットを経時的に採血し、血中のPEG化したND28およびND28の量を測定した結果を示す。 はPEG化したND28を投与したラットの血中のPEG化したND28およびND28の量を、 はPEG化したND28を投与したラットの血中のND28の量を、 はND28を投与したラットの血中のND28の量を示す。

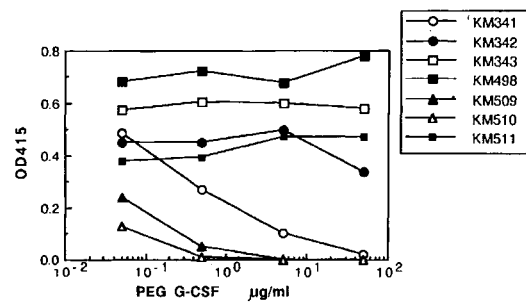
10

【図 1】

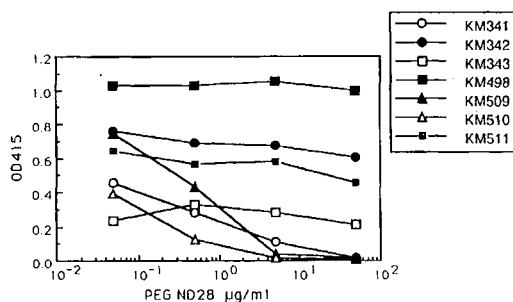


【図 2】

(A) モノクローナル抗体のPEG化G-CSFとの反応性

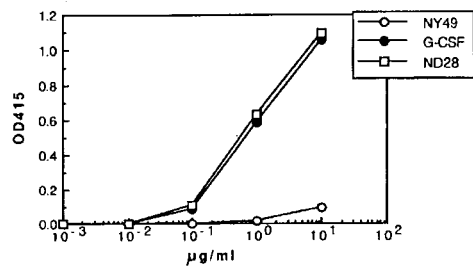


(B) モノクローナル抗体のPEG化ND28との反応性

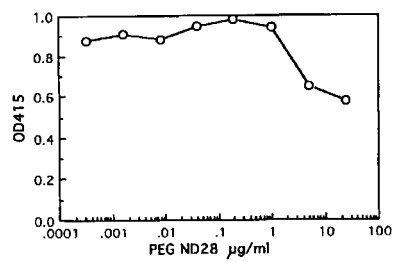


【 図 3 】

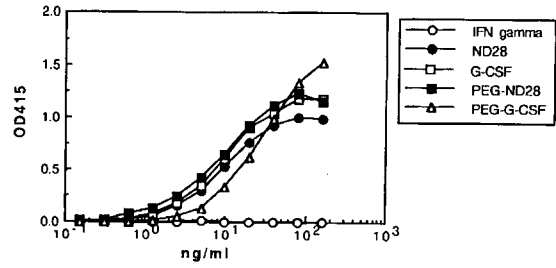
(A) ウサギ抗ND28抗血清の反応特異性



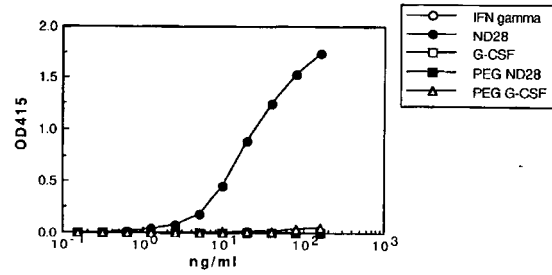
(B) ウサギ抗ND28抗血清のPEG化ND28との反応性



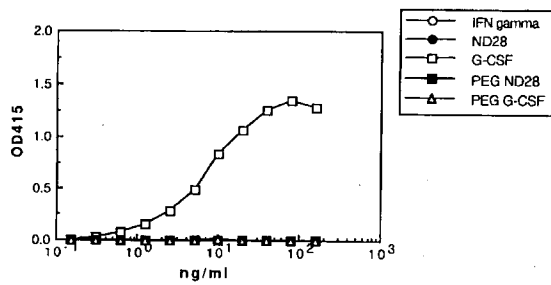
【 図 4 】



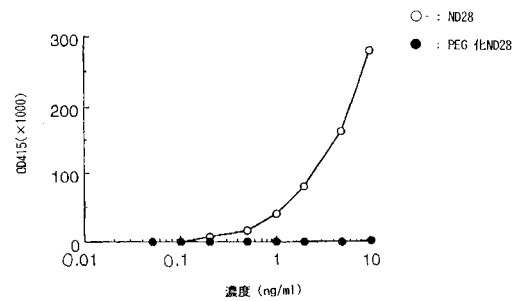
【 図 5 】



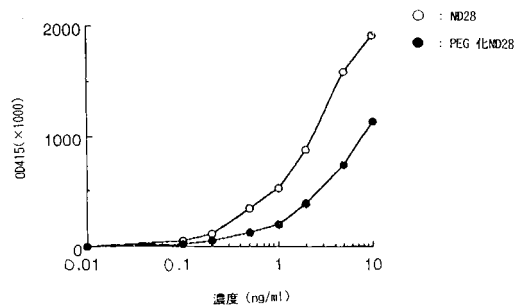
【 図 6 】



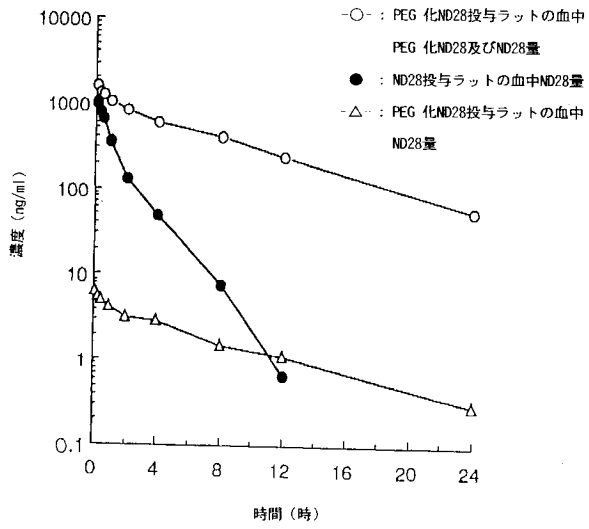
【 図 8 】



【 図 7 】



【図 9】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/577	C 1 2 N 15/00 C	
F ターム(参考)	4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE07 DA01 DA13	
	4H045 AA11 AA20 BA57 DA76 EA20 EA50 FA74 GA22	

专利名称(译)	聚乙二醇化人粒细胞集落刺激因子的测定		
公开(公告)号	JP2005308757A	公开(公告)日	2005-11-04
申请号	JP2005154801	申请日	2005-05-27
申请(专利权)人(译)	协和醯酵工业株式会社		
[标]发明人	花井陳雄 古谷安希子 山崎基生 小林智 桑原隆		
发明人	花井 陳雄 古谷 安希子 山▲崎▼ 基生 小林 智 ▲桑▼原 隆		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/24 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/543 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/53.D C07K16/24 C12P21/08 G01N33/543.545.Z G01N33/577.B C12N15/00.C		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/GA03 4B024/HA11 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE07 4B064/DA01 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA57 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA22		
其他公开文献	JP3821830B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：高度敏感地确定PEG人粒细胞集落刺激因子或其衍生物。ŽSOLUTION：使用PEG人粒细胞集落刺激因子或其衍生物，与PEG人粒细胞集落刺激因子或其衍生物和单克隆抗体反应的免疫测定方法测定PEG人粒细胞集落刺激因子或其衍生物的特异性反应人粒细胞集落刺激因子或其衍生物，不与PEG人粒细胞集落刺激因子或其衍生物反应。Ž

				特開 (P2 (43) 公開日 平成17年11月4日
(51) Int. Cl. ⁷	FI			テーマコード
G01N 33/53	G01N 33/53	D		4B024
C07K 16/24	C07K 16/24			4B064
C12N 15/02	C12P 21/08			4H045
C12P 21/08	G01N 33/543	545Z		
G01N 33/543	G01N 33/577	B		
				審査請求 有 請求項の数 9 O L (全 16 頁)
(21) 出願番号	特願2005-154801 (P2005-154801)	(71) 出願人	000001029	
(22) 出願日	平成17年5月27日 (2005. 5. 27)		協和醯酵工業株式会社	
(62) 分割の表示	特願平6-311763の分割	(72) 発明者	東京都千代田区大手町1丁目1	
原出願日	平成6年12月15日 (1994. 12. 15)		花井 陳雄	
		(72) 発明者	神奈川県横浜市大野台7-1	
			古谷 安希子	
		(72) 発明者	東京都町田市木曽町1464	
			山▲崎▼ 基生	
		(72) 発明者	東京都町田市中町3-9-1	
			小林 智	
		(72) 発明者	静岡県駿東郡長泉町上土狩6	
			▲桑▼原 隆	
		(72) 発明者	静岡県駿東郡長泉町下土狩1	
			201	