

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6913631号
(P6913631)

(45) 発行日 令和3年8月4日 (2021. 8. 4)

(24) 登録日 令和3年7月14日 (2021. 7. 14)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 P 21/00 (2006. 01)	C 1 2 P 21/00 Z
C 1 2 P 21/08 (2006. 01)	C 1 2 P 21/08
C O 7 K 14/705 (2006. 01)	C O 7 K 14/705
C O 7 K 16/28 (2006. 01)	C O 7 K 16/28
C 1 2 N 15/06 (2006. 01)	C 1 2 N 15/06 1 0 0
請求項の数 14 (全 18 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2017-543587 (P2017-543587)	(73) 特許権者	390037327
(86) (22) 出願日	平成28年9月29日 (2016. 9. 29)		積水メディカル株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2016/078901		東京都中央区日本橋二丁目1番3号
(87) 国際公開番号	W02017/057622	(74) 代理人	110000084
(87) 国際公開日	平成29年4月6日 (2017. 4. 6)		特許業務法人アルガ特許事務所
審査請求日	令和1年9月26日 (2019. 9. 26)	(72) 発明者	海老沼 宏幸
(31) 優先権主張番号	特願2015-191707 (P2015-191707)		東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水
(32) 優先日	平成27年9月29日 (2015. 9. 29)		メディカル株式会社内
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)	(72) 発明者	藤村 建午
			東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水
			メディカル株式会社内
微生物の受託番号	NPMD NITE BP-02124	審査官	山本 晋也
微生物の受託番号	NPMD NITE BP-02125		
微生物の受託番号	NPMD NITE BP-02123		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 免疫測定用抗体とその作製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

S C C - 3 細胞を培養すること；及び

該細胞の培養物から可溶性インターロイキン 2 レセプターを回収すること、
を含む、可溶性インターロイキン 2 レセプターの製造方法。

【請求項 2】

S C C - 3 細胞を培養して可溶性インターロイキン 2 レセプターを調製すること；及び

該可溶性インターロイキン 2 レセプターで動物（ヒトを除く）を免疫すること、
を含む、抗可溶性インターロイキン 2 レセプター抗体の製造方法。

【請求項 3】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記免疫した動物から採取した脾臓細胞又はリンパ節由来 B 細胞と骨髓腫細胞とのハイ
ブリドーマを作製することをさらに含む、請求項 2 又は 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記 S C C - 3 細胞をインフルエンザウイルス刺激する工程を含まない、請求項 2 ~ 4
のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

S C C - 3 細胞を培養して可溶性インターロイキン 2 レセプターを調製すること；

該可溶性インターロイキン 2 レセプターで動物（ヒトを除く）を免疫すること；及び

10

20

該免疫した動物から採取した脾臓細胞又はリンパ節由来B細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合すること、
を含む、抗可溶性インターロイキン2レセプター抗体産生ハイブリドーマの製造方法。

【請求項7】

92212(NITE BP-02124)及び92215R(NITE BP-02125)からなる群より選択される可溶性インターロイキン2レセプター抗体産生ハイブリドーマ。

【請求項8】

請求項7記載の可溶性インターロイキン2レセプター抗体産生ハイブリドーマを培養することによって得られたことを特徴とする、抗可溶性インターロイキン2レセプター抗体

10

【請求項9】

モノクローナル抗体である、請求項8記載の抗体。

【請求項10】

請求項8記載の抗可溶性インターロイキン2レセプター抗体を用いることを特徴とする、ヒト可溶性インターロイキン2レセプターの免疫測定方法。

【請求項11】

エピトープが異なる2種類のモノクローナル抗可溶性インターロイキン2レセプター抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法である、請求項10記載の免疫測定方法。

【請求項12】

20

前記サンドイッチ免疫測定法が、ラテックス免疫比濁法である、請求項11記載の免疫測定方法。

【請求項13】

請求項8記載の抗可溶性インターロイキン2レセプター抗体を含む、ヒト可溶性インターロイキン2レセプター測定用試薬。

【請求項14】

ラテックス免疫比濁法を行うための試薬である、請求項13記載の試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、抗可溶性インターロイキン2レセプター抗体、及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

可溶性インターロイキン2レセプター(以下、sIL-2Rと記す)は、T細胞の細胞膜蛋白質であるIL-2Rのα鎖が切り離されることで生成される可溶性形態のIL-2Rであり、生体の血中に存在する。sIL-2Rは、IL-2との結合性を保持していること、及び免疫反応が活性化する感染症や各種疾患の患者において血中濃度が上昇することから、個体の免疫活性化を反映する指標として考えられている。臨床的には、sIL-2Rは、悪性リンパ腫の診断及び経過の観察のためのマーカーとして利用されている。

【0003】

40

従来、sIL-2Rを測定する方法としては、異なるエピトープに対する2種類のモノクローナル抗sIL-2R抗体を用いた酵素結合免疫吸着法(ELISA法)又は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA法)を原理とした測定試薬が開発され、体外診断薬として販売されている。しかしながら、ELISA法は、操作が煩雑な上に測定に長時間を要することが問題とされ、一方CLEIA法は、専用の測定装置が必要であるという欠点を有する。したがって、簡単、迅速かつ汎用の自動分析装置に適用可能なsIL-2R免疫測定用試薬の開発が望まれている。

【0004】

さらに、より高精度なsIL-2Rの測定のためには、抗体の特性、抗体と固相担体との相性、及び抗体の非特異反応を制御して、より特異性の高いsIL-2R免疫測定用試

50

薬を開発する必要がある。免疫測定用試薬の開発効率向上のためには、候補となる抗 s I L - 2 R モノクローナル抗体の選択肢をできるだけ広く獲得することが望ましい。そのためには、さまざまな由来の s I L - 2 R を免疫原として、それぞれ必要量の s I L - 2 R をできるだけ多く確保することが求められる。また s I L - 2 R は、測定した s I L - 2 R の定量のための標準品としても重要である。したがって、抗 s I L - 2 R 抗体を作製する際の免疫原の供給源、あるいは s I L - 2 R 定量解析のための標準品の供給源として使用できる、大量かつ簡便に s I L - 2 R を供給することができる供給源が求められている。

【 0 0 0 5 】

従来の抗 s I L - 2 R 抗体の作製方法に関しては、ヒト血液から採取された末梢血液単核細胞 (P B M C) をインフルエンザウイルスで刺激し、それを免疫原として抗体を得る方法が報告されている (特許文献 1) 。しかしながら、ヒト血液由来 P B M C は大量に確保することが困難であることから、この方法で試薬開発に必要な量の免疫原を得ることは容易ではない。別の抗 s I L - 2 R 抗体の作製方法として、リンパ腫細胞株等の I L - 2 R を発現している細胞そのものを免疫原とする方法が報告されている (特許文献 2 、 3) 。しかしながら、この方法は、予め細胞表面における抗体の発現を確認するため、操作が非常に煩雑である上に、これを免疫原として得られた抗体が細胞外に切り出された s I L - 2 R に反応することが保障されているものではない。また、非特許文献 1 には、いくつかのリンパ腫細胞株が s I L - 2 R を分泌することが記載されているが、その濃度は非常に少なく、抗体作製の免疫原とするには不適である。一方、非特許文献 2 には、単球性の非ホジキン性リンパ腫細胞株である S C C - 3 が細胞表面に I L - 2 R を発現することが報告されているが、この細胞の s I L - 2 R 分泌に関する報告はない。

【 0 0 0 6 】

目的蛋白質に対する抗体作製に用いられる抗原として、目的蛋白質のリコンビナント蛋白質も一般的に用いられている。しかしながら、リコンビナント抗原で免疫して作製したモノクローナル抗体においては、検体中に含まれている n a t i v e な目的蛋白質への反応性が得られないことや弱いことをしばしば経験する。この現象は、リコンビナント蛋白質が n a t i v e な蛋白質の部分配列しか含まないこと、又は、たとえ全長配列を含む場合であっても蛋白質の折り畳みの違いによる立体構造変化を有すること、などに起因すると推測されている。さらに、リコンビナント蛋白質による免疫で n a t i v e な目的蛋白質に反応する複数種の抗体が作製できた場合でも、該複数種の抗体間で抗原決定配列が近傍に偏ることにより、免疫測定に必要な異なるエピトープに対する 2 種類のモノクローナル抗体の選択肢は極端に減少する。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 特開昭 6 2 - 7 0 7 6 1 号公報

【 特許文献 2 】 特開昭 6 1 - 5 6 0 8 3 号公報

【 特許文献 3 】 特開平 2 - 1 7 1 1 9 9 号公報

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 B l o o d . 2 0 1 1 ; 1 1 8 , 2 8 0 9 - 2 8 2 0

【 非特許文献 2 】 J p n . J . C a n c e r R e s . 1 9 8 6 ; 7 7 , 8 6 2 - 8 6 5

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

本発明は、抗体作製に必要な量の s I L - 2 R 抗原を効率よく製造する方法、該抗原を用いた抗 s I L - 2 R 抗体の製造方法、及び該抗体を用いた s I L - 2 R 免疫測定用試薬の提供に関する。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 0 】

本発明者らは、非ホジキン性リンパ腫患者由来ヒト単球細胞である S C C - 3 細胞が大量の s I L - 2 R を分泌すること、ならびに、S C C - 3 細胞から分泌される s I L - 2 R の形状がヒト血中に存在する s I L - 2 R と一致し、かつリコンビナント s I L - 2 R とは一致していないことから、該細胞が免疫原として利用する s I L - 2 R の生産に極めて好適であることを見出した。さらに本発明者らは、S C C - 3 細胞から分泌された s I L - 2 R を免疫原として抗体を作製することにより、s I L - 2 R 免疫測定のための 2 種類のモノクローナル抗体の組み合わせの選択肢を多く確保することができることを見出した。

【 0 0 1 1 】

すなわち、本発明は、次の〔 1 〕～〔 1 3 〕を提供するものである。

〔 1 〕 S C C - 3 細胞を培養すること；及び

該細胞の培養物から可溶性インターロイキン 2 レセプターを回収すること、を含む、可溶性インターロイキン 2 レセプターの製造方法。

〔 2 〕 S C C - 3 細胞を培養して可溶性インターロイキン 2 レセプターを調製すること；及び

該可溶性インターロイキン 2 レセプターで動物を免疫すること、を含む、抗可溶性インターロイキン 2 レセプター抗体の製造方法。

〔 3 〕 前記抗体がモノクローナル抗体である、〔 2 〕記載の方法。

〔 4 〕 前記免疫した動物から採取した脾臓細胞又はリンパ節由来 B 細胞と骨髓腫細胞とのハイブリドーマを作製することをさらに含む、〔 2 〕又は〔 3 〕記載の方法。

〔 5 〕 前記 S C C - 3 細胞をインフルエンザウイルス刺激する工程を含まない、〔 2 〕～〔 4 〕のいずれか 1 項記載の方法。

〔 6 〕 S C C - 3 細胞を培養して可溶性インターロイキン 2 レセプターを調製すること；該可溶性インターロイキン 2 レセプターで動物を免疫すること；及び

該免疫した動物から採取した脾臓細胞又はリンパ節由来 B 細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合すること、

を含む、抗可溶性インターロイキン 2 レセプター抗体産生ハイブリドーマの製造方法。

〔 7 〕 9 2 2 1 2 (N I T E B P - 0 2 1 2 4) 及び 9 2 2 1 5 R (N I T E B P - 0 2 1 2 5) からなる群より選択される可溶性インターロイキン 2 レセプター抗体産生ハイブリドーマ。

〔 8 〕 S C C - 3 細胞に産生された可溶性インターロイキン 2 レセプターで動物を免疫することによって得られたことを特徴とする、抗可溶性インターロイキン 2 レセプター抗体。

〔 9 〕 モノクローナル抗体である、〔 8 〕記載の抗体。

〔 1 0 〕 〔 2 〕～〔 5 〕のいずれか 1 項記載の方法で製造された抗可溶性インターロイキン 2 レセプター抗体を用いることを特徴とする、ヒト可溶性インターロイキン 2 レセプターの免疫測定方法。

〔 1 1 〕 エピトープが異なる 2 種類のモノクローナル抗可溶性インターロイキン 2 レセプター抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法である、〔 1 0 〕記載の免疫測定方法。

〔 1 2 〕 前記サンドイッチ免疫測定法が、ラテックス免疫比濁法又はサンドイッチ E L I S A である、〔 1 1 〕記載の免疫測定方法。

〔 1 3 〕 〔 2 〕～〔 5 〕のいずれか 1 項記載の方法で製造された抗可溶性インターロイキン 2 レセプター抗体を含む、ヒト可溶性インターロイキン 2 レセプター測定用試薬。

〔 1 4 〕 ラテックス免疫比濁法又はサンドイッチ E L I S A を行うための試薬である、〔 1 3 〕記載の試薬。

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

本発明によれば、抗体作製に必要な量の s I L - 2 R 抗原を効率よく提供することが可能になる。したがって、本発明によれば、より効率よい抗 s I L - 2 R 抗体作製が可能に

10

20

30

40

50

なるため、s I L - 2 R 免疫測定に好適な 2 種類のモノクローナル抗 s I L - 2 R 抗体の組み合わせの選択肢をより多く提供することができる。さらに本発明によれば、抗 s I L - 2 R 抗体の特異性評価のための基質又は s I L - 2 R 定量解析のための標準品として使用することができる s I L - 2 R を大量に提供することができる。したがって、本発明は、効率のよい s I L - 2 R 免疫測定用試薬の開発を可能にする。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【図 1】S C C - 3 細胞由来 s I L - 2 R とリコンビナント s I L - 2 R の電気泳動解析結果。A : S C C - 3 細胞由来 s I L - 2 R、B - C : 市販リコンビナント s I L - 2 R

10

。【図 2】S C C - 3 細胞株由来 s I L - 2 R とリコンビナント s I L - 2 R のゲル濾過クロマトグラフィー解析結果。

【図 3】本発明の抗体を用いた L T I A 法によるヒト血清検体中 s I L - 2 R 濃度の測定結果と市販キットを用いた測定結果の相関。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 4 】

本発明は、S C C - 3 細胞から s I L - 2 R を製造する方法、及び、当該方法で得られた s I L - 2 R を免疫原として抗 s I L - 2 R 抗体を製造する方法を提供する。

【 0 0 1 5 】

本発明の s I L - 2 R の製造方法は、S C C - 3 細胞を培養すること、及び該細胞の培養物から可溶性インターロイキン 2 レセプターを回収することを含む。したがって、本発明の s I L - 2 R の製造方法は、より詳細にはヒト s I L - 2 R の製造方法である。上記本発明の方法に用いられる S C C - 3 細胞は、独立行政法人医薬基盤研究所 J C R B (Japanese Collection of Research Bioresources) 細胞バンクから入手することができる (細胞番号 J C R B 0 1 1 5 ; http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/en/search_res_det.cgi?ID=285 参照) 。

20

【 0 0 1 6 】

上記本発明の方法において、S C C - 3 細胞の培養は、当該分野で一般的な方法に従って行うことができる。ヒト末梢血液単核細胞 (P B M C) の場合と異なり、本発明の方法においては、培養前又は培養中の細胞に対してインフルエンザウイルス、コンカナバリン A (C o n A)、フィトヘムアグルチニン (P H A) 等による s I L - 2 R を分泌させるための刺激を与える必要はない。培養のための培地としては、上記 J C R B 細胞バンクで推奨されている 1 0 % F B S 含有 R P M I - 1 6 4 0 培地が好ましい。あるいは、培養上清に分泌された s I L - 2 R を精製する際に培地中に添加した F B S の影響を無くす目的で、F B S 不含 R P M I - 1 6 4 0 培地を用いることも可能である。培養条件としては、3 7 °C、5 % C O ₂ 下で 1 ~ 7 日間が好ましい。上記手順で培養した S C C - 3 細胞の培養物中には、該細胞から分泌された s I L - 2 R が含有されている。したがって、該培養物、例えば、細胞を除いた培養液又は培養上清から s I L - 2 R を回収することができる。あるいは、該培養物から分離した細胞の溶解液から s I L - 2 R を回収することも可能である。さらに、上記培養液又は培養上清と上記細胞溶解液との両方から s I L - 2 R を回収してもよい。上記培養液又は培養上清から回収する方法が、簡便かつ効率的であるため好ましい。

30

40

【 0 0 1 7 】

回収した s I L - 2 R は、そのまま免疫原として用いてもよいが、好ましくは精製される。精製は、当該分野で通常使用される蛋白質精製手段に従って行えばよい。精製手段の例としては、これらに限定されないが、限外濾過、電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティー精製などが挙げられ、このうちアフィニティー精製が好ましい。

【 0 0 1 8 】

上記本発明の s I L - 2 R の製造方法は、s I L - 2 R の生産性が高く、インフルエン

50

ザウイルス刺激したヒトPBM Cに生産させる従来の方法（例えば特許文献1）と比べて多量のs I L - 2 Rを確保できる。したがって、本発明のs I L - 2 Rの製造方法は、抗s I L - 2 R抗体作製用の免疫原として使用するs I L - 2 Rを提供するための非常に優れた手段であり、また、s I L - 2 Rの定量解析用の標準品の提供手段としても非常に有用である。

【0019】

本発明の抗s I L - 2 R抗体の製造方法においては、上記の手順でS C C - 3細胞から得られたs I L - 2 Rが免疫原として用いられる。当該方法においては、上記手順で調製されたs I L - 2 Rを免疫原として動物を免疫する。好ましくは、当該方法においては、上記手順でS C C - 3細胞の培養物から回収し、精製された精製s I L - 2 Rを免疫原として動物を免疫する。あるいは、当該方法においては、該S C C - 3細胞培養物から回収された未精製s I L - 2 Rを免疫原として動物を免疫してもよい。またあるいは、当該方法においては、該S C C - 3細胞培養物、その培養液若しくは培養上清、又は該培養物から分離された細胞自体を免疫原として動物を免疫してもよい。

10

【0020】

本発明の抗s I L - 2 R抗体の製造方法は、ポリクローナル抗体の製造にもモノクローナル抗体の製造にも適用可能である。当該ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体はいずれも、上記免疫原で免疫した動物から、当該分野で周知の方法に従って製造することができる。

【0021】

20

例えば、ポリクローナル抗体は、上記免疫原で動物を免疫し、次いで該動物から抗血清を採取することにより製造される。必要に応じて、さらに該抗血清からポリクローナル抗体を精製してもよい。免疫する動物としては、限定されないが、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリなどが挙げられる。

【0022】

モノクローナル抗体は、公知のモノクローナル抗体作製方法、例えば、長宗香明、寺田弘共著、「単クローン抗体」廣川書店（1990年）や、Jame W. Golding, "Monoclonal Antibody", 3rd edition, Academic Press, (1996年)に記載された方法に従って製造することができる。より詳細には、モノクローナル抗体は、上記免疫原で動物を免疫し、次いで該動物から採取した抗体産生細胞から目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製することにより製造される。免疫する動物としては、限定ではないが、マウス、ラットなどが挙げられる。

30

【0023】

ポリクローナル抗体を製造する場合及びモノクローナル抗体を製造する場合のいずれにおいても、上記動物の免疫は、当該分野で一般的な手法に従って行うことができる。該免疫のための免疫原には、上述したS C C - 3細胞培養物、その培養液若しくは培養上清、該培養物から分離された細胞、該培養物から回収された未精製s I L - 2 R、精製s I L - 2 R、又はそれらのいずれか2種以上の混合物をそのまま用いてもよく、あるいはそれらを通常の緩衝液若しくは生理食塩水に懸濁させた液体の形態で用いてもよい。好ましくは、該免疫原は、免疫賦活効果を有する補液との混合物の形態であり得る。該免疫賦活効果を有する補液としては、完全若しくは不完全フロイントアジュバンドなどが挙げられる。該免疫原は、該動物の皮下、皮内、腹腔などに一回又は複数回投与されることが好ましい。該免疫原の投与量は、投与経路、動物種などに応じて適宜決定されるが、好ましい投与量は1回当たり10 μ g ~ 1mg程度である。

40

【0024】

モノクローナル抗体製造において、ハイブリドーマ作製に用いられる上記免疫された動物から採取した抗体産生細胞としては、最終免疫の3 ~ 4日後に該動物から摘出された脾臓細胞又はリンパ節由来B細胞が好適である。また、該抗体産生細胞と細胞融合させる骨髓腫細胞（以下、「ミエローマ細胞」という）としては、既に確立されている公知の各種

50

ミエローマ細胞株が好ましく、例えば、マウスにおけるNS1（例えば、P3/NSI/I-Ag4-1）[Eur. J. Immunol. 6:511-519(1976)]、SP2/O（例えば、SP2/O-Ag14）[Nature 276:269(1978)]、P3-X63-Ag8.653[J. Immunol. 123:1548(1979)]、P3-X63-Ag8U.1[Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81:1(1978)]等、及びラットにおけるY3-Ag1.2.3.[Nature 277:131-133(1979)]、YB2/O（例えば、YB2/3HL/P2.G11.16Ag.20）[Methods Enzymol. 73B:1(1981)]等が挙げられる。

【0025】

ハイブリドーマ作製における上記抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合には、通常用いられる方法、例えばポリエチレングリコール(PEG)法、センダイウイルス(HVJ)法などを使用することができる。細胞融合の手順は、通常の方法と同様である。例えば、PEG法の場合、上記ミエローマ細胞と、該ミエローマ細胞に対して約1~10倍(細胞数)の上記抗体産生細胞との混合ペレットに、平均分子量1000~6000のPEGを30~60%の濃度で滴下し、混合する。目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択には、通常の方法、例えばヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン(以下、「HAT」という)を含む培地を使用する。HAT培地で培養して得られたハイブリドーマを用いて、通常の方法、例えば希釈法により、目的抗体の産生株の検索及び単クローン化を行えばよい。目的抗体の産生株は、例えば酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、RIAなどにより、nativeなsIL-2Rに反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択することにより得られる。本発明により提供されるsIL-2R産生ハイブリドーマの例としては、92212(NITE BP-02124)及び92215R(NITE BP-02125)が挙げられる。

【0026】

上記通常の手順で作製した目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを培養し、次いで培養上清中の抗体を回収することで、目的のモノクローナル抗sIL-2R抗体を製造することができる。あるいは、該培養したハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与し、モノクローナル抗sIL-2R抗体を含む腹水を回収してもよい。

【0027】

本発明の抗sIL-2R抗体の製造方法において、上記手順で得られたモノクローナル又はポリクローナル抗sIL-2R抗体は、必要に応じてさらに単離又は精製されてもよい。抗体を単離又は精製する手段としては、従来公知の方法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAカラム等によるアフィニティー精製などが挙げられる。

【0028】

好ましくは、上記本発明の方法によって得られた抗sIL-2R抗体は、sIL-2Rに対する特異性を評価される。該特異性評価には、抗体特異性を調べる一般的方法、例えば免疫染色(ウエスタンブロット法)、ELISA、フローサイトメトリーなどを用いることができる。

【0029】

上記本発明の方法によって得られた抗sIL-2R抗体は、sIL-2Rの免疫測定のための抗体として好適に使用される。したがって、本発明はまた、上記本発明の方法によって得られた抗sIL-2R抗体を用いることを特徴とするsIL-2R免疫測定方法、及びそのための試薬を提供する。好ましくは、当該本発明の試薬は、ヒトsIL-2Rの免疫測定のための試薬であり、より詳細にはヒト血中sIL-2Rの免疫測定のための試薬である。また好ましくは、当該試薬は、免疫染色(ウエスタンブロット法)、ELISA、免疫比濁法(TIA)、ラテックス免疫比濁法(LTIA)、エンザイムイムノアッセイ(EIA)、化学発光イムノアッセイ(CLIA)、蛍光イムノアッセイ(FIA)などに基づくsIL-2Rの免疫測定を行うための試薬である。好ましくは、当該試薬は

、サンドイッチ免疫測定法に基づく s I L - 2 R 測定のための試薬である。例えば、当該試薬は、本発明の方法で得られた抗 s I L - 2 R 抗体と s I L - 2 R に親和性を有する物質とを用いたサンドイッチ E L I S A に基づく免疫測定用試薬である。また例えば、当該試薬は、本発明の方法で得られた、エピトープが異なる 2 種類のモノクローナル抗 s I L - 2 R 抗体を用いた L T I A 又はサンドイッチ E L I S A に基づく免疫測定用試薬である。

【 0 0 3 0 】

L T I A 又はサンドイッチ E L I S A に好適な、エピトープが異なる 2 種類のモノクローナル抗 s I L - 2 R 抗体は、本発明の方法で得られた 2 種類のモノクローナル抗 s I L - 2 R 抗体をそれぞれ固相抗体及び検出抗体として用いたサンドイッチ E L I S A 測定系を構築し、当該系での s I L - 2 R の検出感度を評価することによって選択することができる。

【 0 0 3 1 】

本発明で提供される s I L - 2 R 免疫測定用試薬は、本発明の方法で得られた抗 s I L - 2 R 抗体、好ましくは、本発明の方法で得られた、エピトープが異なる 2 種類のモノクローナル抗 s I L - 2 R 抗体を含有する。必要に応じて、当該試薬はさらに、該抗 s I L - 2 R 抗体を結合するための固相担体、該抗 s I L - 2 R 抗体を検出するための標識又は標識化抗体、各種緩衝液などを含有していてもよい。また必要に応じて、該抗 s I L - 2 R 抗体は、固相担体に結合されていてもよい。

【 0 0 3 2 】

上記本発明の s I L - 2 R の製造方法によって得られた s I L - 2 R は、s I L - 2 R の定量解析用の標準品としても用いることができる。該定量解析の方法としては、上述した抗 s I L - 2 R 抗体を用いた免疫染色、E L I S A、T I A、L T I A、E I A、C L I A、F I A、サンドイッチ免疫測定法などの免疫測定法に基づく定量解析が挙げられるが、これらに限定されない。より詳細には、本発明の s I L - 2 R の製造方法によって得られた s I L - 2 R から調製された既知濃度の s I L - 2 R 標準品の測定値を基準に、試験試料からの測定値を校正することで、試験試料中の s I L - 2 R 濃度を定量する。

【 実施例 1 】

【 0 0 3 3 】

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【 0 0 3 4 】

比較例 1 リコンビナント s I L - 2 R を免疫原としたモノクローナル抗体の作製

(1) 動物への免疫

R e c o m b i n a n t H u m a n s I L - 2 R e c e p t o r α (P e p r o t e c h 社製 ; C o d e : 2 0 0 - 0 2 R) を 1 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 2 ; 以下、P B S という) に溶解し、フロインド完全アジュバンドを等量混合してエマルジョン調製した。該エマルジョンを、メスの B A L B / c マウス及び F 3 4 4 / J c 1 ラットの皮下に 1 匹あたり 5 0 μ g / 回の量で 1 週間ごとに 5 回注射した。その後、該マウス及びラットの尾静脈より採血して得た抗血清中の抗体価を、後述する抗原固相化 E L I S A 法にて測定した。

【 0 0 3 5 】

(2) 血清抗体価の測定

上記 (1) で免疫抗原として用いた R e c o m b i n a n t H u m a n s I L - 2 R e c e p t o r α を 0 . 5 μ g / m L になるよう P B S に溶解した。該溶液 5 0 μ L を 9 6 穴マイクロプレートの各ウェルに分注して、室温で 1 時間静置した。次いで、各ウェルを 0 . 0 5 % T w e e n (登録商標) 2 0 を含む P B S (以下、P B S T という) 3 0 0 μ L で 3 回洗浄した後、1 % 牛血清アルブミンを含む P B S T (以下、B S A - P B S T という) 2 0 0 μ L を加え、室温で 1 時間ブロッキングを行った。さらに各ウェルを P B S T で 3 回洗浄した後、B S A - P B S T で数百倍から数万倍に希釈したマウス抗

血清 50 μ L を添加し、室温で 1 時間静置し、次いで P B S T で 3 回洗浄した。その後、マウス抗血清サンプルに対しては、7500 倍希釈した A n t i m o u s e I g G (H + L) G o a t I g G H R P (S o u t h e r n B i o t e c h 社製) 50 μ L を上記各ウェルに分注し、室温で 1 時間静置した。ラット抗血清サンプルに対しては、R e c o m b i n a n t H u m a n s I L - 2 R e c e p t o r α をウサギに免疫して作製したポリクローナル抗体 (自家作製) をビオチン標識し、B S A - P B S T で希釈した希釈液 (I g G 含量として 2 . 0 μ g / m L) を調製した。該希釈液 50 μ L を上記各ウェルに分注し、室温で 1 時間静置させ、P B S T で 3 回洗浄した後、H R P 標識ストレプトアビジン (P I E R C E 社製) の B S A - P B S T 溶液 (0 . 2 μ g / m L) 50 μ L を添加し、室温で 30 分間静置した。

10

【 0 0 3 6 】

次いで、各ウェルを P B S T で 3 回洗浄した後、0 . 2 % オルトフェニレンジアミン (O P D) 及び 0 . 0 2 % 過酸化水素を含むクエン酸緩衝液 (p H 5 . 0) 50 μ L を加え、室温で 10 分間放置後、7 . 7 % の硫酸 50 μ L を加えて酵素反応を停止させ、波長 492 nm における吸光度を測定し、抗体価を評価した。抗体価が十分に上昇していた抗血清を産生したマウス及びラットから脾臓又はリンパ節を摘出して脾臓細胞又はリンパ節由来細胞を調製し、ハイブリドーマ作製に用いた。

【 0 0 3 7 】

(3) ハイブリドーマ作製

上記 (2) で調製された脾臓細胞又はリンパ節由来細胞のいずれかとミエローマ細胞とを細胞数で 6 対 1 の比で混合し、ポリエチレングリコールを用いた常法により細胞融合を行った。ミエローマ細胞は S P 2 / O を用いた。得られた融合細胞は、脾臓細胞として 2 . 5 $\times 10^6$ c e l l s / m L になるようにヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン (H A T) 、ならびに 15 % ウシ胎児血清を含む R P M I 1 6 4 0 培地に懸濁した。該懸濁液 200 μ L を 96 穴マイクロプレートの各ウェルに分注し、C O₂ インキュベーター内で 37 、5 % C O₂ にて 7 日間培養して、融合細胞 (ハイブリドーマ) を得た。

20

【 0 0 3 8 】

(4) 抗 s I L - 2 R 抗体産生ハイブリドーマの作製

(i) マウス由来のハイブリドーマの選別

A f f i n i P u r e G o a t A n t i - m o u s e I g G (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s , C o d e : 1 1 5 - 0 0 5 - 0 7 1) を 10 μ g / m L になるよう P B S に溶解した。該溶液 50 μ L を 96 穴マイクロプレートの各ウェルに分注して、室温で 1 時間静置した。各ウェルを 300 μ L の P B S T で 3 回洗浄した後、200 μ L の B S A - P B S T を加え、室温で 1 時間ブロッキングを行った。次いで各ウェルを P B S T で 3 回洗浄した後、2 倍希釈したマウス細胞由来ハイブリドーマの培養上清 50 μ L を添加し、室温で 1 時間静置した。免疫用抗原である R e c o m b i n a n t H u m a n s I L - 2 R e c e p t o r α を B S A - P B S T にて希釈し、希釈液 (250 ng / m L) を調製した。上記各ウェルを P B S T で 3 回洗浄した後、該抗原希釈液 50 μ L を添加し、室温で 1 時間静置し、P B S T で 3 回洗浄した。R e c o m b i n a n t H u m a n s I L - 2 R e c e p t o r α をウサギに免疫して作製した抗 s I L - 2 R ウサギポリクローナル抗体を精製し、ビオチン標識して標識ポリクローナル抗体を調製し、B S A - P B S T にて希釈した (2 μ g / m L) 。該抗体希釈液 50 μ L を上記各ウェルに添加し、室温で 1 時間静置し、次いで P B S T で 3 回洗浄した後、H R P 標識ストレプトアビジン (P I E R C E 社製) の B S A - P B S T 溶液 (0 . 2 μ g / m L) 50 μ L を添加し、室温で 30 分間静置した。各ウェルを P B S T で 3 回洗浄した後、0 . 3 mg / m L のテトラメチルベンジジン (T M B) 及び 0 . 0 2 % 過酸化水素を含むクエン酸緩衝液 (p H 3 . 7) 50 μ L を加え、室温で 10 分間放置後、7 . 7 % の硫酸 50 μ L を加えて酵素反応を停止させ、波長 450 nm における吸光度を測定し、抗 s I L - 2 R 抗体産生ハイブリドーマの存在するウェル (陽性ウェル) を選別した。

30

40

50

【0039】

(ii) ラット由来のハイブリドーマの選別

AffiniPure Goat Anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Code: 112-005-008) を $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう PBS に溶解した。該溶液 $50 \mu\text{L}$ を 96 穴マイクロプレートの各ウェルに分注して、室温で 1 時間静置した。各ウェルを、 $300 \mu\text{L}$ の PBST で 3 回洗浄した後、 $200 \mu\text{L}$ の BSA-PBST を加え、室温で 1 時間ブロッキングを行った。次いで、各ウェルを PBST で 3 回洗浄した後、2 倍希釈したラット細胞由来ハイブリドーマの培養上清 $50 \mu\text{L}$ を添加し、室温で 1 時間静置した。免疫用抗原である Recombinant Human sIL-2 Receptor α を BSA-PBST にて希釈し、希釈液 ($250 \text{ ng}/\text{mL}$) を調製した。各ウェルを PBST で 3 回洗浄した後、該抗原希釈液 $50 \mu\text{L}$ を添加し、室温で 1 時間静置し、PBST で 3 回洗浄した。Biotylated Anti-human IL-2R α Goat Antibody (R&D systems 社製、Code: BAF223) を BSA-PBST で希釈した ($250 \text{ ng}/\text{mL}$)。該抗体希釈液 $50 \mu\text{L}$ を上記各ウェルに添加し、室温で 1 時間静置し、次いで PBST で 3 回洗浄した後、HRP 標識ストレプトアビジン (PIERCE 社製) の BSA-PBST 溶液 ($0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$) $50 \mu\text{L}$ を添加し、室温で 30 分間静置した。各ウェルを PBST で 3 回洗浄した後、 $0.3 \text{ mg}/\text{mL}$ のテトラメチルベンジジン (TMB) 及び 0.02% 過酸化水素を含むクエン酸緩衝液 (pH 3.7) $50 \mu\text{L}$ を加え、室温で 10 分間放置後、 7.7% の硫酸 $50 \mu\text{L}$ を加えて酵素反応を停止させ、波長 450 nm における吸光度を測定し、抗 sIL-2R 抗体産生ハイブリドーマの存在するウェル (陽性ウェル) を選別した。

10

20

【0040】

(iii) native な sIL-2R に反応するハイブリドーマの選別

上記 (i) 及び (ii) で選別された抗 sIL-2R 抗体産生ハイブリドーマの中から、native な sIL-2R に反応するハイブリドーマを選別した。選別は、上記 (i) 又は (ii) と同様の手順で行った、但し、ハイブリドーマ培養上清としては、上記陽性ウェルに含まれていたものと同じハイブリドーマの培養上清を用い、また免疫用抗原としては、Recombinant Human sIL-2 Receptor α の代わりに、コンカナバリン A で刺激したヒト PBMC (sIL-2R を分泌する) の培養上清を用いた。

30

【0041】

(iv) ハイブリドーマの樹立

上記 (iii) で得られた抗 sIL-2R 抗体産生ハイブリドーマから、限界希釈法にてハイブリドーマの単クローン化を行った。マウス由来で 3 種類 (クローン番号; 92201、92202、92203)、及びラット由来で 8 種類 (クローン番号; 92204R、92205R、92206R、92207R、92208R、92209R、92210R、92211R) の合計 11 種類のハイブリドーマが得られた。上記ハイブリドーマのうち 92204R は、出願人により、2015 年 9 月 25 日に独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター (〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-8) に寄託されている。

40

92204R: 受領番号 NITE BP-02123

【0042】

(5) サンドイッチ免疫測定に適用可能な抗体組み合わせの評価

上記 (4) で作製した 11 種類のハイブリドーマのそれぞれからモノクローナル抗 sIL-2R 抗体を精製し、以下に示す方法にてサンドイッチ ELISA 系が成立する抗体の組み合わせを評価した。各モノクローナル抗 sIL-2R 抗体を PBS に溶解した ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)。該溶液 $50 \mu\text{L}$ を 96 穴マイクロプレートの各ウェルに分注して、室温で 1 時間静置した。各ウェルを、 $300 \mu\text{L}$ の PBST で 3 回洗浄した後、 $200 \mu\text{L}$ の BSA-PBST を加え、室温で 1 時間ブロッキングを行った。次いで各ウェルを PBST

50

で3回洗浄した後、ヒトPBM C由来 native s I L - 2 R (2 0 0 0 U / m L) を 5 0 μ L 添加し、室温で1時間静置した。ビオチン標識した各モノクローナル抗 s I L - 2 R 抗体を B S A - P B S T にて希釈し、希釈液 (0 . 4 μ g / m L) を調製した。上記各ウェルを P B S T で3回洗浄した後、該抗体希釈液 5 0 μ L を添加し、室温で1時間静置し、P B S T で3回洗浄した後、H R P 標識ストレプトアビジン (P I E R C E 社製) の B S A - P B S T 溶液 (0 . 2 μ g / m L) 5 0 μ L を添加し、室温で30分間静置した。各ウェルを P B S T で3回洗浄した後、0 . 3 m g / m L のテトラメチルベンジジン (T M B) 及び 0 . 0 2 % 過酸化水素を含むクエン酸緩衝液 (p H 3 . 7) 5 0 μ L を加え、室温で10分間放置後、7 . 7 % の硫酸 5 0 μ L を加えて酵素反応を停止させ、波長 4 5 0 n m における吸光度を測定した。

10

【 0 0 4 3 】

11種類のモノクローナル抗体の組み合わせを評価した結果を表1に示す。なお表1では、各組み合わせの波長 4 5 0 n m の吸光度が 0 . 5 O D 未満 : - 、 0 . 5 O D 以上 : + + 、 1 . 0 O D 以上 : + + + と判定した。サンドイッチ E L I S A 系が成立するレベルの吸光度変化が達成された抗体の組み合わせは、9 2 2 0 4 R - 9 2 2 0 5 R の僅か1組であった。

【 0 0 4 4 】

【表1】

		固相抗体										
		92201	92202	92203	92204R	92205R	92206R	92207R	92208R	92209R	92210R	92211R
モノクローナル抗体	92201		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	92202	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—
	92203	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—
	92204R	—	—	—		+++	—	—	—	—	—	—
	92205R	—	—	—	+++		—	—	—	—	—	—
	92206R	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—
	92207R	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
	92208R	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—
	92209R	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—
	92210R	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—
	92211R	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

20

30

【 0 0 4 5 】

実施例1 SCC - 3細胞株からの s I L - 2 R の調製

独立行政法人 医薬基盤研究所 J C R B細胞バンクより SCC - 3細胞株 (細胞番号 J C R B 0 1 1 5) を分譲し、指定の培地 (1 0 % f e t a l b o v i n e s e r u m (F B S) 、 p e n i c i l l i n / s t r e p t o m y c i n を含む R P M I - 1 6 4 0) で起眠後、十分に細胞を増殖させた。増殖した SCC - 3細胞を遠心分離により集め、F B S 不含 R P M I - 1 6 4 0 にて洗浄後、細胞濃度が 1×10^6 c e l l s / m L となるように同培地で希釈し、37 にて C O ₂ インキュベーターにて7日間培養した。その後、遠心分離により細胞を除去し、培養上清を回収した。培養上清中の s I L - 2 R の濃度を市販キット (セルフリー N I L - 2 R ; 協和メデックス社製) で測定した結果、1 8 0 0 0 U / m L と高濃度であり、免疫原や標準品の調製に十分な量の s I L - 2 R を容易に確保できることが分かった。

40

【 0 0 4 6 】

比較例2 ヒトPBM C細胞からの s I L - 2 R の調製

ヒトの血液から P B M C を回収し、コンカナバリン A で刺激して s I L - 2 R を分泌させた。分泌された s I L - 2 R を回収し、実施例1と同様の手順で濃度を測定した。回収された s I L - 2 R の濃度は、実施例1と同じ手順 (セルフリー N I L - 2 R ; 協和メデックス社製) で測定した結果、ヒト血液 1 m L 当たり 4 0 0 0 U であった。

【 0 0 4 7 】

50

実施例2 SCC-3細胞由来sIL-2Rのアフィニティー精製

自家調製した抗sIL-2Rウサギポリクローナル抗体の精製IgGを、CNBr-activated sepharose 4FF (GE Healthcare社)に結合させ、抗体結合樹脂をカラムに詰めた。該カラムに、実施例1で得られたSCC-3細胞培養物から回収した培養上清を通し、十分な量のPBSで洗浄し、溶出バッファ(150mM NaClを含む0.1M Citrate-Na、pH3.0)でsIL-2Rを含むフラクションを溶出させた。該sIL-2Rを含むフラクションを限外濾過フィルターによって濃縮後、PBSにて透析し、精製sIL-2Rを得た。実施例1と同じ手順(セルフリーN IL-2R; 協和メデックス社製)で精製物を定量した結果、培養上清6Lから250000kUの精製sIL-2Rが得られたことが分かった。

10

【0048】

実施例3 SCC-3細胞由来sIL-2Rを免疫原としたモノクローナル抗体の作製
(1)抗sIL-2R抗体産生ハイブリドーマの作製

実施例2で精製したSCC-3細胞由来sIL-2RをPBSで希釈し、フロインド完全アジュバンドを等量混合してエマルジョンを調製した。該エマルジョンを、メスのBALB/cマウス、C57BL/6Jc1マウス及びF344/Jc1ラットの皮下に1匹あたり5μg(sIL-2R 約1000kU相当)/回の量で1週間ごとに5回注射した。各マウス又はラットから得られた抗血清から、比較例1(1)~(4)と同様の手順でハイブリドーマを作製した。BALB/cマウス由来で1種類(クローン番号; 92212)、C57BL/6Jc1マウス由来で1種類(クローン番号; 92218)、及びF344/Jc1ラット由来で6種類(クローン番号; 92213R、92214R、92215R、92216R、92217R、92219R)の合計8種類のハイブリドーマが得られた。上記ハイブリドーマのうち92212と92215Rは、出願人により、2015年9月25日に独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(〒292-0818千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)に寄託されている。

20

92212: 受領番号 NITE BP-02124

92215R: 受領番号 NITE BP-02125

【0049】

(2) サンドイッチ免疫測定に適用可能な抗体組み合わせの評価 - 1

上記(1)で作製した8種類のハイブリドーマのそれぞれからモノクローナル抗sIL-2R抗体を精製し、比較例1(5)と同様の方法でサンドイッチELISA系が成立する抗体の組み合わせを評価した。8種類のモノクローナル抗体の組み合わせを評価した結果を表2に示す。33組の抗体の組み合わせでサンドイッチELISA系が成立するレベルの吸光度変化が達成された。

30

【0050】

【表2】

		固相抗体							
		92212	92213R	92214R	92215R	92216R	92217R	92218	92219R
ビオチン標識抗体	92212		+++	+++	—	+++	—	—	—
	92213R	+++		—	+++	—	+++	++	+++
	92214R	+++	—		+++	—	+++	—	+++
	92215R	—	+++	+++		+++	—	—	+++
	92216R	+++	—	—	+++		+++	++	+++
	92217R	++	+++	+++	++	+++		—	+++
	92218	—	+++	+++	—	+++	—		—
	92219R	—	+++	+++	+++	+++	+++	—	

40

【0051】

(3) サンドイッチ免疫測定に適用可能な抗体組み合わせの評価 - 2

50

比較例 1 で作製した 11 種類の抗体と実施例 3 で作製した 8 種類の抗体を合わせた合計 19 種類のモノクローナル抗 s I L - 2 R 抗体の間で、比較例 1 (5) と同様の方法にてサンドイッチ E L I S A 系が成立する抗体の組み合わせを評価した。結果を表 3 に示す。122 組の抗体の組み合わせでサンドイッチ E L I S A 系が成立するレベルの吸光度変化が生じたが、そのほとんどは、少なくとも一方が S C C - 3 細胞由来 s I L - 2 R を免疫原としたモノクローナル抗体である抗体の組み合わせであった。さらに S C C - 3 細胞由来 s I L - 2 R を免疫原としたモノクローナル抗体同士の組み合わせの場合、大きな吸光度変化が生じる割合はより高くなった。以上の結果から、S C C - 3 細胞株由来 s I L - 2 R を免疫原として作製したモノクローナル抗 s I L - 2 R 抗体は、サンドイッチ免疫測定用の抗体として好適であることが示された。

10

【 0 0 5 2 】

【表 3】

抗体	固相抗体																		
	92201	92202	92203	92204R	92205R	92206R	92207R	92208R	92209R	92210R	92211R	92212	92213R	92214R	92215R	92216R	92217R	92218	92219R
92201	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	-	++	-	++
92202	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	-	++	-	++
92203	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	-	++	-	++
92204R	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	++
92205R	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	++
92206R	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-	-	++	-	++	-	++
92207R	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-	-	++	-	++	-	++
92208R	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	++	-	-	++	-	++	-	++
92209R	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	++	-	++
92210R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	++
92211R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	++	-	++	-	++
92212	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	++	-	++	-	++
92213R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	++	-	++	-	++
92214R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	++	-	++	-	++
92215R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	++	-	++	-	++
92216R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	++	-	++	-	++
92217R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	++	-	++	-	++
92218	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	++	-	++	-	++
92219R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	++	-	++	-	++

10

20

30

40

【 0 0 5 3 】

実施例 4 SCC - 3 細胞由来 s I L - 2 R とリコンビナント s I L - 2 R の構造比較

50

実施例3の抗体組み合わせ評価の結果より、リコンビナントsIL-2R蛋白質とSCC-3細胞由来sIL-2R蛋白質との間に構造的な違いが存在することが示唆されたことから、両蛋白質を解析して構造を比較した。

【0054】

実施例2で調製したSCC-3細胞株由来精製sIL-2R(サンプルA)、比較例1で用いたpeprotech社製リコンビナントsIL-2R[Code:200-02R](サンプルB)、及びR&D systems社製リコンビナントsIL-2R(サンプルC)を、SDS含有非還元条件下で煮沸処理した。各処理液をSDS-PAGE(4-20%)の各レーンに、1レーン当たり約10ngアプライして電気泳動した。泳動終了後、ゲルよりタンパク質をPVDF膜へ転写し、Biotylated Anti-human IL-2R α Goat Antibody(R&D systems社製)を室温で1時間反応させ、次にHRP標識ストレプトアビジン(PIERCE社製)を室温で30分間反応させた後、3,3'-ジアミノベンジジン及び過酸化水素にてIL-2R蛋白質を検出した。その結果、SCC-3細胞由来sIL-2R(A)とR/D systems社製リコンビナントsIL-2R(C)の分子量は30kDa付近と一致していたが、Peprrotech社製リコンビナントsIL-2R(B)の分子量は、40kDa付近と若干大きいことが確認された(図1)。

【0055】

さらに、SCC-3細胞由来sIL-2R、リコンビナントsIL-2R(rIL-2R; Peprrotech社製及びR/D systems社製)、ヒトPBMC由来sIL-2R、及びsIL-2R高濃度ヒト血清をゲル濾過クロマトグラフィー解析した。各サンプル2000U分をゲル濾過クロマトグラフィー分離にかけ(カラム: HiLoad 16/60 Superdex 200 [GEヘルスケア]、溶離液: PBS、流速: 1mL/分)、溶出フラクションを2mLずつ分取し、各フラクション中のsIL-2Rの存在をサンドイッチELISAで検出した。結果、SCC-3細胞由来sIL-2Rの溶出位置はヒト血清中sIL-2R及びヒトPBMC由来sIL-2Rと一致していた一方、2種類のリコンビナントsIL-2Rはいずれも溶出がより遅くなった(図2)。したがって、SCC-3細胞由来sIL-2RはnativeなヒトsIL-2Rと同等の構造を有していると推定される一方で、リコンビナントsIL-2Rは、非変性状態でnativeなヒトsIL-2Rと分子量に違いがあることが判明した。

【0056】

以上の解析結果から、リコンビナントsIL-2R蛋白質は、ヒト血清中に存在しているsIL-2R蛋白質と構造が異なることが判明した。この構造上の違いがリコンビナントは蛋白質の抗原特異性を限定し、これが原因でサンドイッチ免疫測定に不向きな抗体しか作製できなかったという可能性が推察される。これに対し、SCC-3細胞由来sIL-2Rは、ヒト血清中に存在するsIL-2Rと同等の構造を有しており、抗ヒトsIL-2R抗体作製のための免疫原としてより有効であると考えられる。

【0057】

実施例5 LTI A法によるsIL-2Rの定量

実施例3(3)で調べた抗体を用いた抗体の組み合わせについて、ラテックス免疫比濁法(LTI A)用抗体としての適性を調べた。なお、以下の実施例において、特に言及しない限り、%濃度は(w/v)%を意味する。

【0058】

(1) 抗体担持ラテックス粒子の調製

(a. 材料)

抗sIL-2Rモノクローナル抗体(92204R抗体)液: 0.5Abs/mL(280nm)、感作液: 20mM MOPS-NaOH(pH7.0)

抗sIL-2Rモノクローナル抗体(92212抗体)液: 0.5Abs/mL(280nm)、感作液: 10mM Glycine-NaOH(pH9.0)

ラテックス粒子: 平均粒子径0.307 μ m及び0.216 μ m

(b. 方法)

上記92204R抗体液と感作液で希釈した1%ラテックス粒子液(平均粒子径0.307 μ m)とを等容量混合して、4で2時間攪拌後、混合液と等容量の1%BSAを添加して4にて1時間ブロッキングした。これをMOPS緩衝液(pH7.0)で透析して得られた液を、抗体担持ラテックス粒子溶液とした。

同様に、上記92212抗体液と感作液で希釈した1%ラテックス粒子液(平均粒子径0.216 μ m)を用い、上記と同様の方法で抗体担持ラテックス粒子溶液を得た。

【0059】

(2) L T I A 法第1試薬の調製

400mMの塩化ナトリウム、0.1%BSA、0.05% ProClin300を含む30mM Citrate-NaOH緩衝液(pH6.0)を調製し、第1試薬とした。

【0060】

(3) L T I A 法第2試薬の調製

上記92212抗体担持ラテックス粒子溶液と上記92204R抗体担持ラテックス粒子溶液とをラテックス粒子の含量比で1:1になるよう混合し、5mM MOPS緩衝液(pH7.0)で最終吸光度3.0OD(600nm)に希釈して、第2試薬とした。

【0061】

(4) L T I A 測定

市販キット(セルフリーN IL-2R; 協和メデックス社製)により予めsIL-2Rの濃度を測定したヒト血清検体(n=43)を準備した。これらの検体のsIL-2Rの濃度を、上記第1試薬と第2試薬とを用いたL T I A 法により測定した。測定には、日立7170形自動分析装置を用いた。具体的には、ヒト血清検体4 μ Lに、上記第1試薬100 μ Lを加えて37で5分間加温後、上記第2試薬100 μ Lを加えて攪拌した。その後5分間の凝集形成に伴う吸光度変化(測光ポイント: 19-34)を、主波長570nm、副波長800nmにて吸光度測定した。

【0062】

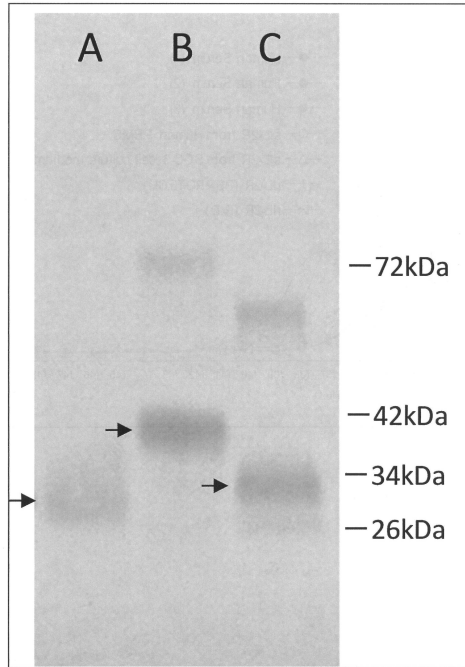
L T I A 法による測定結果は、市販キットによる測定結果と高い相関性($r=0.922$)を示した(図3)。したがって、SCC-3細胞由来sIL-2Rを免疫原として作製した抗体は、サンドイッチ免疫測定用抗体として好適であり、L T I A 法への応用も可能であることが確認された。以上のとおり、本発明により提供されるSCC-3細胞由来sIL-2R、及びこれを免疫原とする抗体の製造方法は、ヒトsIL-2R免疫測定用試薬の構築に貢献する。

10

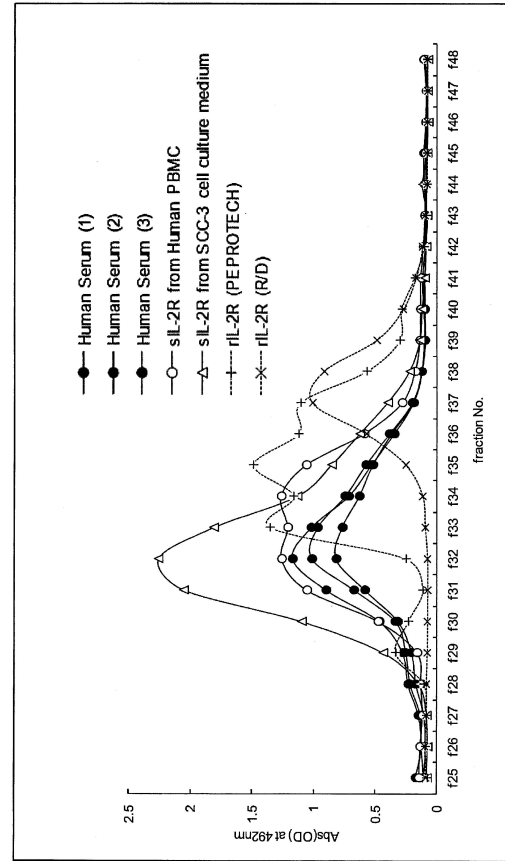
20

30

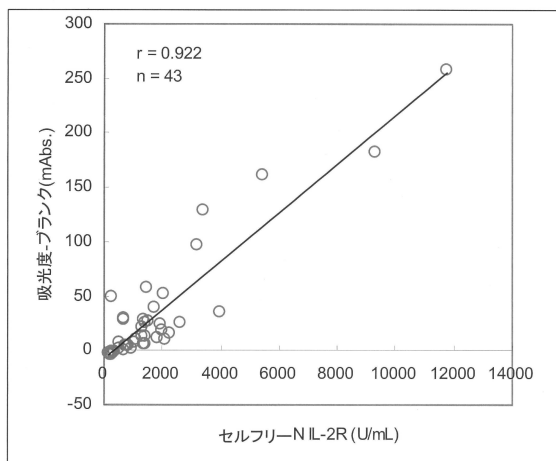
【図 1】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/20	(2006.01)	C 1 2 N 5/20
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 P
G 0 1 N	33/577	(2006.01)	G 0 1 N 33/577 B
G 0 1 N	33/543	(2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 8 7
			G 0 1 N 33/543 5 4 5 A

(56)参考文献 特開昭 6 2 - 0 7 0 7 6 1 (J P , A)
 特開 2 0 1 4 - 1 8 6 0 4 1 (J P , A)
 Jacques Y.,et al. A soluble interleukin 2 receptor produced by a normal alloreactive human T cell clone binds interleukin 2 with low affinity. J Immunol. 1987;139(7):2308-2316. , 1 9 8 7 年
 KIMURA, Yoshiko et al., (1986). Establishment and characterization of a monocytic cell line which expresses the interleukin-2 receptor. Japanese journal of cancer research : Gann. 77. 862-5. 10.20772/cancersci1985.77.9_862. , 1 9 8 6 年

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C 1 2 P 2 1 / 0 0
 C A p l u 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)