

(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2001 - 204465

(P2001 - 204465A)

(43)公開日 平成13年7月31日(2001.7.31)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード <sup>*</sup> (参考)
C 1 2 N 15/02	C 0 7 K 16/44	4 B 0 2 4	
C 0 7 K 16/44	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4	
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/53	S 4 B 0 6 5	
C 1 2 P 21/08	33/577	B 4 H 0 4 5	
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 15/00	C	

審査請求 未請求 請求項の数 50 L (全 5 数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 13833(P2000 - 13833)

(22)出願日 平成12年1月24日(2000.1.24)

(71)出願人 597112483  
株式会社横浜国際バイオ研究所  
横浜市鶴見区大黒町13番46号

(71)出願人 390021636  
塩水港精糖株式会社  
神奈川県横浜市鶴見区大黒町13番46号

(72)発明者 伊藤 哲也  
神奈川県横浜市大黒町13 - 46 株式会社横  
浜国際バイオ研究所内

(74)代理人 100074077  
弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】モノクローナル抗体及び該抗体を産生するハイブリドーマ

(57)【要約】

【課題】 - CD及び/又は分岐 - CDを認識する  
モノクローナル抗体並びに該抗体を産生するハイブリド  
ーマを提供すること。

【解決手段】 下記の性質を有するモノクローナル抗  
体。

- (1)免疫グロブリンの種類: IgM
- (2)分子量: 970,000 (ゲルろ過法による)
- (3) - サイクロデキストリン及び分岐 - サイクロ  
デキストリンと反応するが、置換 - サイクロデキスト  
リン及びマルトオリゴ糖とは反応しない。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の性質を有するモノクローナル抗体。

- (1) 免疫グロブリンの種類：IgM
- (2) 分子量：970,000(ゲルろ過法による)
- (3) -サイクロデキストリン及び分岐 -サイクロデキストリンと反応するが、置換 -サイクロデキストリン及びマルトオリゴ糖とは反応しない。

【請求項2】 ハイブリドーマA7(FERM P-17628)が産生するモノクローナル抗体。

【請求項3】 クラスIgMに属し、 -サイクロデキストリン及び分岐 -サイクロデキストリンと反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項4】 ハイブリドーマが、ハイブリドーマA7(FERM P-17628)である請求項3記載のハイブリドーマ。

【請求項5】 請求項1又は2記載のモノクローナル抗体を含むことを特徴とする -サイクロデキストリン及び/又は分岐 -サイクロデキストリンの検出剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、モノクローナル抗体及び該抗体を産生するハイブリドーマに関し、詳しくは -サイクロデキストリン及び分岐 -サイクロデキストリンと反応するモノクローナル抗体並びに該抗体を産生するハイブリドーマに関する。

## 【0002】

【従来の技術】サイクロデキストリン(以下、CDと略記する。)は、澱粉類に微生物由來の酵素を作用させて得られる環状オリゴ糖であり、グルコース分子が -1,4結合で連なっており、グルコースがそれぞれ6、7、8個からなる -CD、 -CD、 -CDが良く知られている。CDは環の外部は親水性を示し、内部は疎水性を示す、きわめて特異な物質である。CDはこの空洞内に酸やアミンのような有極性イオン物質から無極性の脂肪族あるいは芳香族の炭化水素や希ガスまで、様々な物質を取り込んで包接複合体を形成することができる。この包接機能を利用して環内に包接された物質の安定性の向上、物質の改変、異臭・異味の除去等を目的として、CDは食品、化粧品、医薬品、繊維、建材などの幅広い分野で使用されている。

【0003】最近では、CDの溶解度の向上、あるいは人や動物に対する安全性を高めることを目的として、CDにグルコシル基やマルトシル基などを結合させた分岐CDが合成されている。さらに、酵素の糖転移反応及び/又は縮合反応を利用してCDの水酸基にガラクトシル基、マンノシル基、N-アセチルグルコサミニル基が結合している分岐CDや、分岐CDの側鎖の水酸基にガラクトシル基、マンノシル基、N-アセチルグルコサミニル基が結合している分岐CD等も開発されている。

【0004】 -CD及びこれらの分岐 -CDは、多様なCDの中でも比較的安価であることから、最も利用されているCDである。従来知られている -CDの定量法としては、目的とする検体をホモジネートし、脂質やタンパク質などの不要成分を除去した後、検体に含まれる -CDを液体クロマトグラフィーにて定量する方法がある。しかし、この方法は操作が繁用である上に、時間がかかり、さらに検体をブレンダーなどで破壊してしまうため、検体中の -CDの分布状態を検出するこ

とができない。また、検体中に -CDが微量にしか存在しない場合には、この方法で -CDを検出することは不可能である。

【0005】この問題を解決するために、本発明者らは先に -CDに対するポリクローナル抗体を作成し、この抗体を用いて -CDを検出する方法を開発した。しかし、ポリクローナル抗体は種々のエピトープを認識する抗体の混合物であり、さらにポリクローナル抗体は免疫動物の血清から採取するため、大量に同品質のものを作成することが不可能であり、再現性が乏しい。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、 -CD及び/又は分岐 -CDを認識するモノクローナル抗体並びに該抗体を産生するハイブリドーマを提供することである。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】請求項1記載の本発明は、下記の性質を有するモノクローナル抗体である。

- (1) 免疫グロブリンの種類：IgM
- (2) 分子量：970,000(ゲルろ過法による)
- (3) -サイクロデキストリン及び分岐 -サイクロデキストリンと反応するが、置換 -サイクロデキストリン及びマルトオリゴ糖とは反応しない。

請求項2記載の本発明は、ハイブリドーマA7(FERM P-17628)が産生するモノクローナル抗体である。請求項3記載の本発明は、クラスIgMに属し、 -サイクロデキストリン及び分岐 -サイクロデキストリンと反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマである。請求項4記載の本発明は、ハイブリドーマが、ハイブリドーマA7(FERM P-17628)である請求項3記載のハイブリドーマである。請求項5記載の本発明は、請求項1又は2記載のモノクローナル抗体を含むことを特徴とする -サイクロデキストリン及び/又は分岐 -サイクロデキストリンの検出剤である。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明に係るモノクローナル抗体は、 -CDを結合させたタンパク質を抗原として免疫した哺乳動物の免疫細胞と哺乳動物の骨髄腫細胞との融合細胞を培養し、培養物から目的とするハイブリドーマをスクリーニングし、モノクローン化することによって

得られる。免疫抗原としては、分岐 - C D を結合させたタンパク質を使用し、例えば N - アセチルグルコサミニル - - C D (以下、 GlcNAc - - C D と略記する。) をアルカリ条件下にて脱アセチル化した 6 - O - D - N - グルコサミニル - - C D (以下、 GlcN - - C D と略記する。) を牛血清アルブミン (以下、 B S A と略記する。) に結合させた B S A - GlcN - - C D や GlcN - - C D をオボアルブミン (以下、 O V A と略記する。) に結合させた O V A - GlcN - - C D 、または N - アセチルグルコサミニル - マルトシル - - C D (以下、 GlcNAc-G2- - C D と略記する。) をアルカリ条件下にて脱アセチル化した N - グルコサミニル - マルトシル - - C D (以下、 GlcN-G2- - C D と略記する。) を B S A に結合させた B S A - G2-GlcN - - C D や GlcN-G2- - C D を O V A に結合させた O V A - G2-GlcN - - C Dなどを挙げることができる。

【0009】一方、免疫動物としては、一般的にマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジなどが用いられるが、特に免疫グロブリンを產生しない腫瘍細胞株の確立されている BALB/c マウスが好適である。抗原溶液は、生理食塩水あるいは緩衝溶液などに溶解し、若しくは該溶液エマルジョンとして、免疫動物のマウス又はラット 1 匹あたり 1 回に 50 ~ 500 μg 程度投与するのが好ましい。

【0010】免疫は数回に分けて行うのがよく、初回の免疫はアジュバンドと共に行うのが一般的である。アジュバンドとして、例えばフロイントアジュバンド結核死菌、核酸、ミョウバン、合成アジュバンド( タイターマックス )などを用いることができ、抗原溶液は、腹腔内あるいは静脈内に投与するのが普通である。投与回数は 30 任意で、何回でもよく、必要に応じて適当な間隔で投与する。免疫動物の抗体価が上昇したら、最終免疫より 3 ~ 10 日後に該動物の抗体产生細胞を採取する。

【0011】抗体产生細胞としては、リンパ節あるいは脾臓から分離した細胞が使用できるが、特に脾臓から分離したものが好ましい。また、細胞融合時に使用する細胞としては、多くの哺乳動物細胞株が使用できるが、抗体产生細胞の調製に用いた動物と同種の動物細胞株が好ましい。例えば、マウスの骨髄腫細胞としては、 SP2/V-Ag14, P3-Ns1/1-Ag4-1, PuBu1-Ou, P3-X63-Ag8-U1, X63-Ag8, X63-Ag8-6.5.3, MPC11-45.6.TG.1.7 などがある。

【0012】細胞の融合は、抗体产生細胞と骨髄腫細胞とを適当な個数及び割合で混合し、 H V J ( センダイウイルス ) やポリエチレングリコールを用いて行うことができる。また、電気パレスを用いる電気融合法を採用することも可能である。この操作によって生じたハイブリドーマは、ヒポキサンチン、アミノブテリン及びチミジンを含む H A T 培地中で生育する。一方、融合しなかった抗体产生細胞や骨髄腫細胞は共に死滅し、ハイブリドーマだけが個々のクローニングから増殖してくる。ハイブリ

ドーマのスクリーニングは、酵素免疫測定法によって行うことができる。すなわち、アミノプレートに吸着させた GlcN - - C D と、培養したハイブリドーマの培養上清を反応させた後、洗浄し、適当に希釈した酵素標識抗マウス Ig 抗体を加え、さらに洗浄後、適当な基質を加えて反応させることにより、 - C D と反応する抗体を產生するハイブリドーマを選択することができる。

【0013】選択したハイブリドーマをモノクローナル化する方法としては、 F A C S ( Fluorescent Activated Cell Sorter ) を用いる方法や軟寒天中培養法 ( Soft Agar Culture ) 等による方法があるが、フィーダー細胞としてのマウス胸腺細胞やハイブリドーマ増殖因子などを用いて、限界希釈法に数度かけることによりモノクローナル化することが好ましい。

【0014】このような工程を経て得られたハイブリドーマを用いて、本発明に係るモノクローナル抗体を作成する方法としては、 in vitro 法、 in vivo 法のいずれでもよいが、 in vivo 法の方が抗体価が高いので望ましい。このようにして得られたモノクローナル抗体を用いて免疫学的測定法を実施すれば、 - C D 及び / 又は分岐 - C D を簡便、迅速、かつ高感度に検出、定量することができる。

【0015】本モノクローナル抗体を適用することのできる免疫学的測定法としては、特に限定されないが、例えばモノクローナル抗体と不溶性担体に吸着させた - C D 及び / 又は分岐 - C D を用いた競合 E L I S A 法などがある。本モノクローナル抗体が特異的に認識する分岐 - サイクロデキストリンとしては、例えばグルコシル - C D ( 以下、 G1- -CD と略記する。 ) 、マルトシル - C D ( 以下、 G2- -CD と略記する。 ) 、ガラクシル - C D ( 以下、 Gal- -CD と略記する。 ) 、マンノシル - C D ( 以下、 Man- -CD と略記する。 ) 、グルクロニル - グルコシル - C D ( 以下、 GU-G- -CD と略記する。 ) 、 N - アセチルグルコサミニル - C D ( 以下、 GlcNAc- -CD と略記する。 ) 、グルコサミニル - C D ( 以下、 GlcN- -CD と略記する。 ) 、 N - アセチルグルコサミニル - マルトシル - C D ( 以下、 GlcNAc-G2- -CD と略記する。 ) などを挙げることができる。

【0016】

【実施例】以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例 1

GlcNAc-G2- - C D は、特開平 8 - 325304 号公報に記載の方法に従い合成した。すなわち、分岐 C D と N - アセチルキトオリゴ糖を含有する溶液に、 N - アセチルグルコサミニル基転移酵素を作用させることによって合成した。 10 g の GlcNAc-G2- - C D を 10 % 水酸化ナトリウム水溶液中に溶解させ、 80 度で 15 時間反応させた。反応終了後、濃塩酸を滴下することにより中和

させ、中和により生じた塩は、蒸留水で平衡化した逆相カラム (YMC PACK AQ-303) を用いて除去した。

【0017】次に、30%エタノール水溶液で樹脂に吸着したGlcN-G2- $\beta$ -CDを溶出させ、濃縮後、凍結乾燥を行った。これを100mgのBSA(分子量67,000)及び1gのGlcN-G2- $\beta$ -CDを50mMのテトラメチルエチレンジアミン溶液10mlに溶解させ、塩酸にてpHを4.75に調整した。氷冷下にて1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを200mg添加し、室温にて24時間反応させた。反応液は分画分子量50,000の限外濾過膜を用いて未反応の試薬を除去した後、凍結乾燥を行い、最終的に約150mgのBSA-GlcN-G2- $\beta$ -CDが得られた。

【0018】精製したBSA-GlcN-G2- $\beta$ -CD 500μgを合成アジュバンド(タイターマックス)と共にBALB/cマウスの腹腔内に投与することにより免疫した。2週間後、再度同様にして免疫を行い、さらに3週間後、同様にして最終免疫を行った。最終免疫3日後にマウスから脾臓を摘出し、骨髄腫細胞(SP2)とポリエチレングリコール-1500により細胞融合を行った。これをHAT培地で3週間培養した後、上清中の抗体を検定し、抗体産生ハイブリドーマA7を限界希釈法によ\*

\*リスクリーニングした。

【0019】このハイブリドーマA7は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、その受託番号はFERM P-17628である。得られたハイブリドーマA7を培養し、マウス腹腔に投与し、2週間後に腹水を採取し、Protein-Aを用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した。スクリーニングの各段階にてGlcN-G2- $\beta$ -CDのみに高い親和性を示す画分を選択することにより、モノクローナル抗体を取得した。このようにして得られたモノクローナル抗体は以下の性質を有する。

【0020】免疫グロブリンの種類：IgM

分子量：970,000(ゲルろ過法による)

また、ELISAによって確認したハイブリドーマA7が産生するモノクローナル抗体の反応性を表1に示した。本モノクローナル抗体は、 $\beta$ -CD及び分岐 $\beta$ -CDと反応したが、置換 $\beta$ -CDやマルトオリゴ糖とは反応しなかった。

【0021】

20 【表1】表1 ハイブリドーマA7の産生するモノクローナル抗体の反応特異性

拮抗物質	B/B050%( $\mu$ M)	相対値	CR(%)
$\beta$ -CD	0.25	1.0	100.0
$\alpha$ -CD	3.01	12.0	8.3
$\gamma$ -CD	>200	>500	<0.1
分岐 $\beta$ -CD			
G1- $\beta$ -CD	0.36	1.4	69.4
G2- $\beta$ -CD	0.57	2.3	43.9
Gal- $\beta$ -CD	0.41	1.6	61.0
Man- $\beta$ -CD	0.68	2.7	36.8
GUG- $\beta$ -CD	0.31	1.2	80.6
GlcN- $\beta$ -CD	0.56	2.2	44.6
GlcNAc- $\beta$ -CD	0.98	3.9	25.5
GlcN-G2- $\beta$ -CD	0.63	2.5	39.7
置換 $\beta$ -CD			
Heptakis(2-O-methyl) $\beta$ -CD	>500	>2,000	<0.1
Heptakis(3-O-methyl) $\beta$ -CD	>500	>2,000	<0.1
Heptakis(2,3-di-O-methyl) $\beta$ -CD	>500	>2,000	<0.1
Heptakis(2,6-di-O-methyl) $\beta$ -CD	>500	>2,000	<0.1
Heptakis(2,3,6-tri-O-methyl) $\beta$ -CD	>500	>2,000	<0.1
直鎖オリゴ糖			
maltotriose	>500	>2,000	<0.1
maltotetraose	445	1,780	<0.1
maltpentaose	38	153	0.7
maltohexaose	15	62	1.6
maltoheptaose	16	63	1.6

B : 各拮抗物質の50% 拮抗濃度における吸光度(450nm)の測定値

B0 : 各拮抗物質の0 μMにおける吸光度(450nm)の測定値

B/B050% : 各拮抗物質による50% 拮抗濃度

相対値 :  $\beta$ -CD の50% 拮抗濃度を1とした値

CR(%) :  $\beta$ -CD の50% 拮抗濃度 / 各拮抗物質の50% 拮抗濃度 × 100

【0022】

50 【発明の効果】本発明により、 $\beta$ -CD及び分岐 $\beta$ -C

Dを特異的に認識するモノクローナル抗体及び該モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマA7が提供される。本発明のモノクローナル抗体を用いれば、これらを

微量に、あるいは不純物を含むような検体から - C D や分岐 - C D を簡便、かつ正確に測定することが可能である。

### フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> 識別記号  
G 0 1 N 33/577

F I テ-マコ-ト<sup>®</sup> (参考)  
C 1 2 N 5/00 B

(72) 発明者 中西 勝義  
神奈川県横浜市大黒町13-46 株式会社横浜国際バイオ研究所内  
(72) 発明者 藤田 孝輝  
神奈川県横浜市大黒町13-46 株式会社横浜国際バイオ研究所内  
(72) 発明者 原 耕三  
神奈川県横浜市大黒町13-46 株式会社横浜国際バイオ研究所内  
(72) 発明者 橋本 博之  
大阪府三島郡島本町水無瀬2-8-2-404号

(72) 発明者 長束 俊治  
京都府向日市上植野町車返8-10 向日合同宿舎4-201  
(72) 発明者 伊倉 宏司  
京都府長岡京市泉が丘24-8  
F ターム(参考) 4B024 AA11 BA50 BA77 GA03 GA08  
GA09 GA18  
4B064 AG27 BA17 CA10 CA20 CC24  
CE10 DA10 DA13  
4B065 AA90X AA90Y AB04 AB05  
AC14 AC15 BA08 CA25 CA46  
4H045 AA11 AA30 BA10 CA41 DA76  
EA01 FA71 GA22 HA06

专利名称(译)	单克隆抗体和产生抗体的杂交瘤		
公开(公告)号	<a href="#">JP2001204465A</a>	公开(公告)日	2001-07-31
申请号	JP2000013833	申请日	2000-01-24
[标]申请(专利权)人(译)	横滨国际生物研究 塩水港精糖株式会社		
申请(专利权)人(译)	有限公司横滨国际生物研究 塩水港精糖株式会社		
[标]发明人	伊藤哲也 中西勝義 藤田孝輝 原耕三 橋本博之 長束俊治 伊倉宏司		
发明人	伊藤 哲也 中西 勝義 藤田 孝輝 原 耕三 橋本 博之 長束 俊治 伊倉 宏司		
IPC分类号	C12N15/02 C07K16/44 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/577		
F1分类号	C07K16/44 C12P21/08 G01N33/53.S G01N33/577.B C12N15/00.C C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/16 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA50 4B024/BA77 4B024/GA03 4B024/GA08 4B024/GA09 4B024/GA18 4B064 /AG27 4B064/BA17 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE10 4B064/DA10 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB04 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/AC15 4B065/BA08 4B065 /CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA01 4H045/FA71 4H045/GA22 4H045/HA06		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

## 摘要(译)

要解决的问题：提供识别β-CD和/或分支β-CD的单克隆抗体，以及产生该抗体的杂交瘤。具有以下特性的单克隆抗体。（1）免疫球蛋白的类型：IgM（2）分子量：970,000（通过凝胶过滤法）（3）与β-环糊精和支链β-环糊精反应，但不与取代的β-环糊精和麦芽低聚糖反应。