



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類⁵ C12P 21/08, G01N 33/569 // A61K 39/395	A1	(11) 国際公開番号 WO 92/01808 (43) 国際公開日 1992年2月6日 (06. 02. 1992)
(21) 国際出願番号 PCT/JP90/00926 (22) 国際出願日 1990年7月18日 (18. 07. 90) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 同仁医薬化工株式会社 (DOJIN IYAKU-KAKO CO., LTD.) [JP/JP] 〒164 東京都中野区弥生町5丁目2番2号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 中村良子 (NAKAMURA, Yoshiko) [JP/JP] 〒229 神奈川県相模原市古湖3130-10 Kanagawa, (JP) 佐藤純一 (SATO, Junichi) [JP/JP] 〒275 千葉県習志野市谷津2-20-13 Chiba, (JP) (74) 代理人 弁理士 有賀三幸, 外 (ARUGA, Mitsuyuki et al.) 〒103 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo, (JP) (81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許)*, DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書 補正書		
(54) Title: REAGENT FOR DIAGNOSING MYCOPLASMA PNEUMONIAE (54) 発明の名称 マイコプラズマ・ニューモニエ診断用試薬 (57) Abstract A method of stabilizing an anti-Mycoplasma pneumoniae monoclonal antibody by dissolving the antibody or a labelled derivative thereof in an aqueous solution with a pH of 5.5 to 8.5 containing 5 to 5,000 times by weight as much albumin; a reagent for diagnosing Mycoplasma pneumoniae containing the stabilized composition thus obtained; and a method of purifying an anti-Mycoplasma pneumoniae monoclonal antibody by concentrating a supernatant of the culture of a hybridoma which produces this antibody 2- to 20-fold, washing a fraction obtained by salting out with a buffer of a pH of 6.0 to 7.5, and dissolving the washed fraction in a buffer of a pH of 8 to 10.		

* 追って通知があるまで、出願日が1990年10月3日より前の国際出願におけるDEの指定は、先のドイツ民主共和国の領域を除く、ドイツ連邦共和国の領域において有効である。

(57) 要約

本発明は抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体又はその標識体を、当該抗体又は標識体に対して5～5,000重量倍のアルブミンを含有するpH 5.5～8.5の水性溶液に溶解することを特徴とする抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体の安定化法；かくして得られる安定な組成物を含有するマイコプラズマ・ニューモニエ診断用試薬；並びに抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清を2～20倍に濃縮し、次いで塩析して得られた画分をpH 6.0～7.5の緩衝液で洗浄後pH 8～10の緩衝液に溶解することを特徴とする、抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体の精製方法に関する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア
AU オーストラリア
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
CA カナダ
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴ
CH スイス
CI コート・ジボアール
CM カメルーン
CS チェコスロバキア
DE ドイツ
DK デンマーク

ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GI ギニア
GB イギリス
GR ギリシャ
HU ハンガリー
IT イタリア
JP 日本
KP 朝鮮民主主義人民共和国
KR 大韓民国
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LU ルクセンブルグ
MC モナコ
MG マダガスカル

ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
NL オランダ
NO ノルウェー
PL ポーランド
RO ルーマニア
SD スーダン
SE スウェーデン
SN セネガル
SU ソビエト連邦
TD チャド
TG トーゴ
US 米国

明 細 書

発明の名称

マイコプラズマ・ニューモニエ診断用試薬

技術分野

本発明は抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体又はその標識体を安定に含有してなるマイコプラズマ・ニューモニエの診断用試薬、並びにハイブリドーマの培養上清から抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体を大量に、かつ高純度、高収率で簡便に精製する方法に関する。

背景技術

マイコプラズマ・ニューモニエ感染症はおよそ4年周期で流行し、小児や若年者では重症化や中枢神経障害等の重篤な合併症を招くことがある。マイコプラズマ・ニューモニエ感染症はかぜ症候群の中ではウイルスによるものに次いで多く、治療にはマクロライド系又はテトラサイクリン系の抗生物質が有効であるので、本症の発病初期に於ける迅速な確定診断が必要とされてきた。しかし、今日行われている診断方法としては培養法や血清学的方法等が挙げられるが、いずれも長期間を必要とするものであった。特に血清学的診断方法に於ける抗体の検出は回復期に至って初めて可能になるものであり、非特異反応も少なくないという欠点があった。本発明者らは、かかる欠点を解決すべく研究し、先にマイコプラズマ・ニューモニエに特異的な抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体を得、これがマイコプラズマ・ニューモニエ感染症の診断薬として有用であることを見出した（特開

昭63-184064号)。

しかしながら、当該抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体の取得手段及びこれを含有する診断薬にはいくつかの問題点が存することが判明した。すなわち、抗体の精製は、一般に硫安分画法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法などの免疫グロブリンの精製法や、プロテインAや抗原によるアフィニティークロマトグラフィー法などに基づいて行われている。本発明者らも、上記特許公開公報の中で、硫安分画法とプロテインAセファロースCL-4B(ファルマシア社製)を組み合わせることで精製された抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体を得ている。しかし大量に抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体を得るためには以下の点で著しく不利であった。

1) 硫安分画での収率が著しく悪い。50%飽和硫安濃度でも十分な抗体の沈澱物が得られない。

2) 中性の緩衝液に対して溶解性が悪く、硫安沈澱物を少量の緩衝液に高濃度に溶解させることが困難である。低塩濃度の緩衝液に対しては更に溶解性が悪く、透析すると多量の沈澱物が析出して失活する。

3) プロテインAセファロース4Bは高価である。

これらの問題点により、本発明者らの見出した抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体は、一般的なIgGに属する抗体の精製法によって精製することが困難であった。

また、得られた抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体は、通常の保存条件では不安定であり診断薬として開発するには問題があった。

従って、大量生産に適した抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体の精製法及び当該モノクローナル抗体を安定に維持した診断薬の開発が望まれていた。

本発明者らは、かかる現状に鑑み鋭意研究した結果、抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清を濃縮した後塩析し、pHを一定の範囲に調整すれば、精製が容易に行い得ること、及び得られたモノクローナル抗体をアルブミンとともに一定のpHを有する緩衝液に溶解し、又はこれを更に凍結乾燥すれば安定な診断薬が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

発明の開示

本発明は抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清を2～20倍に濃縮し、次いで塩析して得られた画分をpH 6.0～7.5の緩衝液で洗浄後pH 8～10の緩衝液に溶解することを特徴とする、抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体の精製法；

抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体又はその標識体を、当該抗体又は標識体に対して5～5,000重量倍のアルブミンを含有するpH 5.5～8.5の水性溶液に溶解するか又はこれを更に凍結乾燥することを特徴とする抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体の安定化法；並びに

抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体（以下、本モノクローナル抗体と略す）又はその標識体、及び当該抗体又は標識体に対して5～5,000重量倍のアルブミンを

含有するマイコプラズマ・ニューモニエ（以下、M.pと略す）
診断用試薬を提供するものである。

図面の簡単な説明

図-1は、実施例3において中性緩衝液で洗浄した硫安分画のゲル濾過パターンを示し、図-2は実施例3における未洗浄硫安分画のゲル濾過パターンを示す図面である。

発明を実施するための最良の形態

本モノクローナル抗体の精製に用いられるハイブリドーマの培養上清は、例えば特開昭63-184064号に記載の方法によって得られる。すなわち、M.pで免疫した哺乳動物の免疫担当細胞と骨髓腫細胞とを常法により融合させて得られたハイブリドーマ（例えばC2-G3, G1-B8, G1-B6）を適当な培地で培養するか、該ハイブリドーマを動物の腹腔内に投与した後腹水を採取することによって得られる。

本発明精製法を実施するには、まず上記の如くして得た培養上清をpH8～9に調整した後、2～20倍、好ましくは5～10倍に濃縮する。濃縮方法は沈澱物が生じない方法であれば特に限定されないが、限外濾過法又は透析法が好ましい。次いで、濃縮した培養上清を塩析して沈澱物を採取する。塩析は、例えば硫安分画法によって行うことができる。すなわち、濃縮液にpHを7に調整した等量の飽和硫安溶液を加えて（50%飽和）一夜静置し、生じた沈澱物を0.5M炭酸塩緩衝液（pH9.5）に溶解し、2分の1量の飽和硫安溶液を加えて（33%飽和）生じた沈澱物を採取する。

次に得られた沈澱物を少量のpH6.0～7.5の緩衝液、例えば、0.05Mリン酸塩緩衝液（pH7.2）で洗浄した後、pH8

～10の緩衝液、例えば0.5 M炭酸塩緩衝液(pH9.5)に溶解すれば、高純度の本モノクローナル抗体溶液が得られる。この段階で本モノクローナル抗体はかなり純度が高いが、更に高純度にするためにはゲル濾過法によって精製するのが好ましい。ここで他の精製方法、例えば弱イオン交換クロマトグラフィーなどの中性域、低塩濃度で吸着させることが必要な精製法は適用が困難である。また、吸着、溶出に酸性の状態が必要な精製法は安定性の面から適用が困難である。ゲル濾過法の担体としてはIgGの分子量から適当な担体、例えばセファクリルS-300 HRを用い、0.5 M炭酸塩緩衝液(pH9.5)にてゲル濾過を行うのが好ましい。活性画分を集め、限外濾過法にて濃縮し精製本モノクローナル抗体を得る。この精製抗体は電気泳動で均一なバンドを示す。また、この精製抗体をpH9より酸性側の緩衝液で透析すると、多量の沈殿物が生じ、取扱いが困難になる。以上の操作は冷所で行うのが好ましい。

このようにして得られる本モノクローナル抗体は、M.pに優れた特異性を持つことから、そのまま、あるいは蛍光色素(例えばフルオレッセンス)、酵素(例えばペルオキシダーゼ)、放射性物質(例えば ^{125}I)、金コロイド、ラテックスなどで標識して、蛍光抗体法、エンザイムイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、金粒子免疫測定法、凝集反応などの方法で、M.p感染症の診断薬として適用可能であるが、本モノクローナル抗体は不安定であり冷蔵保存が必要である。しかし、本モノクローナル抗体又はその標識体を、当該抗体又は標識体に対して5～1,000重量倍、好ましくは10～

500 重量倍のアルブミンを含有する pH 5.5~8.5、好ましくは pH 6.0~8.0 の水性溶液に溶解するか、あるいは当該抗体又は標識体に対して 5~5,000 重量倍、好ましくは 50~5,000 重量倍のアルブミンを含有する pH 5.5~8.5、好ましくは pH 6.0~8.0 の水性溶液を凍結乾燥すれば、本モノクローナル抗体の安定性が高まり、室温保存も可能となる。例えば本 FITC 標識モノクローナル抗体を 10 μ g~200 μ g/ml 含む pH 5.5~8.5、好ましくは pH 6.0~8.0 の水性溶液に、アルブミンを 1.0mg~20mg/ml、好ましくは 2.0mg~5.0mg/ml 添加するか、あるいはアルブミンを 5.0mg~50mg/ml、好ましくは 10mg~50mg/ml 添加して凍結乾燥すれば、本モノクローナル抗体の安定性が高まり、室温保存も可能となる。

本発明で使用するアルブミンの種類は特に限定されないが、血清アルブミン、特に牛血清アルブミン（以下、BSA と略す）が好ましい。

ここで、アミブミンは本モノクローナル抗体の反応を妨害しないので、かくして得られる本モノクローナル抗体又はその標識体及び当該抗体又は標識体に対して 5~5,000 重量倍のアルブミンを含有する組成物は安定な M.p 診断用試薬として用いることができる。

実施例

以下実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

参考例

ハイブリドーマの調製法：

(i) 抗体産生細胞の調製

- ① マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*) Mac株をPPLD液体培地に接種して37℃で5日間前培養を行った。この培養液を同培地1,000 mlに接種し、各100 mlを500 ml容ルービンに移して37℃で5日間静置して培養を行った。培養後、培養液を捨て、ガラス面に吸着した菌体を、0.01Mリン酸緩衝食塩液 (pH 7.2) (以下、PBS と略す) を加えてラバーポリスマンにてかき集めた。この菌液について凍結融解を4回繰り返して、PBS で3回洗浄しM. p膜抗原(1)とした。この抗原の蛋白濃度をローリーらの方法に準じて測定した。(注)
- ② 同様に、Mac 株を佐々木らが報告しているEY培地 (卵黄2%含有) に接種して37℃で5日間前培養を行った。この培養液を、同培養液1,000 mlに接種して、37℃で5日間静置して培養を行った。培養後、培養液を捨てガラス面に吸着した菌体を、PBS を加えてラバーポリスマンにてかき集めた。この菌液について凍結融解を4回行い、PBS で3回洗浄してM. p膜抗原(2)とした。この抗原についてもローリーらの方法に準じて蛋白濃度を求めた。
- ③ M. p膜抗原(1) (蛋白として100 μ g相当) をそのまま、BALB/c系雌性マウス (6~7週齢) の腹腔内に投与した。1週後、同量を腹腔内に追加免疫した。更に6週後、M. p膜抗原(2)を同量静脈内に追加免疫を施した。1~2週後、血中抗体価が上昇していることを確認した後、M. p膜抗原(2)を蛋白として10 μ g相当量を静脈内に投与した。

(注) Lowry, O. H, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr,
and R. J. Randall, 1951, J. Biol. Chem, 193:

265-275

- ④ 最終免疫3日後に脾臓を無菌的に採取した。採取した脾臓はピンセットでほぐし、メッシュ(#100)を通過させて細胞浮遊液とした。トリス塩化アンモニウム緩衝液を10倍量加えて氷冷中2~3分放置して赤血球を除去した。イーグルMEM培地(以下、MEMと略す)にて3回洗浄後 5.0×10^7 個/ ml に調製した。

(ii) 細胞融合及び抗体産生ハイブリドーマの調製

- ① 予め培養しておいたミエローマ細胞(X63-Ag 8.6.5.3)をMEMにて3回洗浄した後、 5.0×10^6 個/ ml に調製した。(i) ④で調製した脾細胞5.0 ml とミエローマ細胞5.0 ml を40 ml の遠沈管にとり、遠心分離(1,100rpm、5分間)して上清を除去して細胞を集めた。ペレットをよく解きほぐし、予め37℃に温めておいた50%ポリエチレングリコール1000溶液0.5 ml を約1~2分間で徐々に加えた。次に37℃に保温しておいたMEM10 ml を約2 ml /分の速度でゆっくりと加えて反応を停止させた。遠心分離(1,100rpm、5分間)して上清を除去した後、10%牛胎児血清を含むRPMI-1640培地を加え、ミエローマ細胞が 5.0×10^5 個/ ml になるように調製し、96穴マイクロプレートに200 μl /well分注した。37℃で5%炭酸ガスを含む炭酸ガス培養器中で1日培養した後、培地の半量を捨てHAT培地(10%牛胎児血清を含むRPMI-1640培地にてヒポキサンチン $1.0 \times 10^{-4} M$ 、アミノプテリン $4.0 \times 10^{-7} M$ 、チミジン $1.6 \times 10^{-5} M$ を加えたもの)100 μl を添加する。以後、2~3日毎

に半量を HAT 培地で交換した。10～14 日後、細胞の増殖がみられたら、培地の半量を HT 培地 (HAT 培地からアミノプテリンを除いたもの) で交換し、2 日後 HT 培地で半量交換した後は、2～3 日毎に 10% 牛胎児血清を含む RPMI-1640 培地で交換した。約 2 週間後、ELISA 法及び間接赤血球凝集反応 (セロディアー MYCO, 富士レビオ 鋼製を使用) により抗 M.p 抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングした。その結果、融合細胞は 100% のウェルに認められ、そのうち抗体産生が認められたウェルは 6.8% であったが、培養経過後も再現性の認められたものは 3.7% であった。

- ② 抗体産生の認められたハイブリドーマは限界希釈法により、クローニングを行った。即ち、ハイブリドーマを 6.0 個/ ml に調製し、正常 BALB/c 系マウスの胸腺細胞を 10^7 個/ ml に調製した液を 1:1 に混合して、96 穴マイクロプレートに 200 μl ずつウェルに分注した。
- 37℃ で 5% 炭酸ガスを含む炭酸ガス培養器中で培養し、約 2～3 週後に培養上清中の抗体産生を前記の方法にて検討した。その結果抗体産生の良好なハイブリドーマについては再度クローニングを繰り返した。2 回クローニングをして得られたハイブリドーマは、培養上清中の抗体を得ること及び長期の培養でも安定に産生することを確認する目的で、96 穴マイクロプレートから 24 穴マルチプレートに移しかえ、更に 50 ml 組織培養フラスコに移しかえた。その結果、抗体産生は長期の継代にても安定に産生された。

以上の如くして、ハイブリドーマC2-G3、G1-B8 及び G1-B6 を得た。

実施例 1 本モノクローナル抗体の精製

参考例で得られたハイブリドーマ、G1-B6 をGIT 培地（日水製薬（株）製）を用いて、37℃で5%炭酸ガスを含む炭酸ガス培養器中で培養を行い、4～5日目に培養上清を採取した。得られた培養上清（1,500ml）をpH8に調整後、遠心分離（10,000rpm、20分間）しメンブランフィルターで濾過した。濾液を限外濾過により5倍に濃縮した。この濃縮液に等量のpH7に調整した飽和硫安溶液（SAS）を加え（50%飽和）、冷所にて一夜放置後、遠心分離（10,000rpm、20分間）により沈澱を集めた。この沈澱物を0.5M炭酸塩緩衝液（pH9.5）200mlに溶解し、これに100mlのSASを加え（33%飽和）、冷所に静置後、生じた沈澱を遠心分離（10,000rpm、20分間）により集めた。この沈澱物を10mlの0.05Mリン酸塩緩衝液（pH7.2）にて洗浄し、遠心分離（10,000rpm、20分間）により沈澱を集めた。この沈澱物を0.5M炭酸塩緩衝液（pH9.5）8mlに懸濁し、0.5M炭酸塩緩衝液（pH9.5）で一夜透析した。ごく僅かに残った不溶物を遠心分離（10,000rpm、20分間）で除いた後、0.5M炭酸塩緩衝液（pH9.5）で充填したセファクリルS-300 HR（ファルマシア社製）のカラム（直径26mm、長さ1,000mm）を用いてゲル濾過法によって分画した。活性画分を集め、限外濾過により濃縮し精製抗体を得た（収量35.6mg）。この精製抗体は電気泳動的に均一であった。

比較例 1 本モノクローナル抗体の精製（特開昭63-184064号の方法）

実施例 1 と同様のハイブリドーマ培養上清 (1,500ml) に等量の pH 7 に調整した飽和硫安溶液 (SAS) を加え、冷所にて一夜静置後、遠心分離 (10,000rpm、20 分間) により沈澱を集めた。この沈澱物を 0.05M トリス緩衝食塩液 (pH 8.6) 250 ml に溶解し、一夜透析した。不溶物を遠心分離 (10,000rpm、20 分間) で除いた後、0.05M トリス緩衝食塩液 (pH 8.6) で充填したプロテイン A セファロース 4 B (ファルマシア社製) のカラム (直径 26 mm、長さ 400mm) を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって分画し、活性画分を集め、限外濾過により濃縮し精製抗体を得た (収量 1.3mg)。

実施例 2

実施例 1 に示した培養上清を限外濾過法により種々の濃度に濃縮し、これに 2 分の 1 量または等量の SAS を加え (33% 飽和または 50% 飽和)、生じた沈澱物中の抗体回収率を比較した。結果を表 1 に示した。

表－１ 硫安沈澱によるハイブリドーマ培養上清からの抗体回収率の比較

培養上清濃縮率		回収率 (%)
未濃縮	(3 3 % 飽和)	1 0
未濃縮	(5 0 % 飽和)	1 7
2 倍濃縮	(5 0 % 飽和)	2 5
5 倍濃縮	(3 3 % 飽和)	3 3
5 倍濃縮	(5 0 % 飽和)	8 7
1 0 倍濃縮	(3 3 % 飽和)	5 0
1 0 倍濃縮	(5 0 % 飽和)	8 3

実施例 3

実施例 1 に示した本モノクローナル抗体の精製過程で、培養上清から得られた 3 3 % 飽和硫安沈澱物を中性緩衝液で洗浄することによる精製効果を検討した。

5 0 % 飽和硫安沈澱物を pH 9. 5 炭酸塩緩衝液に溶解した液を 2 等分し、それぞれに SAS 2 分の 1 量を加え、3 3 % 飽和硫安沈澱物を得た。一方はこれをそのまま pH 9. 5 炭酸塩緩衝液に溶解し (1)、もう一方は pH 7. 2 リン酸塩緩衝液で洗浄し (2)、その後 pH 9. 5 炭酸塩緩衝液に溶解した (3)。それぞれの抗体比活性と回収率を比較した。結果を表－2 に示した。

表－2 3 3 % 飽和硫安沈澱物を中性緩衝液で洗浄することによる精製効果

精製段階		比活性*	回収率 (%)
(1)	3 3 % 飽和硫安沈澱物	630	100
(2)	pH 7. 2 リン酸塩緩衝液洗浄液	350	12
(3)	pH 9. 5 炭酸塩緩衝液溶解液	820	88

* 活性単位 / タンパク質量 (mg)

また、中性緩衝液で洗浄した硫安分画(3)と、洗浄しない硫安分画(1)をそれぞれゲル濾過法で精製したときの分離パターンをそれぞれ図-1及び図-2に示した。図-1及び図-2中、PHA 価はセロディアーMYCO-II (富士レビオ(株)製)を用いた凝集活性を示す。中性緩衝液で洗浄した硫安分画を用いた方が抗体がきれいに分離していた。

実施例4 蛍光標識本モノクローナル抗体の作製

実施例1で得た精製抗体(5mg)にモル比で4倍量のFITC (Fluorescein isothiocyanate)を加え、0.5M炭酸塩緩衝液(pH9.5)中で4℃、4時間反応した。反応終了後、遠心分離(10,000rpm、10分間)により不溶物を除き、0.01M炭酸塩緩衝液(pH9.5)、150mM塩化ナトリウムで充填したセファデックスG-25 (ファルマシア社製)のカラム(直径10mm、長さ400mm)を用いてゲル濾過法により未反応のFITCを除き、精製蛍光標識本モノクローナル抗体を得た(収量4.5mg)。抗体1分子当りのFITC結合比(F/P比)は1.1であった。またFITCはそのほとんどが抗体分子中のH鎖に結合していることがSDS-電気泳動によって確認された。

実施例5 ペルオキシダーゼ標識本モノクローナル抗体の作製

西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ水溶液(4mg/ml)に、4mgの過ヨウ素酸ナトリウムを加え室温で10分間反応した。反応終了後、1mM酢酸塩緩衝液(pH4.0)に対し、4℃で一晩透析した。得られたアルデヒド・ペルオキシダーゼ溶液を、0.2M炭酸塩緩衝液(pH9.5)によりpH9.3に修正後、直ちに、実施例1で得た精製抗体5mg(0.01M炭酸塩緩衝液pH9.5に

対し、4℃で一晩透析したもの)を加えた。室温で2時間反応した後、水素化ホウ素ナトリウム0.4 mgを加え、4℃で2時間反応後、遠心分離(10,000rpm、10分間)により不溶物を除いた。0.01M炭酸塩緩衝液(pH9.5)・150mM塩化ナトリウムで充填したウルトロゲルACA-44(LKB社製)のカラム(直径16mm、長さ700mm)を用いて、ゲル濾過法により、ペルオキシダーゼと抗体の高分子重合体、未反応のペルオキシダーゼ及び抗体を除き、精製ペルオキシダーゼ標識本モノクローナル抗体を得た(収量4.5mg)。

実施例6 ビオチン標識本モノクローナル抗体の作製

N-ハイドロキシ・スクシンイミドビオチン(フナコシ薬品社製)1 mgを50~100 μ lのジメチルホルムアミドに溶解し、実施例1で得た精製抗体5 mg(1 mg/mlに調整後、0.1 M炭酸水素ナトリウムに対し、4℃で一晩透析したもの)を加え、室温で4時間反応した。反応終了後、遠心分離(10,000rpm、10分間)により不溶物を除去後、0.01M炭酸塩緩衝液(pH9.5)・0.15M塩化ナトリウムで充填したウルトロゲルACA-44(LKB社製)のカラム(直径16mm、長さ400mm)を用いて、ゲル濾過法により、未反応のN-ハイドロキシ・スクシンイミドビオチンを除き、精製ビオチン標識本モノクローナル抗体を得た(収量4.1mg)。

実施例7 蛍光標識抗体の熱安定性に対するpHの影響

1 ml当り、80 μ gの実施例4で得られたFITC標識本モノクローナル抗体と、20 mgのBSA、及び8.5 mgの塩化ナトリウムを含む溶液を種々のpHに調整した。これらの溶液を50℃で12時間又は40℃で1週間加熱し、安定性を比較した。

結果を表-3に示した。

表-3 蛍光標識抗体溶液の熱安定性に対するpHの影響
(残存活性の%で示した)

pH	50℃、12時間加熱	40℃、1週間加熱
5.0	13%	46%
5.5	38%	78%
6.0	64%	82%
6.5	56%	83%
7.0	47%	71%
7.5	47%	74%
8.0	46%	64%
8.5	28%	63%
9.0	13%	50%
9.5	0%	29%

実施例8 蛍光標識抗体溶液の熱安定性に対するBSAの影響

pH6.5の溶液中、1ml当り、80 μ gの実施例4で得たFITC標識本モノクローナル抗体と、1.0mg～50mgのBSA、及び8.5mgの塩化ナトリウムを含む溶液を各々調製した。これらの溶液を50℃で12時間又は40℃で1週間加熱し、安定性をBSAを含まない溶液と比較した。結果を表-4に示した。その結果本モノクローナル抗体は1.0mg～20mg/mlのBSAを含む溶液中で安定であり、2.0mg～5.0mg/mlのBSAを含む溶液中で特に安定であった(すなわち、本モノクローナル抗体に対して

12.5～250重量倍のBSAで安定、25～62.5重量倍のBSAで特に安定)。

表-4 蛍光標識抗体溶液の熱安定性に対するBSAの影響
(残存活性の%で示した)

BSA 含量 (mg/ml)	50℃、12時間加熱	40℃、1週間加熱
0	50%	74%
1	67%	99%
2	77%	100%
5	86%	99%
10	73%	97%
20	66%	86%
50	53%	73%

実施例9 蛍光標識抗体凍結乾燥品の熱安定性に対するBSAの影響

pH6.5の溶液中、1ml当り、80μgの実施例4で得たFITC標識本モノクローナル抗体と、5.0mg～50mgのBSA、及び8.5mgの塩化ナトリウムを含む溶液を各々調製し、これらの溶液を0.5mlずつ褐色のバイアル瓶に分注し、凍結乾燥後、窒素ガス置換を行った(1バイアル当り、40μgのFITC標識本モノクローナル抗体と、2.5mg～25mgのBSA、及び4.25mgの塩化ナトリウムを含む)。これらのバイアル瓶を、50℃で1週間加熱し、安定性をBSAを含まないバイアル瓶と比較した。結

果を表－5に示した。

その結果、本モノクローナル抗体は2.5mg～25mg／バイアルのBSAを含むバイアル中で安定であり、5.0mg～25mg／バイアルのBSAを含む溶液中で特に安定であった（すなわち、本モノクローナル抗体に対して62.5～625重量倍のBSAで安定、125～625重量倍のBSAで特に安定）。

表－5 蛍光標識抗体凍結乾燥品の熱安定性に対するBSAの影響

（残存活性の％で示した）

BSA 含量 (mg／バイアル)	50℃、1週間加熱
0	3%
2.5	35%
5.0	61%
10	88%
25	78%

実施例10 蛍光標識本モノクローナル抗体によるマイコプラズマ・ニューモニエ診断薬

- ① 実施例4で得たFITC標識本モノクローナル抗体8mg、BSA 500mg、塩化ナトリウム850mg、及びアジ化ナトリウム50mgを50mMリン酸塩緩衝液（pH7.0）100mlに溶解して褐色ガラス瓶に1mlずつ分注した。
- ② 実施例4で得たFITC標識本モノクローナル抗体2mg、

BSA 500 mg、塩化ナトリウム 850 mg、及びアジ化ナトリウム 50mg を 50mM リン酸塩緩衝液 (pH8.0) 100 ml に溶解して褐色ガラス瓶に 1 ml ずつ分注した。

- ③ 実施例 4 で得た FITC 標識本モノクローナル抗体 8 mg、BSA 2,000mg、塩化ナトリウム 850 mg、及びアジ化ナトリウム 50mg を 50mM リン酸塩緩衝液 (pH8.0) 100 ml に溶解して褐色ガラス瓶に 0.5 ml ずつ分注し、凍結乾燥後、窒素ガス置換を行った。

①、②、③の方法で製造した蛍光標識本モノクローナル抗体によるマイコプラズマ・ニューモニエ診断薬の安定性を表-6 に示す。

比較例① BSA 無添加 pH9.5 の緩衝液に抗体を 80 μ g/ml 溶解させた液。

比較例② pH9.5 の緩衝液に BSA 5 mg/ml、抗体を 80 μ g/ml 溶解させた液を褐色ガラス瓶に 0.5 ml ずつ分注し、凍結乾燥後、窒素ガス置換を行った。

表-6 マイコプラズマ・ニューモニエ診断薬の安定性
(初期値を 100 とする)

保存条件	①	②	③	比較例①	比較例②
冷蔵庫中 1 カ月	100	100	100	90	95
25℃ 1 カ月	100	98	98	15	40
40℃ 1 カ月	90	95	98	0	0

産業上の利用可能性

本発明によりマイコプラズマ・ニューモニエに優れた特異性を持つ抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗

体を、安価、簡便、高純度、高収率で大量に得られるようになった。またこの抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体又はその標識体の安定性を著しく高めることができ、診断薬として極めて有用となった。

請 求 の 範 囲

1. 抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体又はその標識体、及び当該抗体又は標識体に対して5~5,000重量倍のアルブミンを含有するマイコプラズマ・ニューモニエ診断用試薬。

2. 抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体又はその標識体、及び当該抗体又は標識体に対して5~5,000重量倍のアルブミンをpH 5.5~8.5の水性溶液に溶解した後凍結乾燥することにより得られる請求項1記載のマイコプラズマ・ニューモニエ診断用試薬。

3. 抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体又はその標識体を、当該抗体又は標識体に対して5~1,000重量倍のアルブミンを含有するpH 5.5~8.5の水性溶液に溶解することを特徴とする抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体の安定化法。

4. 抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体又はその標識体を、当該抗体又は標識体に対して5~5,000重量倍のアルブミンを含有するpH 5.5~8.5の水性溶液に溶解した後凍結乾燥することを特徴とする抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体の安定化法。

5. 抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清を2~20倍に濃縮し、次いで塩析して得られた画分をpH 6.0~7.5の緩衝液で洗浄後pH 8~10の緩衝液に溶解することを特徴とする、抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体の精製法。

補正された請求の範囲

[1991年8月9日(09.08.91)国際事務局受理;出願当初の請求の範囲3-5は補正された請求の範囲6-8に置き換えられた;新しい請求の範囲3-5が加わった;他の請求の範囲は変更なし。(2頁)]

1. 抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体又はその標識体、及び当該抗体又は標識体に対して5～5,000重量倍のアルブミンを含有するマイコプラズマ・ニューモニエ診断用試薬。
2. 抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体又はその標識体、及び当該抗体又は標識体に対して5～5,000重量倍のアルブミンをpH 5.5～8.5の水性溶液に溶解した後凍結乾燥することにより得られる請求項1記載のマイコプラズマ・ニューモニエ診断用試薬。
3. (追加) 10 μ g～200 μ g/mlの抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体又はその標識体、及び5.0mg～50 mg/mlのアルブミンをpH 5.5～8.5の水性溶液に溶解した後凍結乾燥することにより得られる請求項1記載のマイコプラズマ・ニューモニエ診断用試薬。
4. (追加) 抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体又はその標識体1～20重量部、及びアルブミン100～2,000重量部をpH 5.5～8.5の水性溶液に溶解することにより得られる請求項1記載のマイコプラズマ・ニューモニエ診断用試薬。
5. (追加) 10 μ g～200 μ g/mlの抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体又はその標識体を、1.0 mg～20 mg/mlのアルブミンを含有するpH 5.5～8.5の水性溶液に溶解することにより得られる請求項1記載のマイコブ

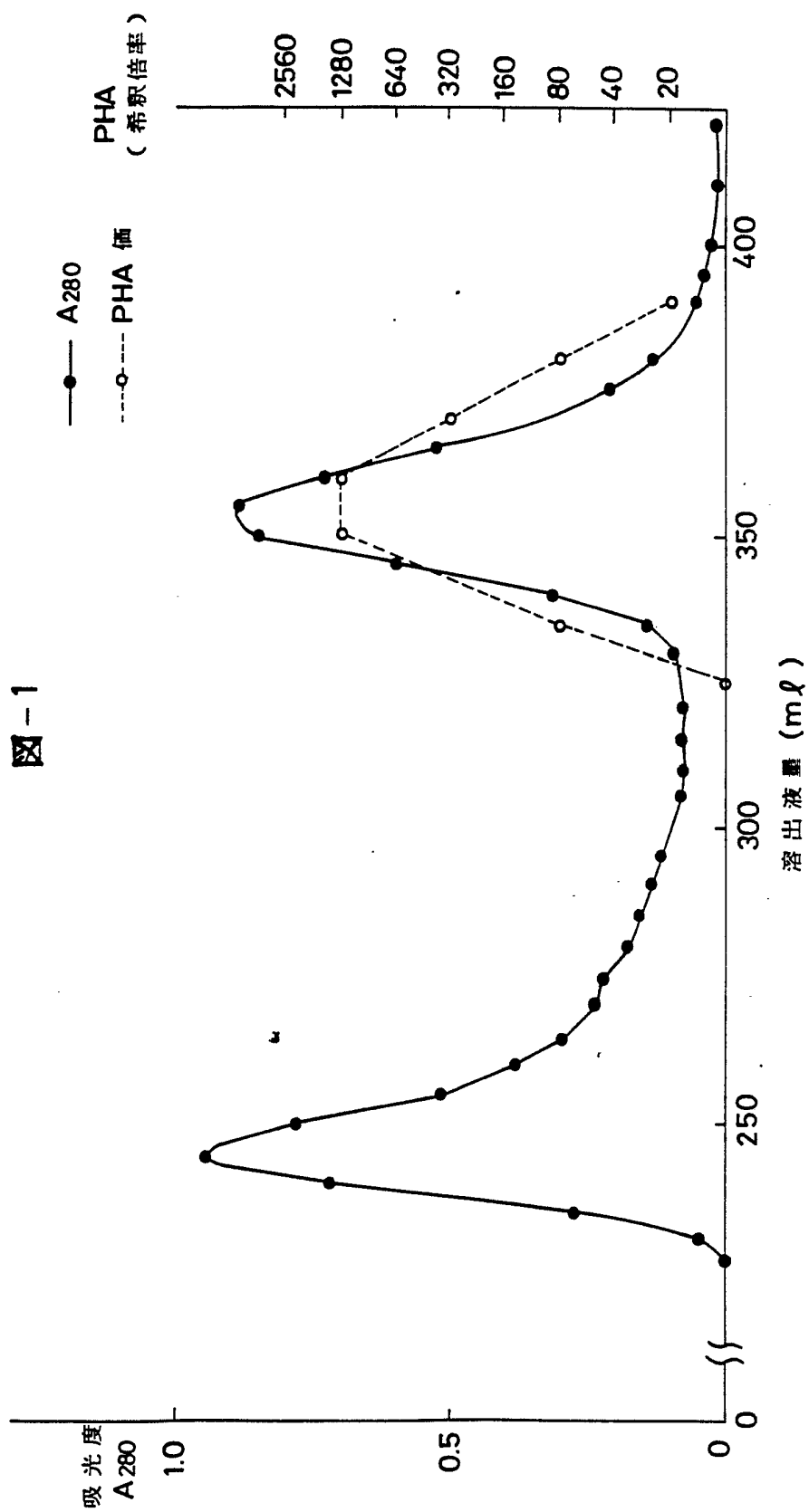
ラズマ・ニューモニエ診断用試薬。

6. (補正後) 抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体又はその標識体を、当該抗体又は標識体に対して5～1,000重量倍のアルブミンを含有するpH 5.5～8.5の水性溶液に溶解することを特徴とする抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体の安定化法。

7. (補正後) 抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体又はその標識体を、当該抗体又は標識体に対して5～5,000重量倍のアルブミンを含有するpH 5.5～8.5の水性溶液に溶解した後凍結乾燥することを特徴とする抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体の安定化法。

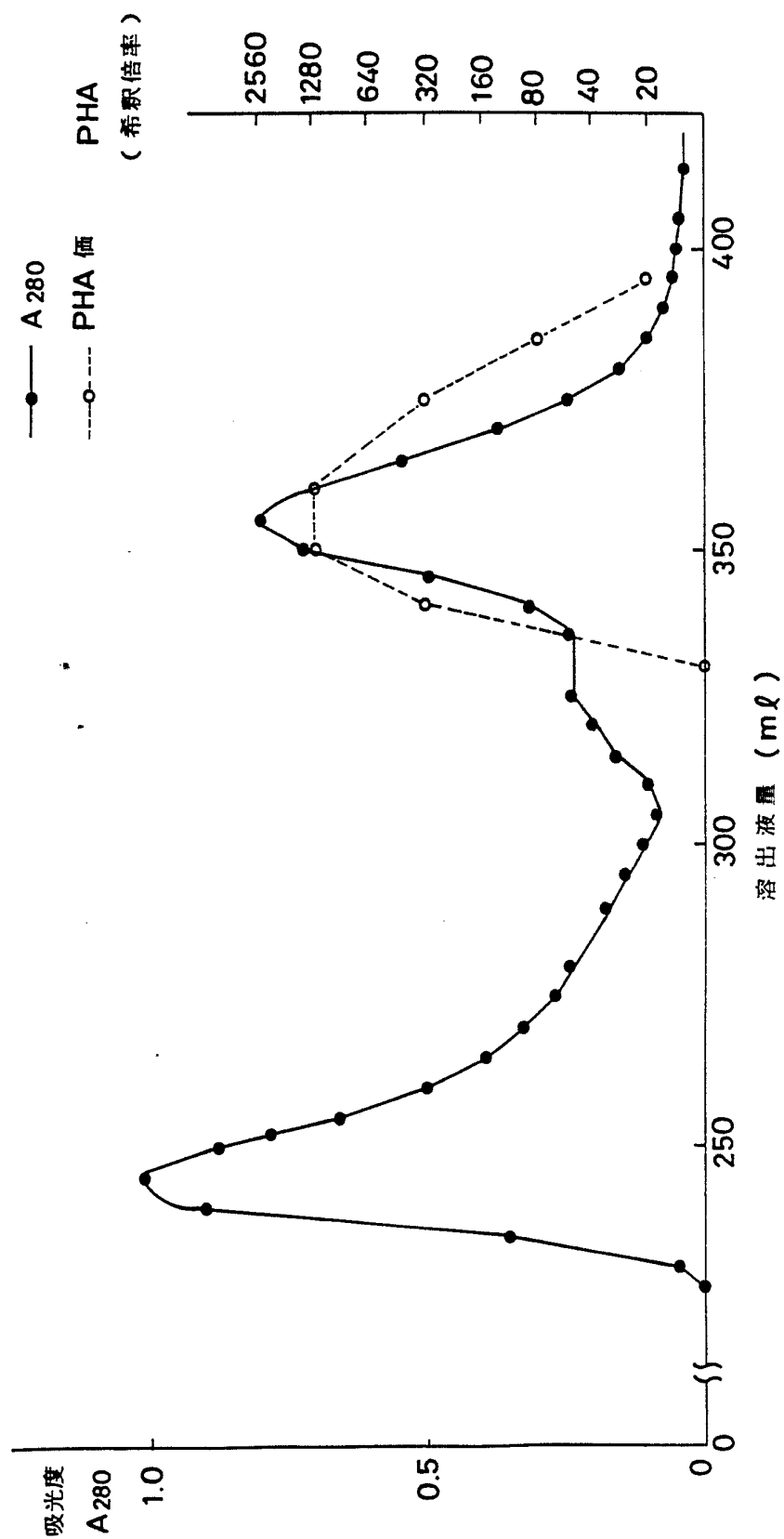
8. (補正後) 抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清を2～20倍に濃縮し、次いで塩析して得られた画分をpH6.0～7.5の緩衝液で洗浄後pH8～10の緩衝液に溶解することを特徴とする、抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体の精製法。

1 / 2



2 / 2

図 - 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP90/00926

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl ⁵	C12P21/08, G01N33/569//A61K39/395	
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C12P21/08, G01N33/569, 33/577, A61K39/395, C07K15/06, 15/28	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y/A	JP, A, 63-184064 (SS Pharmaceutical Co., Ltd.), 29 July 1988 (29. 07. 88), (Family: none)	1 - 4/5
Y	JP, A, 61-76423 (Abbot Laboratory), 18 April 1986 (18. 04. 86) & EP, A2, 170983 & US, A, 4650772	1 - 4
Y	JP, A, 57-145818 (South African Inventions Development Corp.), 9 September 1982 (09. 09. 82) & DE, A1, 2364792 & AT, A, 7400177	1 - 4
Y	JP, A, 62-289523 (The Green Cross Corp.), 16 December 1987 (16. 12. 87), (Family: none)	1 - 4
¹⁰ Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
October 11, 1990 (11. 10. 90)		October 29, 1990 (29. 10. 90)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
Japanese Patent Office		

国 際 調 査 報 告

国際出願番号PCT/JP90/ 00926

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. ⁴ C12P21/08, G01N33/569// A61K39/395		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分 類 体 系	分 類 記 号	
I P O	C12P21/08, G01N33/569, 33/577, A61K39/395, C07K15/06, 15/28	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
Y/A	JP, A. 63-184064 (エスエス製薬株式会社), 29. 7月. 1988 (29. 07. 88) (ファミリーなし)	1-4/5
Y	JP, A. 61-76423 (アボット ラボラトリーズ), 18. 4月. 1986 (18. 04. 86) & EP, A2, 170983 & US, A. 4650772	1-4
Y	JP, A. 57-145818 (サウスアフリカン・インヴ エンションズ・ディヴエロップメント・コーポレーション), 9. 9月. 1982 (09. 09. 82) & DE, A1, 2364792 & AT, A. 7400177	1-4
Y	JP, A. 62-289523 (株式会社 ミドリ十字), 16. 12月. 1987 (16. 12. 87) (ファミリーなし)	1-4
※引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の 日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出 願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解 のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新 規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の 文献との、当業者にとって自明である組合せによって進 歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリーの文献		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
11. 10. 90	29.10.90	
国際調査機関	権限のある職員	4 B 8 2 1 4
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	内 田 俊 生