(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4098796号
(P4098796)
(45)発行日　平成20年6月11日(2008.6.11)　(24)登録日　平成20年3月21日(2008.3.21)

(51)Int.Cl.　　F I
C12P 21/08 (2006.01)　　C12P 21/08
C07K 16/18 (2006.01)　　C07K 16/18

請求項の数 2　(全 6 頁)

(21)出願番号　特願2005-233741(P2005-233741)
(22)出願日　平成17年7月13日(2005.7.13)
(65)公開番号　特開2007-20547(P2007-20547A)
(43)公開日　平成19年2月1日(2007.2.1)
審査請求日　平成19年8月28日(2007.8.28)

早期審査対象出願

(73)特許権者　593039524
佐渡　義一
岡山県岡山市東畦６８０―１３
(74)代理人　110000338
特許業務法人原謙三国際特許事務所
(72)発明者　佐渡　義一
岡山県岡山市東畦６８０－１３

審査官　冨永　みどり

最終頁に続く

(54)【発明の名称】マウス腸骨リンパ節を用いたモノクローナル抗体の作製

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
モノクローナル抗体の作製方法であって、
マウスの尾根部に抗原を投与する第１工程、および
腫大した腸骨リンパ節をマウスから取り出す第２工程
を包含し、
第２工程が、第１工程開始後３０日以内に行われることを特徴とする作製方法。
【請求項２】
第１工程が単回または複数回行われることを特徴とする請求項１に記載の作製方法。
【発明の詳細な説明】
【発明の詳細な説明】

【技術分野】
【０００１】
本発明は生命科学に使用されるマウスモノクローナル抗体の作製方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
従来のマウスモノクローナル抗体の作製では抗原をアジュバントとともにエマルジョンを作製してマウス腹腔、尾の付け根（尾根部）、皮下、皮内などに投与する。さらに、数週間後に追加免疫を行い、腫大した脾臓をＢ細胞の起源として取り出し、ミエローマ細胞と

細胞融合を行う。生じた融合細胞から目的のモノクローナル抗体を産生するものをクローン選択し、その細胞を増殖させていた。ミエローマ細胞の融合相手として、脾臓細胞が用いられるのが普通であり、リンパ節細胞が用いられることは行われているが効率が悪いと考えられるために普及していない（非特許文献１参照）。

【非特許文献１】Ｃｅｌｌ　Ｓｔｒｕｃｔ．Ｆｕｎｃｔ．２０：１５１－１５６，１９９５

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００３】

脾臓細胞を用いる細胞融合では抗原の免疫に初回免疫注射のほか、追加免疫注射が少なくとも１回、通常は２回行われる。このため、最低でも１回の追加免疫注射用の抗原が必要であり、手間も必要である。また、抗原の追加注射による血清中の抗体価の上昇を確認することが通常行われる。しかし、脾臓細胞を用いる細胞融合を行って得られる目的の融合細胞の出現効率は低い（非特許文献１参照。）。

【０００４】

動物種が異なるが、ラットでは抗原エマルジョンを後肢足蹠に免疫投与して、腸骨リンパ節をＢ細胞の起源とする方法（ラットリンパ節法）が確立されている。この腸骨リンパ節を用いる方法はマウスの脾臓を用いる方法の約１０倍の効率である（特許文献１と非特許文献１参照。）。しかし、マウスでは抗原エマルジョンの後肢足蹠注射では腸骨リンパ節を腫大させることができなかった。動物種が異なるために起きる現象である。このためマウスは動物学的に近縁な種であるにもかかわらず、腸骨リンパ節を利用する方法はマウスではできなかった。

【特許文献１】特開平０６－２０９７６９

【０００５】

マウスでモノクローナル抗体を作製しなければならない必然性は、ラット由来の抗原に対する抗体は免疫寛容という現象から同種ラットでは作製ができないからである。多くの研究者がラットを研究に用いていることからマウスモノクローナル抗体の必要性は高い。

【０００６】

マウスでもリンパ節が使用できる方法があれば、ラットリンパ節法と同様の利点が期待できると考えられた。それは（１）抗原の免疫注射は１回で十分である。（２）抗原の免疫注射の２週間前後から細胞融合が可能である。（３）融合した場合の目的の融合細胞の出現効率が高い、という利点である（非特許文献１参照。）。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

本発明では抗原のエマルジョンをそれぞれ左右の尾根部に注射する。この注射により、免疫注射をしない場合は肉眼的に見つけることが困難なマウスの腸骨リンパ節を、短径１から２ｍｍ、長径２から３ｍｍの大きさに腫大させることができる。この腸骨リンパ節の中には感作Ｂ細胞が入っており、この腸骨リンパ節を使用することにより、ラットリンパ節法と同様の利点が得られる。

【０００８】

免疫注射により腫大した腸骨リンパ節の大きさは通常２匹のマウスから取り出したものが細胞融合１回に適した量である。適した量とは４枚の９６穴培養プレートに融合処理後の細胞を播いた場合、ウエル数の合計３８４個のうち約５０から１５０程度のウエルが陽性ウエルになる量である。これは、出現した陽性ウエルを、さらに別のスクリーニング方法、例えば凍結切片染色、ウエスタンブロットなどを用いて希望の特性をもっているものに絞り込むのに多過ぎず、また、少な過ぎない量だからである。

【０００９】

本発明では初回免疫注射後１４日から２１日の間が細胞融合に最適期間とし、２８日後でも脾臓法を上まわる目的の融合細胞が出現する（非特許文献１との比較）。このことから、初回免疫注射後から２８日後までは実施例１の結果から明らかに本発明の範囲であるが

、２８日以後も数日間はその効果が持続すると期待できるので、３０日以内は本発明の範囲である。

【００１０】

抗原注射を尾根部に行う方法は新しいものではない。初回の注射を尾根部に注射しても、最終的には脾臓を取り出して細胞融合の作製に用いることが行われている。しかし、尾根部に抗原を注射して、鼠径リンパ節ならびに腸骨リンパ節をまとめて細胞融合に用いた文献が一つだけある（非特許文献２参照）。だだし、その文献によると、決して目的の融合細胞の出現効率は脾臓法と比べ高くない、また、脾臓法の目的の融合細胞の出現数も通常の期待される範囲であった。

【非特許文献２】Ｃａｎｃｅｒ　Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ　Ｒｅｖ．１８：４２１－４２５，１９９９

【００１１】

非特許文献２における目的の融合細胞の出現の具体的数値は、鼠径と腸骨リンパ節を用いた場合は、１０匹のマウスを使用して４回の抗原注射を行い、４２個のクローンを得ている。同様の追加免疫を行った脾臓法では４匹のマウスで１３個のクローンを得ている。これらの比較から、鼠径と腸骨リンパ節の使用に利点があるとは記載されていない。むしろ、中和抗体を確立する目的でモノクローナル抗体を作製している点からは、鼠径と腸骨リンパ節を用いた方法は１０クローン中２個であるのに対し脾臓法では１３個中４個であることから、尾根部の注射方法は脾臓法に比べて利点がないと理解されている。尾根部に抗原を注射免疫しマウスの腸骨リンパ節が使用されている文献はこれ以外にない。

【００１２】

非特許文献２では３回の追加免疫を初回免疫注射のあとに行っている。このために、初回免疫後少なくとも６週間（４２日間）の時間が経過し、そのために、実施例１に示したように、目的の融合細胞の出現効率が低下したと考えられる。初回免疫後２１日以内、遅くとも、３０日以内に細胞を取り出すのが本発明の大切な点である。この点が非特許文献２との明らかな相違点である。

【００１３】

抗原の注射投与は初回免疫注射の１回で十分であるが、３０日以内であれば追加免疫注射を行うことは本発明の範囲である。

【００１４】

免疫の方法の中に尾根部注射が含まれており、かつ、腸骨リンパ節細胞が融合に含まれている場合は他のいかなる処置をマウスにほどこしても、また、腸骨リンパ節以外の細胞を加えても本発明の範囲に入る。

【００１５】

本発明の腸骨リンパ節を使用したモノクローナル抗体作製法を用いて作製されたモノクローナル抗体は本発明の範囲である。

【発明の効果】

【００１６】

本発明を用いると、ラットリンパ節法と同様に、（１）抗原の免疫注射は１回で十分であり、（２）抗原の免疫注射の２週間前後から細胞融合が可能であり、（３）融合した場合に目的の融合細胞の出現効率が高くなる。

【００１７】

本発明を用いた場合と従来のマウス脾臓法と比較すると（１）抗原の免疫注射が複数回であったのが、１回で済むことから抗原量の削減と手間の軽減になり、（２）抗原の免疫注射の２週間後から細胞融合が可能であることから、従来の脾臓法の４から６週間後に比べて、約２週間以上の時間の節約になり、（３）融合した場合の目的の融合細胞の出現率が従来の脾臓法の約１０倍になる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１８】

以下に、実施例を挙げてこの発明をさらに具体的に説明するが、この発明の技術的範囲は

これらの実施例に限定されるものではない。マウスは通常メスの使用が薦められる。これは単に、メスの方が集団で飼育し易いこと、ならびに、腸骨リンパ節が見つけ易いためであるが、オスでも問題なく使用できる。また、マウスの系統はＢＡＬＢ／ｃに限らない。Ｃ５７ＢＬ／６、Ｃ３Ｈなどの近交系マウスのほかクローズドコロニーのマウスでも問題なく使用できる。

【実施例１】

【００１９】

オボアルブミンを抗原として融合細胞を作製した場合：オボアルブミン（グレードＶＩＩ、シグマ社製）にアジュバントであるフロイント・コンプリート・アジュバントを混ぜ合わせてエマルジョンを作製して、マウス１匹あたり５０マイクログラムの抗原を、メスＢＡＬＢ／ｃマウスの左右の尾根部に１回、免疫注射した。腸骨リンパ節を１４日、２１日、２８日後に取り出し、それらを用いてポリエチレングリコール液を用いてＳＰ２ミエローマ細胞との細胞融合を行った。細胞融合後、細胞は４枚の９６穴培養プレートに播いた。融合１週間後に各ウエルの培養上清を取り出し、目的の抗体を産生しているかどうかを、オボアルブミンを解析抗原として吸着させたプレートを使用するエライザ法を用いて行った。エライザ法では発色の吸光度が０．３以上のものを陽性ウエルとした。この実施例は非特許文献１に準じて実験を行っているためこの文献との比較が可能である。

【００２０】

陽性ウエルは脾臓法では１０個程度だった（非特許文献１）のに比較して、本発明の方法では免疫注射１４日後の融合では１０３、１１９、１３０（平均１１７個）であった。２１日後の融合では７４、１２４、１２５個（平均１０８個）であった。２８日後の融合でも２３，３９、５３個（平均３８個）であった。図１には１４日後の１０３個の陽性ウエルが出現したときのエライザプレートの各ウエルの発色状態を吸光度の度数分布グラフで示した。陽性ウエル数は１４日後と２１日後において特に高い値をとり、２８日後では急速に減少した。しかし、２８日後でも脾臓法に比べると本発明の方法を用いた方が明らかに良好であったことがわかる。

【実施例２】

【００２１】

４型コラーゲンα２鎖の合成ペプチドを抗原にして融合細胞を作製した場合：実施例２では抗原がオボアルブミンのような天然の蛋白質に限らないことを示すものである。用いた抗原は４型コラーゲンのα２鎖の合成ペプチド（アミノ酸配列の英語１文字による表記では、アセチル－ＰＴＰＳＴＹＨＰＤＭＹＫＣ）をキャリヤー蛋白質であるスカシ貝ヘモシアニン（ＫＬＨ）に結合したものである。この合成ペプチド抗原の場合は、マウス１匹あたり１００マイクログラムの抗原を注射し、その１４日後に、腸骨リンパ節を取り出し、オボアルブミンと同様の細胞融合を行い、４枚の９６穴培養プレートに細胞融合を行った細胞を播いた。融合１週間後の培養上清を、合成ペプチドを解析抗原にしてエライザ法で分析したところ、吸光度が０．３を超える陽性ウエルが１２３出現した。このときのエライザプレートの各ウエルの発色状態を吸光度の度数分布グラフで示した（図２）。この陽性ウエル数はオボアルブミンの場合と同様に、本発明において、目的の融合細胞の出現効率が高いことを証明するものである。

【産業上の利用可能性】

【００２２】

モノクローナル抗体は生体内の特定の成分を同定、定量するのに使用される。生命科学の研究に用いられるほか、医療関係では病気の診断にも用いられる。また、モノクローナル抗体の中にはがん細胞の成長を抑制するもの、自己免疫疾患を惹起するものなど、生体に対して生理活性を有するものがあり、これらは病気の治療、治療法の開発に役立つものである。

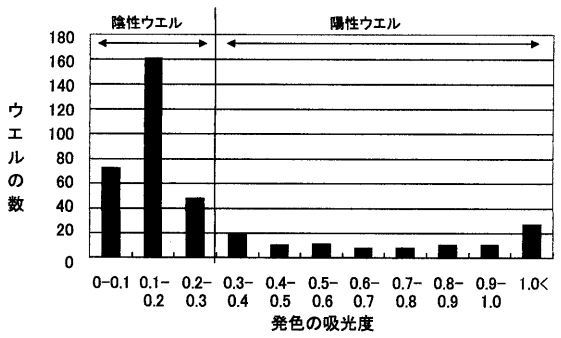
【図面の簡単な説明】

【００２３】

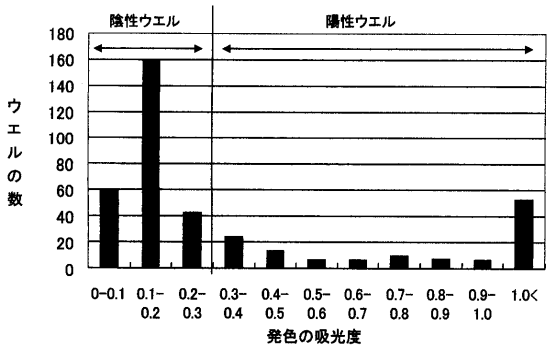
【図１】オボアルブミンを抗原にして、本発明の方法を用いて行った細胞融合により、多

くの陽性ウエルの出現を示したグラフ。
【図２】４型コラーゲンα２鎖の合成ペプチドを抗原にして、本発明の方法を用いて行った細胞融合により、多くの陽性ウエルの出現を示したグラフ。

【図１】



【図２】



フロントページの続き

(56)参考文献 Hybridoma and Hybridomics, 2003, Vol.22, No.5, p.329-331
Cell Biology International, 1996, Vol.20, No.1, pp.7-14
Journal of Immunological Methods, 1987, Vol.105, pp.235-243
Cell Structure and Function, 1995, Vol.20, pp.151-156
Hybridoma, 1999, Vol.18, No.5, pp.407-411

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｐ　２１／００

ＰｕｂＭｅｄ
ＪＳＴＰｌｕｓ（ＪＤｒｅａｍ２）