

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 316999

(P2002 - 316999A)

(43)公開日 平成14年10月31日(2002.10.31)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
C 0 7 K 16/36		C 0 7 K 16/36	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/00		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4
15/02		G 0 1 N 33/53	L 4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08		33/543	581 A 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53		33/577	B

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 8 数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 118285(P2001 - 118285)

(22)出願日 平成13年4月17日(2001.4.17)

(71)出願人 390037327

第一化学薬品株式会社
東京都中央区日本橋3丁目13番5号

(72)発明者 矢後 弘和

茨城県竜ヶ崎市向陽台3 - 3 - 1 第一化学薬
品株式会社診断薬研究所内

(72)発明者 林 要司

茨城県竜ヶ崎市向陽台3 - 3 - 1 第一化学薬
品株式会社診断薬研究所内

(74)代理人 100068700

弁理士 有賀 三幸 (外6名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 モノクローナル抗体

(57)【要約】

【解決手段】 遊離のヒトアンチトロンビンIIIと反応し、かつヒトトロンビン・ヒトアンチトロンビンIII複合体とも反応する抗ヒトトロンビン・ヒトアンチトロンビンIII複合体モノクローナル抗体、及びこれを含有する免疫測定試薬。

【効果】 ヒト検体中のT A T濃度を精度良く、簡便、迅速かつ高感度に検出することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 遊離のヒトアンチトロンビンIIIと反応し、かつヒトトロンビン・ヒトアンチトロンビンIII複合体とも反応する抗ヒトトロンビン・ヒトアンチトロンビンIII複合体モノクローナル抗体。

【請求項2】 抗原物質で免疫した哺乳動物の抗体産生細胞と、哺乳動物の骨髄腫細胞とを融合させた後、酵素免疫測定法により抗原物質と反応する抗体を産生する細胞を選択し、選択した細胞の中から、更にラテックス凝集免疫測定法により抗原物質と反応する抗体を産生する細胞を選択して該細胞を培養することを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項3】 モノクローナル抗体が、ラテックス凝集免疫測定試薬に用いるものである請求項2記載の製造方法。

【請求項4】 ヒトトロンビン・ヒトアンチトロンビンIII複合体で免疫した哺乳動物の抗体産生細胞と、哺乳動物の骨髄腫細胞とを融合させた後、酵素免疫測定法によりヒトトロンビン・ヒトアンチトロンビンIII複合体と反応する抗体を産生する細胞を選択し、選択した細胞の中から、更にラテックス凝集免疫測定法によりヒトトロンビン・ヒトアンチトロンビンIII複合体と反応する抗体を産生する細胞を選択して該細胞を培養することを特徴とする請求項1記載の抗ヒトトロンビン・ヒトアンチトロンビンIII複合体モノクローナル抗体の製造方法。

【請求項5】 ヒトトロンビン・ヒトアンチトロンビンIII複合体で免疫した哺乳動物の抗体産生細胞と、哺乳動物の骨髄腫細胞とを融合させて得られた、請求項1記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項6】 受託番号が、FERM P - 18276、FERM P - 18277、又はFERM P - 18278である請求項5記載のハイブリドーマ。

【請求項7】 請求項1記載の抗ヒトトロンビン・ヒトアンチトロンビンIII複合体モノクローナル抗体を含有するヒトトロンビン・ヒトアンチトロンビンIII複合体の免疫測定試薬。

【請求項8】 請求項1記載の抗ヒトトロンビン・ヒトアンチトロンビンIII複合体モノクローナル抗体を含有するヒトトロンビン・ヒトアンチトロンビンIII複合体のラテックス凝集免疫測定試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なモノクローナル抗体、及びこれを用い、ヒト検体中のヒトトロンビン・ヒトアンチトロンビンIII複合体濃度を精度良く、簡便に測定することができ、血液凝固傾向の診断に有用な免疫測定試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】ヒトアンチトロンビンIII（以下、ATI

IIという）は、血液凝固系のセリンプロテアーゼの重要なインヒビターであり、ヒトトロンビンを始めとして活性化されたヒト血液凝固第XII因子、ヒト血液凝固第XI因子、ヒト血液凝固第X因子、ヒト血液凝固第IX因子の活性を阻害する。ATIIIとセリンプロテアーゼとの反応は、1:1のモル比で進行し、ATIIIのアルギニン残基がセリンプロテアーゼの活性中心であるセリン残基とエステル結合して複合体を形成することによりセリンプロテアーゼの活性を抑制する。このような複合体のひとつとして、ヒトトロンビン・ヒトアンチトロンビンIII複合体（以下、TATという）が知られている。ヒトの血液中におけるTATの増加は、血液凝固機序の始動、及びその活性化によってヒトトロンビン又は他の血液凝固系のセリンプロテアーゼが生成したことを示すものと考えられている。従って、血液中のTAT量を測定することにより、血液凝固系の動態の一端を知り得るものと推察され、それによって血液凝固面から患者の病態を解明すること、例えば血栓形成あるいは汎発性血管内血液凝固症（DIC）への病態の進展を早期に予知し、適切な治療をすることが可能となる。

【0003】ヒト検体中のTATを免疫学的に測定する方法として、抗TATneoantigen - ポリクローナル抗体を、¹²⁵Iで標識したTATを用いてインヒビションアッセイすることによりTATを測定する方法（Herbert, L. Lau, The Journal of Biological Chemistry, 255, 5885-5893(1980)）；抗トロンビン - ポリクローナル抗体を固相抗体に用い、抗ATIII - ポリクローナル抗体を酵素標識抗体に用いたサンドイッチ系によるヒト検体中のTATの測定方法（H. Pelzer, Thrombosis & Haemostasis, 59, 101-106(1988)）などが提案されている。また、H. Pelzerらの方法に準じたポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ系のキット（特開平3-48158号）が提案され、商品化されている。

【0004】しかしながら、これらの測定方法は、いずれもポリクローナル抗体を使用するため、抗体の均一性に問題がある。また、ラジオイムノアッセイや酵素免疫測定法であるため、汎用性の高い自動分析機への適用に課題が残っている。すなわち、この均一でない抗体は検体中に含まれる交差反応物と反応する確率が高く、測定値が変動しやすいため、これまでの方法は、感度、精度、簡便性、更に汎用性などの点で、現在の医療ニーズに合致するものとは言い難かった。

【0005】このような欠点を克服するには、モノクローナル抗体の利用が考えられる。抗TATモノクローナル抗体としては、S. Asakuraら、Biochimica Biophysica Acta, 952, 37-47(1988)、フランス特許第2645647号、特公平6-44876号、特開平7-238099号等が知られている。しかしながら、これらのモノクローナル抗体においても、実際に臨床検体中のTATを汎用性の高い自動分析機を用いて簡便に定量測定できるラテックス凝集免

疫測定法等の凝集を原理とする免疫測定法に適用できるものはなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、ヒト検体中のTAT測定において、ラテックス凝集免疫測定法等の凝集を原理とする免疫測定法に用いるのに好適なモノクローナル抗体を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】かかる実情において、本発明者らは鋭意検討した結果、抗原に特異的なモノクローナル抗体を選択する際に、従来の酵素免疫測定法に加え、TATを担持したラテックス等の不溶性担体を利用することにより、汎用性、簡便性の高い免疫測定法に好適に用いることができるモノクローナル抗体が得られ、これを用いれば、ヒト検体中のTAT濃度を精度良く、汎用性の高い自動分析機を用いて簡便に測定できることを見出し、本発明を完成した。

【0008】すなわち、本発明は、遊離のヒトアンチトロンピンIIIと反応し、かつヒトトロンピン・ヒトアンチトロンピンIII複合体とも反応する抗ヒトトロンピン・ヒトアンチトロンピンIII複合体モノクローナル抗体を提供するものである。

【0009】また、本発明は、抗原物質で免疫した哺乳動物の抗体産生細胞と、哺乳動物の骨髄腫細胞とを融合させた後、酵素免疫測定法（以下、「ELISA法」という）により抗原物質と反応する抗体を産生する細胞を選択し、選択した細胞の中から、更にラテックス凝集免疫測定法（以下、「LTIA法」という）等の凝集を原理とする免疫測定法により抗原物質と反応する抗体を産生する細胞を選択して該細胞を培養することを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法を提供するものである。

【0010】また、本発明は、ヒトトロンピン・ヒトアンチトロンピンIII複合体で免疫した哺乳動物の抗体産生細胞と、哺乳動物の骨髄腫細胞とを融合させて得られた、前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供するものである。

【0011】さらに、本発明は、前記抗ヒトトロンピン・ヒトアンチトロンピンIII複合体モノクローナル抗体を含有するヒトトロンピン・ヒトアンチトロンピンIII複合体の免疫測定試薬を提供するものである。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明のモノクローナル抗体は、TATで免疫した哺乳動物の抗体産生細胞と、哺乳動物由来の骨髄腫細胞とを融合して得られるハイブリドーマにより産生され、常法により調製することができる（G. Kohler and C. Milstein, Nature, 1975, 256 ; Yarmush M. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2899-, 1980）。

【0013】免疫原として用いられるTATは、ヒトト

ロンピンとATIIIを結合させることにより作成される。ここで用いられるヒトトロンピンとATIIIは、市販品及びヒト血漿からの精製品のいずれでも使用することができる。ヒトトロンピンとATIIIは、1:1~1:5のモル比で混合し、結合したTATはカラムクロマトグラフィー等で精製して用いるのが好ましい。

【0014】ハイブリドーマは、例えば、得られたTATを免疫原として哺乳動物体内に注射等することにより調製される。免疫する哺乳動物は特に制限されず、後の操作において細胞融合に使用する骨髄腫細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、具体的には、マウス、ラット等が挙げられ、BALB/cマウスを用いるのが一般的である。

【0015】前記の免疫原を哺乳動物に免疫する方法は特に制限されず、例えばTAT単独又はTAT構成物質の1種以上を組み合わせた免疫原を、哺乳動物の皮下、皮内、腹腔内、血管内、筋肉、脾臓内等に注射する方法；飼料又は水に加え、経口的に投与方法等を用いることができる。また、免疫する際には、必要に応じてアジュバントと併用することもできる。

【0016】次に、免疫動物から採取した脾臓細胞をマウス骨髄腫細胞と融合させる。マウス骨髄腫細胞としては、ヒボキサシンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損(HGPRT⁻)、チミジンキナーゼ欠損(TK⁻)等の適切なマーカーを有するものが好ましい。融合は、公知の方法に準じて行なうことができ、融合促進剤として、ポリエチレングリコール、センダイウイルス等を用いることができる。脾臓細胞と骨髄腫細胞との混合比は、1:1~10:1が好ましい。また、電気融合法等による細胞融合を行なうこともできる。

【0017】本発明において、ラテックス凝集免疫測定試薬等の凝集を原理とする免疫測定試薬に用いるのに好適なモノクローナル抗体は、細胞融合の後、ELISA法により抗原物質と反応する抗体を産生する細胞を選択し、選択した細胞の中から、更にLTIA法等の凝集を原理とする免疫測定法により抗原物質と反応する抗体を産生する細胞を選択して該細胞を培養することにより、製造することができる。

【0018】具体的には、ラテックス凝集免疫測定試薬等の凝集を原理とする免疫測定試薬に用いるのに好適なモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選択するには、細胞融合の後、通常の細胞選択用培地(HAT培地)で培養することによりハイブリドーマを選択するとともに、目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをELISA法及びLTIA法等の凝集を原理とする免疫測定法による選択と限界希釈法によるクローニングを繰り返すことにより、目的のハイブリドーマを樹立することができる。限界希釈法によるクローニングにおいては、フィーダーとしてマウス胸腺細胞、脾臓細胞、腹腔マクロファージ、あるいは、これらと同様の

効果を示す公知の添加剤を用いるのが好ましい。

【0019】ELISA法は、公知の方法に準じて行なうことができ、例えば、TATを直接又はTAT結合体を介してELISAプレートに吸着させるか、あるいは、抗マウスIg抗体を直接ELISAプレートに吸着させた後、ハイブリドーマの培養上清を反応させ、次に、酵素標識抗マウスIg抗体を反応させ、未反応の酵素標識抗マウスIg抗体をELISAプレートから洗浄除去した後に酵素反応を行ない、反応が陽性となったウエルに含まれる細胞を選択する。TAT結合体として、抗ATIII抗体、抗トロンピン抗体、抗プロトロンピン抗体、ヘパリン等を用いることができる。また、ELISAプレートへの吸着は、物理吸着法又は化学結合法を用いることができる。

【0020】また、LTI A法等の凝集を原理とする免疫測定法は、生化学用自動分析装置を用い、TATを直接又はTAT結合体を介して担持させた不溶性担体とモノクローナル抗体結合体担持不溶性担体を用いてハイブリドーマの培養上清と反応させ、凝集が生じたウエルに含まれる細胞を選択する方法である。TAT結合体として、抗ATIII抗体、抗トロンピン抗体、抗プロトロンピン抗体、ヘパリン等を用いることができ、モノクローナル抗体結合体としては、プロテインA、プロテインG、抗マウスIg抗体等を用いることができる。また、不溶性担体への吸着は、物理吸着法又は化学結合法を用いることができる。

【0021】上記で選択したハイブリドーマは、適当な培地中で培養するか、又はマウス等の腹腔内で培養することにより、本発明のモノクローナル抗体を得ることができる。ここで用いられる培地としては、牛胎児血清、抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン等）を含むRPMI 1640培地が好ましい。培養は、例えば、上記ハイブリドーマを $10^4 \sim 10^5$ 個/mL濃度で培地に加え、5%の炭酸ガス濃度、37°Cの条件下で2～4日間程度行なうのが好ましい。得られた培養上清を遠心分離すれば、本発明のモノクローナル抗体を得ることができる。一方、腹腔内培養の場合には、上記ハイブリドーマをBALB/cマウス、ヌードマウス、ヌードラット等の腹腔内に投与し、その腹水を回収すれば良い。

【0022】このようにして得られた培養上清中又は腹水中の本発明モノクローナル抗体は、このままでも使用することができるが、例えば硫酸沈澱による分画法、イオン交換クロマトグラフィー法、あるいはプロテインA、プロテインG若しくは抗マウスIg抗体結合担体を用いるアフィニティークロマトグラフィー法、又は限外膜濾過法等によって精製して用いるのが好ましい。

【0023】本発明の免疫測定試薬は、前記のようにして得られた抗TATモノクローナル抗体を含有するものであり、当該モノクローナル抗体を1種又は2種以上組み合わせる用いることができる。また、TATに結合性

を有する物質、例えば抗ATIII抗体、抗トロンピン抗体、抗プロトロンピン抗体、ヘパリン等を配合することもできる。

【0024】本発明の試薬は、モノクローナル抗体結合不溶性担体を懸濁させることにより調製されるが、不溶性担体を懸濁させる液としては、例えばリン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等の緩衝液が使用される。反応のpHは5～10、特にpH6～9が好ましい。

【0025】また、モノクローナル抗体を結合する不溶性担体としては、特に制限されず、通常抗原又は抗体を測定するのに用いられる物質であればいずれでも使用することができ、ラテックス等の有機高分子物質、金属コロイド等の無機高分子物質が好ましい。有機高分子物質としては、特にアクリル酸重合体、スチレン重合体、メタクリル酸重合体等の樹脂から選ばれた1種又は2種以上の微粉末を均一に懸濁させたラテックス粒子が好ましい。また、カルボキシル基又はアミノ基等を有するラテックスは、縮合剤又は二架橋試薬等を用いてモノクローナル抗体を化学的に結合させる場合に好適に使用される。

【0026】不溶性担体の粒径は特に制限されず、凝集体を直接光学的に測定する場合、又はイムノクロマトグラフィー法による担体上で肉眼的に観察する場合は、一般に、平均粒子径が $1.6 \mu\text{m}$ 以下のものが好ましく、特に平均粒子径 $0.01 \sim 1 \mu\text{m}$ 、更に $0.01 \sim 0.5 \mu\text{m}$ のものが好ましい。また、凝集体を凝集板上で肉眼的に観察する場合には、平均粒子径が $1 \mu\text{m}$ 以上、特に $1 \sim 20 \mu\text{m}$ のものが好ましい。

【0027】モノクローナル抗体を不溶性担体に結合させる方法は特に制限されず、モノクローナル抗体を直接不溶性担体に物理吸着又は化学結合させることができ、更に、モノクローナル抗体結合体を介して不溶性担体に結合させることもできる。ここで、モノクローナル抗体結合体としては、プロテインA、プロテインG、抗マウスIg抗体等を使用することができ、これらモノクローナル抗体結合体の不溶性担体への結合は、物理吸着又は化学結合のいずれでも良い。

【0028】本発明の免疫測定試薬は、測定対象となる試料（血液等のヒト検体）と混合することにより使用され、試料中に存在するTATと本発明のモノクローナル抗体が反応して凝集することにより、TATを測定することができる。試料中のTATと反応して生じた凝集塊の程度の測定は、光学的に測定することができ、かかる凝集塊の光学的測定法としては、通常行なわれている方法であれば特に制限されず、汎用の分光光度計、分光光度測定を測定原理とした生化学用自動分析装置、近赤外を測定波長とした装置、積分球濁度を測定原理とした装置、散乱光強度を測定する装置等の光学的測定機器などを用いることができる。本発明の免疫測定試薬は、特に

ラテックス凝集免疫測定試薬として好適である。

【0029】

【実施例】次に、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら制限されるものではない。

【0030】実施例1

(1) TATの調製：トロンビン製剤(ミドリ十字社製)のトロンビンとATIII製剤(ヘキスト社製)のATIIIを、0.02Mトリス緩衝液(pH7.4)に溶解し、トロンビン：ATIII=1：1.5のモル比で混合した後、37で10分間反応を行なった。反応物をHeparin-Sepharose(ファルマシア社製)の2×6cmのカラムにアプライし、吸着画分を0.1-2M NaCl/0.02Mトリス緩衝液(pH7.4)のリニアグラジエントで溶出した。各フラクションを4-20%SDS-PAGE(第一化学薬品社製)にて分析し、TAT画分を回収した。TAT濃度はELISA(エンザイグノストTATベリングベルケ社製)で測定した結果、750µg/mLであった。

【0031】(2)免疫：上記TATの100µgを、1回の免疫に使用した。初回免疫及び追加免疫ともにフロイドの完全アジュバントを使用した。TAT100µLとフロイドのアジュバント100µLを混合し、得られたエマルジョン200µLを1回の免疫につき1匹のBALB/c雄マウスの腹腔に注射し、4回免疫を2週間間隔で繰り返した。マウスの眼底静脈から採血し、抗体価をELISA法で測定し、抗体価の高いマウスを選んで細胞融合に使用した。

【0032】(3)細胞融合：4回目の免疫から2週間後に、生理食塩水200µLに希釈したTAT100µgをマウス腹腔に注射し、その3日後にマウスから脾臓を摘出した。摘出した脾臓から脾細胞を回収し、生きた脾細胞10⁸個と予め培養しておいた対数増殖期のマウス骨髓腫細胞(SP2/OあるいはP3U1)の10⁷個を混合した後、50%(w/v)のポリエチレングリコール1540を含むGKN溶液(NaCl：8g, KCl：0.4g, グルコース：2g, Na₂HPO₄：1.41g, NaH₂PO₄・2H₂O：0.78gを精製水1Lに溶解)を用いて細胞を融合した。融合後の細胞をHAT(10⁻⁴M ヒポキサンチン、4×10⁻⁷M アミノプテリン、1.5×10⁻⁵M チミジン)、フィーダー細胞を含む15%FCS RPMI培地に懸濁し、96穴マイクロカルチャープレートを用い、37、5%炭酸ガス培養器中で培養した。

【0033】(4)ELISA法による抗TATモノクローナル抗体の選択：培養上清中の抗TATモノクローナル抗体を選択するため、PBSで希釈したTAT(1µg/mL)、ATIII(1µg/mL)、あるいはヤギ抗マウスIg抗体(1µg/mL：カッペルプロダクト社製)を固相化した96穴マイクロプレートに培養上清を加

え、37 1時間保温の後、PBSで洗浄し、0.1%BSA-PBSで1000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIg抗体(ヤギ由来：カッペルプロダクト社製)を加え、37で1時間保温した。これをPBSで洗浄後、基質液(0.2% オルトフェニレンジアミン、0.02%過酸化水素水を含むクエン酸-リン酸緩衝液；pH5.0)を加えて室温で30分反応させ、硫酸を加えて反応を停止させた後、吸光度を測定した。吸光度が高い結果を出した上清のウエルを選択した。

【0034】(5)ヘパリン担持ラテックス液の調製：0.05Mホウ酸緩衝液(pH7.5)で2%濃度に調製したアミノ化ポリスチレンラテックス(平均粒径0.2µm、インターヘイシャル・ダイナミックス社製)の懸濁液6mLに、0.05Mホウ酸緩衝液(pH7.5)で8mg/mLの濃度に調製したヘパリンナトリウム(第一化学薬品社製)溶液3mL及び0.05Mホウ酸緩衝液(pH7.5)で2mg/mLの濃度に調製した1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(同仁化学研究所製)溶液3mLを加え、25で4時間反応させた。さらに、グリシンを2%含有した0.05Mホウ酸緩衝液(pH7.5)4mLを加え、25で一晩攪拌した。0.05Mグリシン緩衝液(pH8.4)を用いて遠心洗浄を2回行なった後、0.05Mグリシン緩衝液(pH8.4)84mLに再分散させ、ヘパリン担持ラテックス液(ヘパリン-Lx)を得た。

【0035】(6)プロテインA担持ラテックス液の調製：プロテインA(シグマ社製)60mgを精製水8.4mLに溶解した後、0.25Mグリシン緩衝液(pH8.4)で一晩透析した。このプロテインA液7.7mLに、0.25Mグリシン緩衝液(pH8.4)を加えて13mLとし、これに、0.25Mグリシン緩衝液(pH8.4)で2%濃度に調製した平均粒径0.2µmのポリスチレンラテックス(積水化学工業社製)の懸濁液13mLを加え、4にて一晩攪拌した。次に、2%牛血清アルブミンを含む0.05Mグリシン緩衝液(pH8.4)を加え、4で一晩攪拌した。遠心洗浄により上清を除去した後、0.05Mグリシン緩衝液(pH8.4)182mLを加えて良く混和し、プロテインA担持ラテックス液(プロテインA-Lx)を得た。

【0036】(7)TAT担持ラテックス液の調製：上記(1)で調製した10mgのTATを、0.25Mグリシン緩衝液(pH8.4)で一晩透析した。このTAT溶液に、0.25Mグリシン緩衝液(pH8.4)を加えて13mLとし、これに、0.25Mグリシン緩衝液(pH8.4)で2%濃度に調製した平均粒径0.2µmのポリスチレンラテックス(積水化学工業社製)の懸濁液13mLを加え、4で一晩攪拌した。次に、2%牛血清アルブミンを含む0.05Mグリシン緩衝液(pH8.4)を加え、4で一晩攪拌した。遠心洗浄によ

り上清を除去した後、0.05Mグリシン緩衝液(pH 8.4)182mLを加えてよく混和し、TAT担持ラテックス液(TAT-Lx)を得た。

【0037】(8) L T I A法による抗TATモノクローナル抗体の選択：前記(4)において、E L I S A法にて培養上清中の抗TATモノクローナル抗体の存在が確認されたハイブリドーマについて、更に、ラテックス凝集免疫測定試薬に好適なモノクローナル抗体を選択した。すなわち、第1試薬として、10%グリセリン、0.1%アルブミンを含有した0.02Mトリス緩衝液(pH 9.0)に1µg/mLのTAT又はA T I I Iを溶解した液を用い、第1試薬200µLに培養上清20µLを加え、37℃で5分間加温後、第2試薬として上記で調製した2mLのヘパリン担持ラテックス液と2mLのプロテインA担持ラテックス液を混合した溶液100µLを加えて攪拌した。また、TAT及びA T I I Iを除いた第1試薬200µLに培養上清20µLを加え、37℃で5分間加温後、第2試薬として、上記で調製した2mLのTAT担持ラテックス液と2mLのプロテインA担持ラテックス液を混合した溶液100µLを加えて攪拌した。その後、波長600nmにおける1~5分間の吸光度変化量を測定し、いずれの場合にも吸光度の高いものを選択した。

【0038】(9) 抗TATモノクローナル抗体産生細胞の樹立：E L I S A法及びL T I A法で陽性を示した細胞について、常法により、限界希釈法にて単クローン化を行なった。すなわち、BALB/cマウスの胸腺細胞及び15%FCS含有RPMI 1640培地を含む96穴マイクロカルチャープレートを用い、特異抗体陽性細胞を37℃、5%炭酸ガス培養器中で培養した。E L I S A法による特異抗体陽性ウエルの選択及び限界希釈法による単クローン化操作を各3回繰り返して、抗TATモノクローナル抗体産生細胞を樹立した。得られたハイブリドーマのうち3株は、それぞれ26221、26223、26403と命名し、産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に寄託した。この株名と受託番号を表1に示す。

【0039】

【表1】

ハイブリドーマNo.	受託番号
26221	FERM P-18276
26223	FERM P-18277
26403	FERM P-18278

*【0040】(10) 抗TATモノクローナル抗体の分離及び精製：前記で得た抗TATモノクローナル抗体産生ハイブリドーマをマウス腹腔内で培養して、モノクローナル抗体を調製した。前処理として8週齢のBALB/cマウスの腹腔内に0.5mLのプリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン)を投与した。8日後、0.5mLのRPMI 1640培地に浮遊した細胞5x10⁵個をこのマウスの腹腔内に投与した。投与後9日目から腹水を繰り返し採取してプールした。集めた腹水は3,000rpmで10分遠心分離を行ない、細胞等の不溶物を除去した。上清部分に等量の飽和硫酸アンモニウム溶液を攪拌しながら加え、一夜、4℃に放置して得られた沈澱を遠心分離によって回収した。沈澱を20mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)に溶解、透析した。同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephacel(ファルマシア社製)カラムに透析内容を吸着させた後、同緩衝液中のNaCl 0.3Mの濃度勾配で溶出させ、精製抗体を得た。

【0041】(11) 抗TATモノクローナル抗体の反応特異性：上記で得られたモノクローナル抗体の反応特異性は、固相化したTAT、A T I I I、トロンピン及びプロトロンピンとの反応性をE L I S A法により、遊離のTAT及びA T I I Iとの反応性をL T I A法により確認した。すなわち、E L I S A法は、TAT(1µg/mL)、A T I I I(1µg/mL)、トロンピン(1µg/mL)、プロトロンピン(1µg/mL)を96穴マイクロプレートに固相化し、培養上清の代わりに精製モノクローナル抗体(5µg/mL)を用い、前記(4)と同様にして、行なった。また、L T I A法は、第1試薬として10%グリセリン、0.1%アルブミンを含有した0.02Mトリス緩衝液(pH 9.0)に1µg/mLのTAT又はA T I I Iを溶解した液を用い、第1試薬200µLに試料として5µg/mLの精製抗モノクローナル抗体20µLを加え、37℃で5分間加温後、第2試薬として上記で調製した2mLのヘパリン担持ラテックス液と2mLのプロテインA担持ラテックス液を混合した溶液100µLを加えて攪拌した。その後、波長600nmにおける吸光度を測定した。結果を表2に示す。

*【0042】

40 【表2】

12

抗原 / 抗体	26221	26223	26403
遊離のTAT	+	+	+
固相化したTAT	+	+	+
遊離のATIII	+	+	+
固相化したATIII	+	+	+
固相化したトロンピン	-	-	-
固相化したプロトロンピン	-	-	-

【0043】(12)抗TATモノクローナル抗体の反応性：前記(11)のL T I A法と同様にして、精製抗モノクローナル抗体(26221、26223、26403又は26210(特開平7-238099号記載のもの))*

*を用い、反応性を確認した。波長600nmにおける1~5分間の吸光度変化量を測定した結果を表3に示す。

【0044】

【表3】

(mAbs)

抗原	26221	26223	26403	26210
TAT	32.8	71.0	22.3	7.8
ATIII	57.4	23.8	21.4	2.6

【0045】表3の結果より、本発明のモノクローナル抗体は、TAT及びATIIIとの反応性が高く、ラテックス凝集免疫測定試薬に好適であることが確認された。

【0046】(13)抗TATモノクローナル抗体担持ラテックスの調製：上記で精製した抗TATモノクローナル抗体(26221、26223、26403又は26210)を、0.25Mグリシン緩衝液(pH8.4)で一晩透析した後、1.4mg/mLの濃度に調製した液5mLに、0.25Mグリシン緩衝液(pH8.4)で2%の濃度に調製した平均粒径0.2µmのポリスチレンラテックスの懸濁液5mLを加え、4にで一晩攪拌した。次に、2%牛血清アルブミンを含む0.05Mグリシン緩衝液(pH8.4)50mLを加えてよく混和し、各モノクローナル抗体担持ラテックス液を得た。*

*【0047】(14)ラテックス凝集免疫測定試薬でのTATの測定：第1試薬として、2%NaCl、2%ポリエチレングリコール6000、0.1%アルブミンを含有する0.02Mトリス緩衝液(pH9.0)を調製した。一方、第2試薬として、上記で調製した各モノクローナル抗体担持ラテックス液とヘパリン担持ラテックス液の1:1混合液を調製した。第1試薬200µLに、1、10又は100ng/mLのTAT溶解液20µLを加え、37で5分間加温後、第2試薬100µLを加えて攪拌した。その後、波長600nmにおける1~5分間の吸光度変化量を測定した。結果を表4に示す。

【0048】

【表4】

(mAbs)

TAT濃度 (ng/mL)	26221	26223	26403	26210
1	0	3.2	13.0	0
10	1.7	25.2	46.8	0
100	24.3	191.3	201.5	10.1

【0049】

【発明の効果】本発明のモノクローナル抗体は、TAT及びATIIIとの反応性が高く、免疫測定試薬として好

適であり、ヒト検体中のTAT濃度を精度良く、簡便、迅速かつ高感度に検出することができる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷G01N 33/543
33/577

識別記号

581

F I

C 1 2 N 5/00
15/00

テマコード(参考)

C

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA44 GA03 HA15
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
DA13
4B065 AA92X AB05 CA25 CA44
CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 CA42 DA76
EA24 EA50 FA72 GA10 GA15

专利名称(译)	单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2002316999A	公开(公告)日	2002-10-31
申请号	JP2001118285	申请日	2001-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	第一化学薬品株式会社		
[标]发明人	矢後弘和 林要司		
发明人	矢後 弘和 林 要司		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/36 C12N5/00 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/543 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/36 C12P21/08 G01N33/53.L G01N33/543.581.A G01N33/577.B C12N5/00 C12N15/00.C		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA24 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA10 4H045/GA15		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决方案：一种抗人凝血酶-人凝血酶III复合物单克隆抗体，它与游离的人凝血酶III反应，并且还与人凝血酶-人凝血酶III复合物反应，并包含一种免疫测定试剂。[效果]可以准确，轻松，快速且高灵敏度地检测人体样品中的TAT浓度。

【表1】

ハイブリドーマNo.	受託番号
26221	FERM P-18276
26223	FERM P-18277
26403	FERM P-18278