



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6 C07K 16/18, C12N 5/20 // 15/06, C12P 21/08	A1	(11) 国際公開番号 WO99/12972 (43) 国際公開日 1999年3月18日(18.03.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04035 (22) 国際出願日 1998年9月9日(09.09.98) (30) 優先権データ 特願平9/245203 1997年9月10日(10.09.97) JP (71) 出願人 ; および (72) 発明者 益山純一(MASUYAMA, Junichi)[JP/JP] 〒323-0829 栃木県小山市東城南1-15-8 Tochigi, (JP) (74) 代理人 弁理士 有賀三幸, 外(ARUGA, Mitsuyuki et al.) 〒103-0013 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 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST HUMAN MONOCYTES (54)発明の名称 ヒト単核球に対するモノクローナル抗体 (57) Abstract A monoclonal antibody against human monocytes which is capable of preventing the diapedesis of human monocytes after vascular endothelial cell adhesion; and hybridomas producing this antibody. This antibody is useful in clarifying the mechanism of the onset of inflammation and in diagnosing and treating inflammatory diseases.		

(57)要約

本発明は、ヒト単核球に対するモノクローナル抗体であって、ヒト単核球の血管内皮細胞接着後の血管外遊走を阻止する能力を有する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する。この抗体は、炎症発症機序の解明及び炎症疾患の診断、治療に有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	JP	日本	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KR	韓国	SD	スーダン		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン				

明 細 書

ヒト単核球に対するモノクローナル抗体

技術分野

本発明はヒト単核球に対するモノクローナル抗体であって、炎症反応の研究、治療に有用なヒト単核球の血管内皮細胞培養後の血管外遊走を阻止するモノクローナル抗体及びこれを産生するハイブリドーマに関する。

背景技術

炎症反応は生体防御の上で最も重要な生体反応であり、細菌やウイルス感染による組織障害を最小限に抑え、かつ組織修復を促進する。しかしまた炎症反応は自己免疫性疾患などの原因不明の難治性疾患のように生体にとって進行性の障害を引き起こすこともある。従って、炎症反応の機序や病態の解明はこれらの難治性疾患の治療に不可欠である。炎症反応の機序を考えるにあたって、末梢循環白血球の血管外組織への遊走は炎症の最も早期に見られる現象で、その制御は慢性炎症性疾患の治療戦略の重要な目標となっている。

モノクローナル抗体の使用や分子生物学的手法によって、白血球の血管外遊走の機序は精力的に研究され1990年代に入り大きな進歩があった。すなわち、白血球が血管外へ遊走する第一段階は白血球・内皮細胞間のセレクチンを介する緩い接着（ローリング）で始まり、次に白血球を介するインテグリンの活性化によって内皮細胞への強い接着が誘導されることが明らかになった。しかしながら、白血球の血管外遊走が完結するために必要な血管内皮細胞への接着後の白血球の遊走の機序については、CD31抗原がNK細胞、好中球、単球においてその因子であるという説があるものの、特に免疫反応において中心的な役割を果たすTリンパ球については全く不明である。Tリンパ球の血管内皮細胞への接着後の血

管外遊走については、接着した細胞がすべて遊走するわけではなく、明らかに選択性が働いている。このような選択性を決める因子は慢性炎症発症や進展に重要な役割を担っていることが強く推定される。その因子の実体や機能を明らかにすることは、炎症研究や炎症治療の開発には極めて重要で、多くの研究者が待ち望んでいるものである。このような因子を研究するにはその因子に対するモノクローナル抗体を得ることが有用であるが、今日まで未だ得られていない。

従って、本発明の目的はヒト白血球、特に単核球の血管内皮細胞接着後の血管外遊走に關与する因子に対するモノクローナル抗体を提供することにある。

発明の開示

そこで、本発明者は上記課題を解決すべく種々検討した結果、ヒト血管内皮細胞と接着性を有するヒト単核球、及びコラーゲンゲル上で単層培養されたヒト血管内皮細胞からゲル内へ遊走したヒト単核球を組み合わせて抗原として用い、また抗体のスクリーニングではコラーゲンゲル上に培養した血管内皮細胞でTリンパ球の接着・遊走の阻止を判定することにより、ヒト単核球の血管内皮細胞接着後の血管外遊走を阻止するモノクローナル抗体が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、ヒト単核球に対するモノクローナル抗体であって、ヒト単核球の血管内皮細胞接着後の血管外遊走を阻止する能力を有するモノクローナル抗体を提供するものである。

また、本発明は上記の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。

図面の簡単な説明

図1は、健常人の顆粒球、単球及びリンパ球の蛍光強度（本発明モノクローナル抗体との反応性）を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、ヒト単核球を抗原として用いる細胞融合法、すなわちヒト単核球で免疫された哺乳動物の抗体産生細胞と哺乳動物の骨髓腫細胞とを融合させることにより得られる。

ここで免疫される哺乳動物としては、マウス、ウサギ、ラット、ヤギ、ニワトリ等が挙げられるが、マウスがより好ましい。

抗原としてはヒト単核球であればよいが、ヒト血管内皮細胞と接着するヒト単核球（a）と、コラーゲンゲル上で単層培養されたヒト血管内皮細胞からゲル内へ遊走したヒト単核球（b）とを組み合わせる使用するのが好ましく、（a）を感作用抗原とし、（b）を最終免疫用抗原として用いるのが特に好ましい。ヒト単核球は、末梢血、関節液、胸水等から得ることができるが、末梢血から採取したものが好ましい。

免疫方法は一般的手法に従うことができ、例えば上記の抗原単核球を通常の緩衝液や生理食塩水に懸濁させたもの、あるいはこれとフロイドのアジュバンドとの混合液を哺乳動物に腹腔内、皮下等の適当な経路で投与して一時刺激後、必要に応じて同様の操作を繰返せばよい。本発明においては、前記（a）の単核球を腹腔内投与で4回以上、前記（b）の単核球を最終免疫として静脈内投与するのが好ましい。抗原とする単核球の投与量は、投与経路、哺乳動物の種類等に応じて適宜決定されるが、マウスに腹腔内又は静脈内投与する場合は、通常投与量が1回あたり 1×10^7 個/マウス程度とするのが適当である。

最終免疫から2～4日後に抗体産生細胞、例えば脾臓細胞、リンパ節、末梢血等を採取する。抗体産生細胞としては脾臓細胞が好ましい。

骨髓腫細胞（ミエローマ細胞）としては、既に確立されている公知の各種細胞株、例えばマウスにおけるP3/NS1/1-Ag4-1(NS1)、SP2/0-Ag14(SP2)、P3/x63-Ag8(x63)、P3/x63-Ag8.U1(P3U1)、F0、MCP-11、x63.653、S194等、またラット

における210, RCY3, Ag1, 2, 3(Y3)等が使用できる。

上記抗体産生細胞と骨髓腫細胞との融合反応は、公知の方法、例えばポリエチレングリコール法、電気融合法等により行なわれる。

融合後、抗体産生能と増殖能を獲得したハイブリドーマの選択は、例えばHAT培地で数日～数週間培養することにより行なわれる。

かくして得られるハイブリドーマから、目的とする抗体の産生株の検索を行なう。該目的抗体産生株の検索は、ヒト単核球の血管内皮細胞接着後の遊走能を測定することにより行なわれる。すなわち、ヒト単核球と血管内皮細胞との接着は阻止せず、かつ接着後の遊走を阻止するハイブリドーマを選択する。

選択したハイブリドーマのクローニングは、限界希釈法やソーターローン法等により行なうことができるが、限外希釈法によるのが好ましい。

かくして得られるハイブリドーマは、通常の培地で継代培養でき、また液体窒素中で容易に長期間安定に保存することができる。

上記ハイブリドーマからの本発明モノクローナル抗体の製造は、常法に従い該ハイブリドーマを培養し、培養上清から分離する方法、あるいは上記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、増殖させ、該動物の腹水より分離する方法等の通常の方法により実施できる。前者の方法は特に高純度のものを得るのに適しており、後者の方法は大量生産に適している。

上記で製造された本発明のモノクローナル抗体は、さらに精製することもでき、例えば硫酸分画法、DEAEセルロースカラムクロマトグラフィー等のゲル濾過法などの通常の方法によりイムノグロブリン画分を単離することにより本発明のモノクローナル抗体を取得できる。

実施例

次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

実施例 1

(1) 抗原の調製

抗原はヒト末梢血単核球を動物に免疫する前にヒト臍帯静脈内皮細胞と共培養し、非接着性単核球を除いた残りの単核球 (a) を使用した。ただし最終免疫においては、タイプ 1 コラーゲンゲル上に単層培養したヒト臍帯静脈内皮細胞に単核球を添加し、5 時間後に単層内皮細胞下のコラーゲンゲル内へ遊走した単核球 (b) を単離し、これを抗原として用いた。すなわち、タイプ 1 コラーゲンの最終濃度を 0.8 mg/ml にしたゲル状培養液を 60 mm のプラスチックペトリディッシュに 2 ml 作り、この上に内皮細胞増殖因子を含む培養液に浮遊させたヒト臍帯静脈内皮細胞を加え単層になるように培養した。完全に単層になったのち、単核球を添加培養した。一定時間後、コラーゲンゲル上の内皮細胞とゲル内へ遊走しなかった単核球を 0.4% EDTA で除去したのち、コラーゲンゲルをコラーゲナーゼ処理し、ゲル内へ遊走した単核球 (b) を単離した。

(2) 免疫

上記単核球 (a) をリン酸緩衝液に浮遊させ、マウスの場合 1 匹あたり 1×10^7 個を腹腔内へ注入した。これを 2~4 週ごとに 4 回以上繰返した。最終免疫は、上述したようにコラーゲンゲル内から単離した約 1×10^7 個の遊走単核球 (b) をマウス静脈内へ直接投与した。最終免疫 2~4 日後にマウスから脾臓を摘出して抗体産生細胞を含む 1×10^8 個の脾臓細胞浮遊液を調製し、ミエローマ細胞株との融合に供した。この細胞株は 10% ウシ胎仔血清 (FCS) を含む RPMI-1640 培地で継代培養し、調製した脾臓細胞数の 5~10 分の 1 を使用した。

(3) 細胞融合

イスコフ培地に懸濁した P3/NS1/1-Ag4-1 (NS-1) を 2×10^7 個と上記脾臓細胞 1×10^8 とを混合、遠心し、上清を吸引したのち、 37°C に保温したポリエチレングリコール 4000、 1 ml を緩徐に滴下した。次に、イスコフ培地をさらに

計 10 ml になるまで同様に添加し、これを遠沈したのち、ポリエチレングリコールを含む上清を吸引した。細胞ペレットをインターロイキン 6 を添加した HAT 培地で脾臓細胞が $1 \times 10^6 / \text{ml}$ になるように調製し、これを 1 穴あたり 0.1 ml を 96 穴平底プラスチックプレートに撒き、ハイブリドーマが十分増殖するまで 37°C にて培養した。

(4) スクリーニング

選択されたハイブリドーマ群の培養上清を、ヒト単核球の血管内皮細胞接着後の遊走を測定する系を用いて、目的とする抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。すなわち、(1) で記述した方法を応用し、96 穴平底プラスチックプレートに添加したコラーゲンゲル $50 \mu\text{l}$ の上に単層培養したヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた。このように用意したプレートにハイブリドーマ上清を $50 \mu\text{l}$ とヒト単核球浮遊液 $50 \mu\text{l}$ を加え培養した。一定時間後、非接着細胞を除去し、位相差顕微鏡で内皮細胞への単核球接着状態をハイブリドーマ培養上清未添加のコントロールと比較し、差のないものを選択した。次に、選択した穴の内皮細胞を 0.4% EDTA 溶液にてコラーゲンゲルより除去後、ゲル内へ遊走した単核球数を位相差顕微鏡下で測定した。コントロールに比べ、50% 以上遊走を抑制したハイブリドーマを目的の抗体を産生しているものとして選択した。

(5) 抗体産生ハイブリドーマのクローニング

選択したハイブリドーマのクローニングには限界希釈法を利用した。遊走抑制率の高い抗体を産生するハイブリドーマについて限界希釈法を 3～4 回繰返し、安定して抗体価の高いハイブリドーマを選択し、これを該抗体産生ハイブリドーマ株とした。

(6) 抗体の精製

得られたハイブリドーマ株を IL-6 を含む増殖培地に浮遊させて増殖させたのち、これを同系統のマウスの腹腔内へ注入して腹水を得た。次に、プロテイン

Aカラムを使って腹水からIgG画分を精製した。

上記で得られたモノクローナル抗体4C8は、そのイソタイプがIgG3で、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でTリンパ球及びTリンパ球を含む単核球の内皮細胞接着後の内皮細胞下への遊走をおよそ80%～90%阻止した。

得られた本発明のモノクローナル抗体の性質を検討した。その結果、本発明モノクローナル抗体は、(1) ヒトリンパ球、NK細胞、単球、好酸球を含む顆粒球、及び血管内皮細胞など接着性細胞に反応する；(2) アクチン重合など細胞骨格蛋白質に変化を与える；(3) ヒトリンパ球にケモカイン様又は化学走化性物質様の遊走刺激を与える；(4) ヒトリンパ球の基質への接着を惹起させる；(5) CD69抗原など細胞活性化関連分子の発現を誘導する；(6) 好酸球を含む顆粒球に反応し、細胞活性化を刺激する；(7) 抗リウマチ薬投与による慢性関節リウマチ患者単核球、顆粒球の4C8発現を抑制する；(8) 悪性腫瘍細胞に反応する等の作用を有することが判明した。次に、各項目についてその方法と結果を記載する。

1) ヒトリンパ球、NK細胞、単球、好酸球を含む顆粒球、及び血管内皮細胞と反応する。

方法：モノクローナル抗体4C8を蛍光標識キットで蛍光標識したのち、抗凝固剤を添加した採血管に採取した末梢血0.1mlにこれを適当量を加え、氷上で30分静置した。これを氷冷した0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)添加リン酸緩衝液(PBS)で3回洗浄後、溶血剤にて溶血させ、さらにパラホルムアルデヒドで固定した。血管内皮細胞は0.4%EDTA処理でプラスチックプレートより剥離させ、 3×10^5 個を白血球と同様に染色した。これら染色した細胞はフローサイトメトリーにて、顆粒球、単球、リンパ球各画分にゲーティングを行ない、それぞれの蛍光強度を測定した。

結果：図1に示すように、健常者のリンパ球・単球は、人により異なるが、90%以上の細胞が4C8抗原を発現し、リンパ球が最も強い蛍光強度を示し、

単球がそれに続いた。リンパ球画分には約10%のNK細胞を含むのでNK細胞もこの分子を発現しているのは明らかである。一方、顆粒球ではほとんど発現していなかった。しかし、慢性関節リウマチやその他の慢性炎症性疾患の一部の患者では顆粒球の4C8抗原の明らかな発現がみられた。また、アトピー性疾患では好酸球に同様の発現がみられた。また、接着性細胞、例えば血管内皮細胞では、増殖が止まった状態では発現がみられなかったが、増殖中の細胞では明らかな発現細胞集団がみられた。

2) アクチン重合など細胞骨格蛋白質に変化を与える。

方法：3～30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製抗4C8抗体又はコントロールIgG3を100 $\mu\text{l}/\text{well}$ で18時間、4℃で処理した96穴平底プラスチックプレートを用意した。健常人末梢血から比重遠沈法にて単核球を採取し、次にこれのナイロンウールカラム素通り分画をリンパ球とし、10%FCSを含むRPMI-1640培地に懸濁した。リンパ球 3×10^5 個を用意したプレートの各穴に添加し、1～3時間37℃で培養した。培養後、ピペットで細胞をよく吹き付けて採取し、これをPBSで1回洗浄した。Phalloidinは重合したアクチン、すなわちフィラメントアクチンに特異的に結合するので、蛍光標識したPhalloidinを3%パラフォルムアルデヒドで固定した単核球に処理し、その結合程度をフローサイトメトリーで調べた。

結果：フローサイトメトリーでゲーティングしたリンパ球画分では、Phalloidin陽性細胞数はコントロールIgG3で20%前後であったが、抗4C8抗体処理プレートでは濃度依存性にPhalloidin陽性細胞は増加し、最大65%に達した。これより、4C8抗原を介する刺激はリンパ球にアクチンの重合を誘導することが明らかになった。

3) ヒトリンパ球にケモカイン様の遊走刺激を与える。

方法：リンパ球表面上の4C8抗原の刺激によってリンパ球の遊走が誘導されるかを調べるため、抗4C8抗体をリガンドとして使用した。すなわち、96穴

平底プレートに抗 4 C 8 抗体を種々の濃度で混ぜたコラーゲンゲルを作り、これに血清を含まない M 1 9 9 培地に浮遊させたリンパ球 3×10^5 個を各穴に添加した。3 時間の培養後、0.4 % EDTA を加え、ゲル上に付着したリンパ球を除去し、位相差顕微鏡下でゲル内に遊走した単位面積当たりのリンパ球数を数えた。

結果：抗 4 C 8 抗体 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で遊走刺激がみられ、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で最大ではコントロールの 8 倍に達した。しかし、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の高濃度では再びコントロールレベルに戻り、ケモカインや化学走化性因子のように 1 峰性の濃度依存性を示した。以上より、4 C 8 抗原を介する刺激はリンパ球に遊走を誘導することが明らかになった。

4) ヒトリンパ球の基質への接着を惹起させる。

方法：2) に示したごとく抗 4 C 8 抗体を処理したプレートをさらに 3 % BSA を 2 時間、 37°C で処理した。これに、 ^{51}Cr で標識したヒトリンパ球を 3×10^5 個添加し、1 時間、 37°C で培養した。培養後、非接着細胞を除去し、接着細胞を 1 N の NaOH で溶解させたのちガンマカウンターにてその放射活性を測定した。添加した細胞全体の放射活性とコントロール穴での放射活性の差を分母とし、また 4 C 8 抗体処理穴の放射活性とコントロール穴での放射活性の差を分子として割り出した値を 100 倍したものを % 接着率とした。

結果：抗 4 C 8 抗体 $1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、濃度依存性に細胞接着は増加し、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ で約 60 % の細胞がプレートへの接着を示した。一方、コントロール IgG 3 では全濃度で細胞接着は 5 % 以下であった。4 C 8 抗原を介する刺激はリンパ球に基質への接着を著しく高めることが明らかになった。

5) CD 6 9 抗原など細胞活性化関連分子の発現を誘導する。

方法：2) に示したごとく抗 4 C 8 抗体を処理したプレートを用意し、これに同様に調製したヒトリンパ球を添加した。1 時間培養後、リンパ球を採取し蛍光標識抗 CD 6 9 モノクローナル抗体で染色したのち、フローサイトメトリーで蛍

光強度を測定した。

結果：コントロールでは約2%の陽性率に対し、抗4C8抗体では約20%の細胞が、とくにCD26陽性Tリンパ球において、CD69陽性となった。この陽性率は培養時間の延長によって増加した。4C8抗原の刺激はリンパ球の活性化を惹起することが明らかになった。

6) 好酸球を含めた顆粒球に反応し、細胞活性化を刺激する。

方法：4C8抗原は健常人顆粒球では発現しないが、慢性関節リウマチ患者などでは発現する。そこでこのような患者から顆粒球を採取し、4C8抗原の刺激が顆粒球を活性化させるか調べた。すなわち、末梢血を1%デキストラン硫酸に1:0.75の割合で混合し、40～50分静置したのち上層をとり、これをFicoll-Conray液へ重層した。30分遠沈後、上清を吸引して細胞ペレットをPBSでさらに4℃下で3回洗浄した。最後に顆粒球をRPMI-1640培地に浮遊させた。これを、2)に示したごとく抗4C8抗体を処理したプレートに添加した。30分後、これらの細胞を採取し、細胞活性化により発現が増強するCD11b抗原を蛍光標識抗CD11b抗体を用いフローサイトメトリーで調べた。

結果：抗4C8抗体の濃度が高くなるにしたがい、顆粒球表面のCD11b抗原の平均蛍光強度が有意に増強された。すなわち、4C8抗原を介する刺激は顆粒球を活性化することが明らかになった。

7) 抗リウマチ薬投与による慢性関節リウマチ患者単核球・顆粒球の4C8発現抑制効果。

方法：リウマチ患者末梢血単核球及び顆粒球を蛍光標識抗4C8抗体で染色後、フローサイトメトリーにてリンパ球・単球・顆粒球の各分画の4C8発現の平均蛍光強度を測定した。

結果：抗リウマチ薬が奏功したリウマチ患者では、未治療または活動期の患者に比べ、単核球の4C8抗原は減弱し、とくに単球4C8抗原の発現は約1/4

に著しく減弱していた。また一部の活動期リウマチ患者の顆粒球に発現した 4 C 8 抗原は治療により消失した。すなわち、抗リウマチ薬の薬理作用の解明のほか、リウマチ患者の単球などの 4 C 8 の発現を調べることにより抗リウマチ薬の効果判定や予測など臨床的な応用が可能である。

8) 悪性腫瘍細胞株に反応する。

方法：悪性リンパ腫由来の細胞株SKW3とJurkatを蛍光標識抗 4 C 8 抗体で処理し、その 4 C 8 抗原の発現をフローサイトメトリーで調べた。

結果：Jurkatには 4 C 8 抗原は発現しなかったが、SKW3では 85 % の細胞に 4 C 8 抗原が陽性であった。ある種の腫瘍細胞には 4 C 8 抗原が存在することが明らかになった。

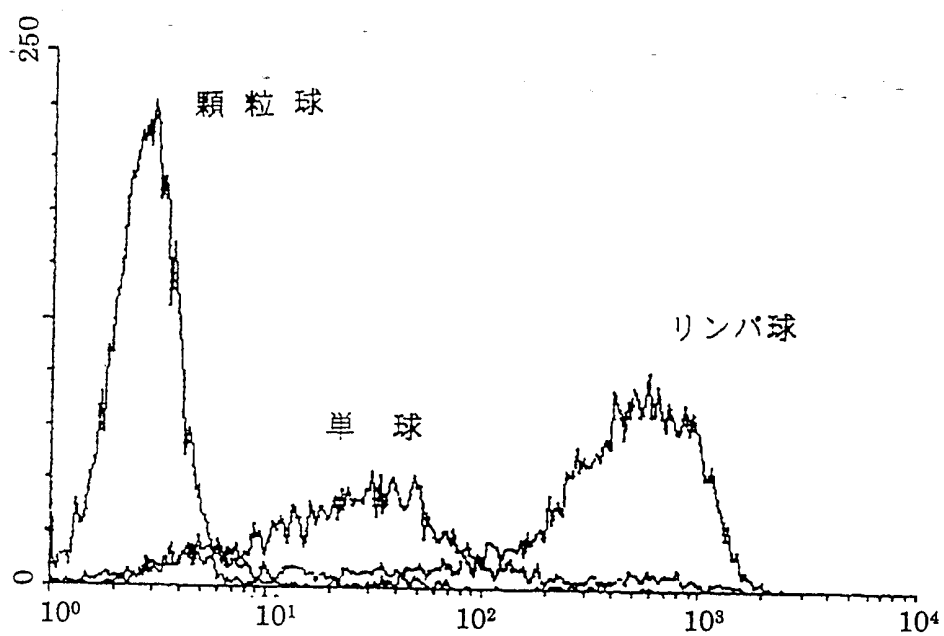
産業上の利用可能性

これまで、炎症を代表とする白血球の血管内皮細胞接着後の血管外遊走や悪性腫瘍の転移の機序については多くは未だ不明のままであるが、本発明によって、これらの機序が細胞、蛋白質、及び分子レベルで解析することが可能となった。また、本発明抗体によって認識される分子の発現がさまざまな病態や疾患と関連していることから、臨床診断・治療への応用が可能である。

請 求 の 範 囲

1. ヒト単核球に対するモノクローナル抗体であって、ヒト単核球の血管内皮細胞接着後の血管外遊走を阻止する能力を有するモノクローナル抗体。
2. ヒト血管内皮細胞と接着するヒト単核球を感作用抗原とし、コラーゲンゲル上で単層培養されたヒト血管内皮細胞からゲル内へ遊走したヒト単核球を最終免疫用抗原として免疫された哺乳動物の抗体産生細胞と哺乳動物の骨髓腫細胞との融合細胞により産生されるものである請求項1記載のモノクローナル抗体。
3. 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。
4. ヒト血管内皮細胞と接着するヒト単核球を感作用抗原とし、コラーゲンゲル上で単層培養されたヒト血管内皮細胞からゲル内へ遊走したヒト単核球を最終免疫用抗原として免疫された哺乳動物の抗体産生細胞と哺乳動物の骨髓腫細胞とを融合させることにより得られるものである請求項3記載のハイブリドーマ。

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04035

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁶ C07K16/18, C12N5/20 // C12N15/06, C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁶ C07K16/18, C12N5/20, C12N15/06, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Atherosclerosis vol. 108 No. 1 (1994) Takahashi Masafumi et al., "Involvement of adhesion molecules in human monocyte adhesion to and transmigration through endothelial cells in vitro" p.73-81	1-4
A	FASEB Journal vol. 9 No. 3 (1995) Naziruddin B et al., "A human endothelial-monocyte specific monoclonal antibody (SK2H10) induces intracellular Ca-2+ flux in monocytes" p.499	1-4
A	J IMMUNOL vol. 137 No. 2 (1986) ZWADLO G et al., "A MONOCLONAL ANTIBODY TO A SUBSET OF HUMAN MONOCYTES FOUND ONLY IN THE PERIPHERAL BLOOD AND INFLAMMATORY TISSUES" p.512-518	1-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* 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 when the document is taken alone

"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

Date of the actual completion of the international search
11 December, 1998 (11. 12. 98)

Date of mailing of the international search report
22 December, 1998 (22. 12. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C 07 K 16/18, C 12 N 5/20//C 12 N 15/06, C 12 P 21/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C 07 K 16/18, C 12 N 5/20, C 12 N 15/06, C 12 P 21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

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	関連する 請求の範囲の番号
A	Atherosclerosis vol.108 No.1 (1994) Takahashi Masafumi et al. "Involvement of adhesion molecules in human monocyte adhesion to and transmigration through endothelial cells in vitro" p.73-81	1-4
A	FASEB Journal vol.9 No.3 (1995) Naziruddin B et al. "A human endothelial-monocyte specific monoclonal antibody (SK2H10) induces intracellular Ca-2+ flux in monocytes" p.499	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 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」 国際出願日前の出願または特許であるが、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文献

国際調査を完了した日

11.12.98

国際調査報告の発送日

22.12.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4 B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
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	関連する 請求の範囲の番号
A	J IMMUNOL vol.137 No.2 (1986) ZWADLO G et al. "A MONOCLONAL ANTIBODY TO A SUBSET OF HUMAN MONOCYTES FOUND ONLY IN THE PERIPHERAL BLOOD AND INFLAMMATORY TISSUES" p. 512-518	1 - 4