

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02007/097065

発行日 平成21年7月9日(2009.7.9)

(43) 国際公開日 平成19年8月30日(2007.8.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07F 5/02 (2006.01)	C07F 5/02 CSPE	4B024
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47 ZNA	4B064
C07K 16/44 (2006.01)	C07K 16/44	4B065
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 B	4H045
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4H048
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く		

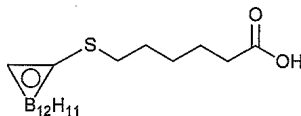
出願番号 特願2007-511118 (P2007-511118)	(71) 出願人 503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2006/319977	
(22) 国際出願日 平成18年10月5日(2006.10.5)	
(11) 特許番号 特許第4057046号 (P4057046)	(71) 出願人 505127721 公立大学法人大阪府立大学 大阪府堺市中央区学園町1-1
(45) 特許公報発行日 平成20年3月5日(2008.3.5)	
(31) 優先権主張番号 特願2006-46950 (P2006-46950)	(71) 出願人 000162847 ステラケミファ株式会社 大阪府大阪市中央区淡路町3丁目6番3号 NMプラザ御堂筋
(32) 優先日 平成18年2月23日(2006.2.23)	(74) 代理人 100105717 弁理士 尾崎 雄三
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(74) 代理人 100104422 弁理士 梶崎 弘一
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハプテン化合物および抗体

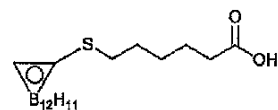
(57) 【要約】

本発明は、下記式(1)：

【化1】



(1)



(1)

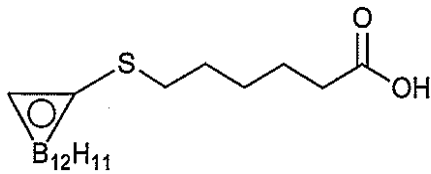
で表わされる構造を有する化合物、前記化合物をハプテンとし、当該ハプテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることにより得られるBSHに対する抗体である。本発明を用いることにより、BSHを高感度かつ高選択的に認識する抗体を作製するためのハプテン化合物、BSHに対する抗体、ならびに当該抗体を用いた高感度かつ定量性に優れたBSHの測定用キットおよび免疫学的測定方法を提供することが可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式(1)：

【化 1】



(1)

で表わされる構造を有する化合物。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の化合物をハブテンとし、当該ハブテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることにより得られるメルカプトウンデカヒドロドデカボレート (BSH) に対する抗体。

【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 に記載の抗体。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 5】

前記ハイブリドーマが Hybridoma BSF-2 (受領番号 ABP-10689) である請求項 4 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 6】

請求項 3 に記載のモノクローナル抗体を含むメルカプトウンデカヒドロドデカボレート (BSH) の測定キット。

【請求項 7】

請求項 3 に記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とするメルカプトウンデカヒドロドデカボレート (BSH) の測定方法。

【請求項 8】

請求項 6 に記載のキットを用いることを特徴とするメルカプトウンデカヒドロドデカボレート (BSH) の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、メルカプトウンデカヒドロドデカボレート (BSH) のハブテン化合物、BSH に対する抗体、およびそれを用いる免疫学的測定方法等に関し、特にホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) に用いられる中性子捕捉療法剤の検出、定量に有用である。

【背景技術】

【0002】

近年、放射性アイソトープを利用した新しい癌の治療方法として、ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) が注目を集めている。ホウ素中性子捕捉療法は、ホウ素 10 同位体 (¹⁰B) を含むホウ素化合物をガン細胞に取り込ませ、低エネルギーの中性子線 (たとえば熱中性子) を照射して、細胞内で起こる核反応により局所的にガン細胞を破壊する治療方法である。この治療方法では、¹⁰B を含むホウ素化合物をガン組織の細胞に選択的に蓄積させることが、治療効果を高める上で重要であるため、ガン細胞に選択的に取り込まれるホウ素化合物を開発することが必要となる。

【0003】

従来までに、BNCT に用いる薬剤として基本骨格にホウ素原子またはホウ素原子団を導入したホウ素含有化合物が合成されている。実際の臨床で用いられている薬剤としては、p-ボロノフェニルアラニン (BPA) やメルカプトウンデカヒドロドデカボレート

10

20

30

40

50

(BSH)がある。このうち、BSHはナトリウム塩の形で主に脳腫瘍の治療に用いられ、その有用性が確認されている(たとえば、非特許文献1~8参照)。

【0004】

【非特許文献1】I. M. Wyzlic̄, Tetrahedron Lett., 1992, 33, 7489-7490,

【非特許文献2】W. Tjark, J. Organomet. Chem., 2000, 614-615, 37-47,

【非特許文献3】K. Imamurā, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1997, 70, 3103-3110.

【非特許文献4】A. S. Al-Madhorn̄, J. Med. Chem., 2002, 45, 4018-4028,

【非特許文献5】F. Compostellā, Res. Develop. Neutron Capture Ther., 2002, 81-84,

【非特許文献6】S. B. Kahl̄, Progress in Neutron Capture Therapy for Cancer, Plenum Press, New York 1992, 223,

【非特許文献7】J. Caī, J. Med. Chem., 1997, 40, 3887-3896,

【非特許文献8】H. Lim̄, Res. Develop. Neutron Capture Ther., 2002, 37-42

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、BNCTに伴うBSHの生体内挙動、特に細胞表層や細胞のミクロ分布についての詳細は未だ明らかとはなっておらず、BSHの生体内挙動を簡便かつ迅速に定性、定量できる方法の開発が強く望まれている。BSHの検出、定量方法として、免疫学的測定方法が期待されているが、BSHのような低分子無機化合物は、分子量・体積が小さいことや、イオン化し易いといった理由のため抗原性が低く、BSHを高感度で検出する抗体はこれまで得られていない。

【0006】

そこで、本発明の目的は、BSHを高感度かつ高選択的に認識する抗体を作製するためのハプテン化合物、BSHに対する抗体、ならびに当該抗体を用いた高感度かつ定量性に優れたBSHの測定用キットおよび免疫学的測定方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

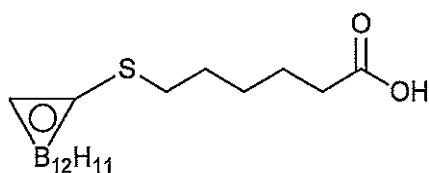
【0007】

本発明者らは、上記目的を達成すべく、BSHの側鎖SH基にリンカーを結合したハプテン化合物に着目して鋭意研究を重ねた結果、以下に示すハプテン化合物、抗体、ハイブリドーマ等が上記目的を達成できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明は、下記式(1)：

【化1】



(1)

で表わされる構造を有する化合物に関する。

【0009】

本発明は、前記化合物をハプテンとし、当該ハプテンと高分子化合物との複合体を抗原

として用いることにより得られるメルカプトウンデカヒドロドデカボレート (B S H) に対する抗体に関する。前記抗体は、モノクローナル抗体であることが好ましい。

【 0 0 1 0 】

本発明は、前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。前記ハイブリドーマは、Hybridoma B S F - 2 (受領番号 A B P - 1 0 6 8 9) であることが好ましい。

【 0 0 1 1 】

本発明は、前記モノクローナル抗体を含むメルカプトウンデカヒドロドデカボレート (B S H) の測定キットに関する。

【 0 0 1 2 】

また、本発明は、前記モノクローナル抗体または前記キットを用いることを特徴とするメルカプトウンデカヒドロドデカボレート (B S H) の測定方法に関する。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 3 】

本発明の化合物は、B S H ハプテンとして好適に用いられるものである。当該ハプテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることにより、動物において B S H に対する免疫応答を良好に惹起することができ、特異的かつ高感度な B S H 抗体を得ることができる。

【 0 0 1 4 】

本発明の抗体は、特異的かつ高感度に B S H を検出することができる。当該抗体がモノクローナル抗体の場合、B S H に対して特に高感度であり、交差反応性も低い。本発明のハイブリドーマは、前記モノクローナル抗体を安定して短期間で産生することができ、当該ハイブリドーマを培養することにより、大量のモノクローナル抗体を製造することができる。

【 0 0 1 5 】

また、本発明のキットは、本発明のモノクローナル抗体を含むことにより、B S H の免疫学的測定方法に好適に用いられ、B S H を特異的、高感度および簡便に測定することができる手段を提供することができる。

【 0 0 1 6 】

本発明の B S H の測定方法は、本発明のモノクローナル抗体またはキットを用いることにより感度、特異性および操作の簡便性にすぐれた効果を奏する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 7 】

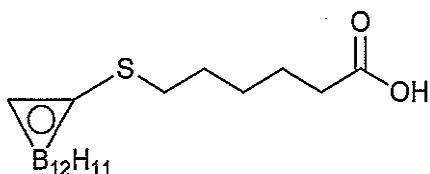
【 図 1 】 本発明のモノクローナル抗体を用いた直接競合 E L I S A 法における B S H 濃度と吸光度の関係を示すグラフ。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 8 】

本発明は、下記式 (1) :

【 化 2 】



(1)

で表わされる構造を有する化合物を提供する。前記化合物は、6 - S - ウンデカヒドロドデカボリルヘキサン酸であり、B S H ハプテンとして好適に使用される。前記式 (1) において、カルボキシル基が後述する高分子化合物と共有結合することにより、複合体 (結合体) を形成する。

【 0 0 1 9 】

体を形成することができる。

【 0 0 2 4 】

本発明は、前記ハプテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることにより得られる B S H に対する抗体を提供する。

【 0 0 2 5 】

本発明でいう「抗体」には、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体が包含され、F a b フラグメントや F (a b ')₂ フラグメントなどのように抗原結合性を有する抗体の一部も包含される。これら抗体の中でも、モノクローナル抗体が好ましい。

【 0 0 2 6 】

前記抗体の製造方法は、公知であり、本発明の抗体も常法にしたがって製造することができる (C u r r e n t P r o t o c o l i n M o l e c u l a r B i o l o g y , C h a p t e r 1 1 . 1 2 ~ 1 1 . 1 3 (2 0 0 0)) 。 具体的には、本発明の抗体がポリクローナル抗体の場合には、常法にしたがって前記 B S H ハプテンと高分子化合物との複合体を形成させた後、当該複合体を家兎等の非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法にしたがって得ることが可能である。

10

【 0 0 2 7 】

一方、モノクローナル抗体の場合には、前記複合体を常法にしたがってマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髄腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞をスクリーニングし、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを培養することにより得ることができる (C u r r e n t p r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y e d i t . A u s u b e l e t a l . (1 9 8 7) P u b l i s h . J o h n W i l e y a n d S o n s . S e c t i o n 1 1 . 4 ~ 1 1 . 1 1) 。

20

【 0 0 2 8 】

抗体の調製は、限外ろ過、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどの濃縮・精製法を適宜組み合わせで行うことができる。

【 0 0 2 9 】

また、上記抗体として、より具体的には、たとえば、以下に示すような、本発明の実施例で得られたモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖のヌクレオチド配列、または、本発明の実施例で得られたモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を有する抗体をあげることができる。また、上記ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は本発明の効果を奏する限り、上記配列の一部が欠損、付加、修飾、置換、変異している配列を有するものも含まれる。さらに、その場合、上記配列の一部が欠損、付加、修飾、置換、変異している配列と上記配列との相同性が 7 0 % 以上であることが好ましく、8 0 % 以上であることがより好ましく、9 0 % 以上であることがさらに好ましく、9 5 % 以上であることが特に好ましい。

30

【 0 0 3 0 】

(化 6)

重鎖の S e q u e n c e

40

(5 ' -) C T C G A G T C T G G C C C T G G A A T A T T G C A G C G C T C C C
A G A C C C T C A G T C T G A C T T G T T C T T T C T C T G G G T T T T C A C T
G A G C A C T T C T G G T A T G G G T G T T G G C T G G T T T C G T C A G C C T
T C A A C A A A G G G T C T A G A G T G G C T G G C A G A C A T T T G G T G G A
A T G A C A A T A A A T A C T A T A A T C C A T C C C T G A A G A G C C G G C T
C A C A A T C T C C A A G G A T A C C T C C A A A A C C A G G T A T T C C T C
A A G A T C G C C A G T G T G G A C A C T A T A G A T A C T G C C A C T T A C T
A C T G T T C T C T A A G A A A T A G T G C C G A A A A G A C A A A C A C C T G
G G G C C A A G G C A C C A C T C T C A C A G T C T C C T C A G C C A A A A C G
A C A C C C C C A T C T G T C T A T C C A C T G G C C C C T G G A T C T G C T G

50

C C C A A A C T A A C T C C A T G G T G A C C C T G G G A T G C C T G G T C A A
 G G G C T A T T T C C C T G A G C C A G T G A C A G T G A C C T G G A A C T C T
 G G A T C C C T G T C C A G C G G T G T G C A C A C C T T C C C A G C T G T C C
 T G C A G T C T G A C C T C T A C A C T C T G A G C A G C T C A G T G A C T G T
 C C C C T C C A G C A C C T G G C C C A G C G A G A C C G T C A C C T G C A A C
 G T T G C C C A C C C G G C C A G C A G C A C C A A G G T G G A C A A G A A A A
 T T G T G C C C A G G G A T T G T A C T A G T

【0031】

(化7)

軽鎖の Sequence

10

(5' -) G A G C T C G T T G T G A C T C A G G A A T C T G C A C T C A C C A
 C A T C A C C T G G T G A A A C A G T C A C A C T C A C T T G T C G C T C A A G
 T A C T G G G G C T G T T A C A A C T A G T A A C T A T G T C A A T T G G G T C
 C A A G A A A A A C C A G A T C A T T T A T T C A C T G G T C T A A T A G G T G
 G T A C C A A C A A C C G A G C T C C A G G T G T T C C T G C C A G A T T C T C
 A G G C T C C C T G A T T G G A G A C A A G G C T G C C C T C A C C A T C A C A
 G G G G C A C A G A C T G A G G A T G A G G C A A T A T A T T T C T G T G G T C
 T A T G G T A C A G C A A C C A T T G G G T G T T C G G T G G A G G A A C C A A
 A C T G A C T G T C C T A G G C C A G C C C A A G T C T T C G C C A T C A G T C
 A C C C T G T T T C C A C C T T C C T C T G A A G A G C T C G A G A C T A A C A
 A G G C C A C A C T G G T G T G T A C G A T C A C T G A T T T C T A C C C A G G
 T G T G G T G A C A G T G G A C T G G A A G G T A G A T G G T A C C C C T G T C
 A C T C A G G G T A T G G A G A C A A C C C A G C C T T C C A A A C A G A G C A
 A C A A C A A G T A C A T G G C T A G C A G C T A C C T G A C C C T G A C A G C
 A A G A G C A T G G G A A A G G C A T A G C A G T T A C A G C T G C C A G G T C
 A C T C A T G A A G G T C A C A C T G T G G A G A A G A G T T T G T C C C G T G
 C T G A G T G T T C C T A A T T C T A G A

20

【0032】

(化8)

重鎖のアミノ酸配列

30

(N -) L E S G P G I L Q R S Q T L S L T C S F S G F S L S T S G M G V G W F
 R Q P S T K G L E W L A D I W W N D N K Y Y N P S L K S R L T I S K D T S K N Q
 V F L K I A S V D T I D T A T Y Y C S L R N S A E K T N T W G Q G T T L T V S S
 A K T T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S M V T L G C L V K G Y F P E P V T V T
 W N S G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T L S S S V T V P S S T W P S E T V
 T C N V A H P A S S T K V D K K I V P R D C T S

【0033】

(化9)

軽鎖のアミノ酸配列

40

(N -) E L V V T Q E S A L T T S P G E T V T L T C R S S T G A V T T S N Y V
 N W V Q E K P D H L F T G L I G G T N N R A P G V P A R F S G S L I G D K A A L
 T I T G A Q T E D E A I Y F C G L W Y S N H W V F G G G T K L T V L G Q P K S S
 P S V T L F P P S S E E L E T N K A T L V C T I T D F Y P G V V T V D W K V D G
 T P V T Q G M E T T Q P S K Q S N N K Y M A S S Y L T L T A R A W E R H S S Y S
 C Q V T H E G H T V E K S L S R A E C S

【0034】

また、本発明は、前記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。以下、マウスでのハイブリドーマの作製方法について詳細に説明する。

【0035】

以下、B a l b / c マウスを例にして説明する。前記のように調製した抗原（免疫原）

50

を 2 m g / m l 程度になるように生理的リン酸緩衝液に溶解し、アジュバントと等量混合した後、B a l b / c マウスに腹腔内に投与する。その後、約 2 週間毎に追加免疫する。

【 0 0 3 6 】

尾血管から採取した血液の血清中の抗体力価が高くなった前記マウスの脾臓を摘出し、D M E M 培地 (ダルベッコ改変イーグル培地) を入れたシャーレ内で前記脾臓から細胞を取り出す。培地を遠沈管に移し、大きな組織片を沈降させ、脾臓細胞が浮遊している上清を静かに取り、単細胞の懸濁液を低速で遠心分離して細胞を集め、脾臓細胞を調製する。

【 0 0 3 7 】

マウスのミエローマ細胞 (P 3 × 6 3 A g 8 . 6 5 3) を細胞数の比で 5 : 1 (ミエローマ細胞 : 脾臓細胞) になるように混合し、低速で遠心分離して細胞を集める。沈殿細胞をほぐした後、3 7 °C に温めておいた 5 0 % ポリエチレングリコール (分子量 1 , 5 0 0) 溶液 1 m l をゆっくり加え細胞融合を行う。

【 0 0 3 8 】

細胞融合後、D M E M 培地 9 m l を加え、さらに含牛胎児血清 D M E M 培地 4 0 m l を添加する。遠心分離によって集めた細胞に、細胞数が 5×10^5 個 / m l になるように H A T 培地を加えて懸濁し、細胞懸濁液を 9 6 穴プラスチックプレートに 2 5 0 μ l / ウェルの量で分注して、3 7 °C、5 % 炭酸ガス、加湿条件下のインキュベーター中で培養する。

【 0 0 3 9 】

1 週間後、ウェル中の培地の半量を H A T 培地で置換して、1 0 日から 1 4 日間培養する。培養液中の抗体の活性を E L I S A で調べ、目的とする抗体を産生しているウェルの細胞について、限界希釈法によりハイブリドーマのクローニングを行う。クローニングにより、抗 B S H 抗体を産生している安定なハイブリドーマ株を得る。

【 0 0 4 0 】

本発明では、前記方法によりハイブリドーマを作製し、B S F - 2 等の複数のハイブリドーマ株を樹立した。このうち、H y b r i d o m a B S F - 2 について、受領番号 A B P - 1 0 6 8 9 の下、2 0 0 6 年 1 0 月 2 日に独立行政法人 産業技術総合研究所、特許生物寄託センター (郵便番号 3 0 5 - 8 5 6 6、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 1 号) に国際寄託されている。また、B S F - 2 について、受領番号 F E R M A P - 2 0 8 0 5 の下、2 0 0 6 年 2 月 2 2 日に独立行政法人 産業技術総合研究所、特許生物寄託センター (郵便番号 3 0 5 - 8 5 6 6、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 1 号) に国内寄託されている。

【 0 0 4 1 】

本発明のハイブリドーマは、培地 (たとえば、1 0 % 牛胎児血清を含む D M E M) を用いて培養し、その培養液の遠心上清をモノクローナル抗体溶液とすることができる。また、本ハイブリドーマを由来する動物の腹腔に注入することにより、腹水を生成させ、得られた腹水をモノクローナル抗体溶液とすることができる。これらの抗体溶液は、さらに上述のように精製・濃縮することができる。

【 0 0 4 2 】

また、本発明は、前記抗体を含む B S H の測定キットに関する。本発明の測定キットは、B S H に特異的に結合する抗体を含むことにより、B S H を簡便に測定することができる。後述の B S H の測定方法に好適に使用することができる。前記キットは、さらに、測定法に応じて、標識された二次抗体もしくは標識された B S H ハプテン (抗原)、緩衝液、検出試薬および / または B S H 標準溶液等を含む。

【 0 0 4 3 】

好ましいキットは、下記に示すような間接競合 E L I S A 法または直接競合 E L I S A 法に用いられるものである。直接競合 E L I S A 法に用いる場合、本キットは、本発明のモノクローナル抗体を固相化した担体をさらに含むことが好ましい。この場合、下記直接競合 E L I S A 法の工程 (1) を省略することができる。

【 0 0 4 4 】

10

20

30

40

50

間接競合 E L I S A 法に用いる場合、本キットは、さらに固相化抗原を含むものが好ましく、当該固相化抗原を固相化した担体を含むことが好ましい。この場合、下記間接競合 E L I S A 法の工程 (1) を省略することができる。

【 0 0 4 5 】

前記固相化抗原は、本発明の抗体を製造するために用いるハプテンとは異なるハプテンを含むものである。前記固相化抗原のハプテン部分は、B S H - ヘキサン酸であることが好ましい。

【 0 0 4 6 】

また、前記固相化抗原は、前記固相化抗原用ハプテンと、牛血清アルブミン (B S A)、ウサギ血清アルブミン (R S A)、オボアルブミン (O V A)、スカシ貝ヘモシアニン (K L H)、チログロブリン (T G)、免疫グロブリン等の高分子化合物 (タンパク質) との複合体を形成することにより得られる。

10

【 0 0 4 7 】

前記固相化抗原用のハプテンは、公知の方法により合成することができ、市販品を利用することもできる。複合体の形成方法は、公知の方法により行なうことができ、特に限定されるものではない。たとえば、混合酸無水物法または活性エステル法等により前記固相化抗原用ハプテンのカルボキシル基と前記高分子化合物の官能基 (たとえば、アミノ基) とを反応させて、複合体を形成することができる。

【 0 0 4 8 】

本発明のキットは、下記間接競合 E L I S A 法に用いる場合、前記固相化抗原、固相化抗原を保持する担体、B S H 抗体、酵素標識された二次抗体および検出試薬などを含む。

20

【 0 0 4 9 】

さらに、本発明は、前記抗体またはキットを用いることを特徴とする B S H の測定方法に関する。測定方法としては、通常の抗原 - 抗体反応を利用する方法であれば特に制限されず、放射性同位元素免疫測定法 (R I A)、酵素免疫測定法 (E L I S A)、蛍光もしくは発光測定法、凝集法、イムノプロット法、イムノクロマト法等 (Meth . Enzy mol . , 9 2 , 1 4 7 - 5 2 3 (1 9 8 3) , Antibodies Vol . I I I R L Press Oxford (1 9 8 9)) があげられるが、感度や簡便性等の点から E L I S A が好ましい。E L I S A に用いる酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ等があげられる。

30

【 0 0 5 0 】

E L I S A による測定法は、間接競合 E L I S A または直接競合 E L I S A などがあげられる。たとえば、間接競合 E L I S A は、以下のような手順により行うことができる。

【 0 0 5 1 】

(1) 固相化抗原を担体に固相化する。

【 0 0 5 2 】

用いる担体は、通常の E L I S A に用いる担体であれば特に制限されないが、9 6 穴、4 8 穴、1 9 2 穴等のマイクロタイタープレートが好ましい。固相化は、たとえば、固相化用抗原を含む緩衝液を担体上に載せ、インキュベーションすればよい。緩衝液中の抗原の濃度は、通常 0 . 0 1 ~ 1 0 0 μ g / m l 程度である。緩衝液としては、検出手段に応じて公知のものを使用することができる。

40

【 0 0 5 3 】

(2) 担体の固相表面へのタンパク質の非特異的吸着を防止するため、固相化用抗原が吸着していない固相表面部分を、抗原と無関係なタンパク質等によりブロッキングする。

【 0 0 5 4 】

ブロッキング剤としては、B S A もしくはスキムミルク溶液、または市販のブロックエース (大日本製薬社製) 等を使用することができる。ブロッキングは、前記ブロッキング剤を担体に添加し、たとえば、約 4 時間で一晚インキュベーションした後、洗浄液で洗浄することにより行われる。洗浄液としては特に制限はないが、前記 (1) と同じ緩衝液を使用することができる。

50

【 0 0 5 5 】

(3) 前記 (1) および (2) で処理された固相表面に各種濃度の B S H を含む試料および本発明のモノクローナル抗体溶液を加え、該抗体を前記固相化抗原および B S H に競合的に反応させて、固相化抗原 - 抗体複合体および B S H - 抗体複合体を生成させる。

【 0 0 5 6 】

反応は、通常 4 ~ 3 7 で 1 ~ 2 時間程度で行うことができる。

【 0 0 5 7 】

(4) 固相化抗原 - 抗体複合体の量を測定することにより、予め作成した検量線から試料中の B S H の量を決定することができる。

【 0 0 5 8 】

固相化抗原 - 抗体複合体の量は、酵素標識した二次抗体 (B S H 抗体を認識する抗体) を添加して測定することができる。たとえば B S H 抗体としてマウスモノクローナル抗体を用いる場合、酵素標識 (たとえば、ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ等) した抗マウス - ヤギ抗体を用いて、担体に結合した B S H 抗体と反応させるのが望ましい。反応は、前記 (3) と同様の条件下で行えばよい。反応後、緩衝液で洗浄する。

【 0 0 5 9 】

(5) 担体に結合した二次抗体の標識酵素と反応する発色基質溶液を加え、吸光度を測定することによって検量線から B S H の量を算出することができる。

【 0 0 6 0 】

二次抗体に結合する酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、たとえば、過酸化水素と、 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジンまたは o - フェニレンジアミンを含む発色基質溶液を使用することができる。通常、発色基質溶液を加えて室温で約 1 0 分程度反応させた後、硫酸を加えることにより酵素反応を停止させる。 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジンを使用する場合、 4 5 0 n m の吸光度を測定する。 o - フェニレンジアミンを使用する場合、 4 9 0 n m の吸光度を測定する。なお、バックグランド値を補正するため、 6 3 0 n m の吸光度も同時に測定することが望ましい。

【 0 0 6 1 】

二次抗体に結合する酵素としてアルカリホスファターゼを使用する場合には、たとえば p - ニトロフェニルリン酸を基質として発色させ、 Na O H 溶液を加えて酵素反応を停止し、 4 1 5 n m での吸光度を測定する方法があげられる。

【 0 0 6 2 】

B S H を添加しない反応溶液の吸光度に対して、 B S H を添加して抗体と反応させた溶液の吸光度の減少率を阻害率として計算する。既知の濃度の B S H を添加した反応液の阻害率により予め作成しておいた検量線を用いて、試料中の B S H の濃度を算出することができる。

【 0 0 6 3 】

別の態様として、 B S H の測定は、たとえば以下に述べるような本発明のモノクローナル抗体を用いた直接競合 E L I S A によって行うこともできる。

【 0 0 6 4 】

(1) 本発明のモノクローナル抗体を、担体に固相化する。

【 0 0 6 5 】

用いる担体は、 9 6 穴、 4 8 穴、 1 9 2 穴等のマイクロタイタープレートが好ましい。固相化は、たとえば、固相化用抗体を含む緩衝液を担体上に載せ、インキュベーションすればよい。緩衝液中の抗体の濃度は、通常 0 . 0 1 ~ 1 0 0 μ g / m l 程度である。緩衝液としては、検出手段に応じて公知のものを使用することができる。

【 0 0 6 6 】

(2) 担体の固相表面へのタンパク質の非特異的吸着を防止するため、固相化用抗体が吸着していない固相表面部分を、抗体と無関係なタンパク質等によりブロッキングする。

【 0 0 6 7 】

ブロッキング剤としては、 B S A もしくはスキムミルク溶液、または市販のブロックエ

10

20

30

40

50

ース（大日本製薬社製）等を使用することができる。ブロッキングは、前記ブロッキング剤を担体に添加し、たとえば、約4で一晚インキュベーションした後、洗浄液で洗浄することにより行われる。洗浄液としては特に制限はないが、前記（1）と同じ緩衝液を使用することができる。

【0068】

（3）各種濃度のBSHを含む試料に、BSHハプテンと酵素を結合させた酵素結合ハプテンを加えた混合物を調製する。

【0069】

酵素結合ハプテンの調製は、BSHハプテンを酵素に結合する方法であれば特に制限なく、いかなる方法で行ってもよい。

【0070】

（4）工程（3）の混合物を工程（2）で得られた抗体固相化担体と反応させる。

【0071】

BSHと酵素結合ハプテンとの競合阻害反応により、これらと固相化担体との複合体が生成する。反応はたとえば、約25で約1時間行う。反応終了後、緩衝液で担体を洗浄し、固相化抗体と結合しなかった酵素結合ハプテンを除去する。

【0072】

固相化抗体 - 酵素結合ハプテン複合体の量を測定することにより、予め作成した検量線から試料中のBSHの量を決定する。

【0073】

本工程において酵素結合ハプテンの酵素に反応する発色基質溶液を前述の間接競合阻害ELISA法と同様に加え、吸光度を測定することにより検量線からBSHの量を算出することができる。

【0074】

前記本発明の測定方法においては、測定対象物に応じた前処理をして試料とした後、前記間接競合ELISAまたは直接競合ELISAの工程（3）に供せられる。

【0075】

本発明のハイブリドーマBSF-2から産生されるモノクローナル抗体を用いて、BSHの測定方法を実施することができる。本抗体を用いることによって今までイムノアッセイによる測定法がなかったBSHの特異的かつ高感度測定を実施することができる。

【0076】

本発明の別の態様として、免疫染色法に本発明のモノクローナル抗体を使用して、BNCTに伴うBSHの生体内挙動、特に細胞表層や細胞のミクロ分布を調べることができる。

【0077】

また、本発明のハイブリドーマは、前記モノクローナル抗体を安定して短期間で産生することができる。当該ハイブリドーマを培養することにより、BSHを高感度で分子認識するモノクローナル抗体を製造することができる。

【実施例】

【0078】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明する。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾、変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

【0079】

下記実施例において、化合物の分析および分離精製には以下の機種や試薬を用いて行った。

・NMRスペクトル：日本電子 JMT C - 400 / 54 / SS 400 MHz（日本電子社製）。特に明記しない限り、内部標準としてTMSを用いた。また、下記ケミカルシフトは値で示した。

・カラムクロマトグラフィー用シリカゲル：BW-200（富士シリシア社製）。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 0 】

〔実施例 1 (B S H ハプテンの合成) 〕

(a) B S H - ヘキサ酸エチルエステル (3) の合成

B S H (1 0 1 m g 、 0 . 4 6 m m o l) をアセトニトリル (1 0 m L) に溶解させた後、室温で撹拌しながらプロモヘキサ酸エチルエステル (0 . 2 m L 、 1 . 1 2 m m o l) をゆっくり滴下し、室温で 2 日間撹拌した。その後、減圧濃縮によりアセトニトリルを除去し、濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 9 : 1) により精製し、黄色の油状物 (1 0 1 m g 、 収率 6 7 . 4 %) を得た。

・ T L C : R f = 0 . 5 8 (クロロホルム : メタノール = 3 : 1)

・ $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) (p p m) : 0.60-2.10 (m)、1.08 (t , 3H , J=7.08Hz)、1.34-1.42 (m , 2H)、1.52-1.59 (m , 2H)、1.63-1.70 (m , 2H)、2.19 (t , 2H , J=7.32Hz)、2.77 (m , 2H)、3.95 (q , 2H , J=7.08Hz)。

【 0 0 8 1 】

(b) B S H - ヘキサ酸 (4) の合成

上記 (a) で得た化合物 (1 1 3 . 7 m g 、 0 . 3 1 m m o l) をメタノール (2 . 0 m L) に溶解させ、2 N 水酸化ナトリウム (0 . 6 3 m L) を滴下し室温で 6 時間撹拌した。反応液を酢酸エチルを用いて洗浄後、1 N 塩酸を pH 3 になるまで加え、酢酸エチルで抽出した。その後、水および飽和食塩水で洗浄し硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮により酢酸エチルを除去し、濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 4 : 1) により精製し、黄色の油状物 (6 9 . 9 m g 、 収率 6 7 . 4 %) を得た。

・ T L C : R f = 0 . 3 0 (クロロホルム : メタノール = 2 : 1)

・ $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) (p p m) : 0.60-2.10 (m)、1.30-1.37 (m , 2H)、1.45-1.53 (m , 2H)、1.63-1.73 (m , 2H)、2.20 (t , 2H , J=7.32Hz)、2.85 (m , 2H)。

【 0 0 8 2 】

〔実施例 2 (免疫原の調整) 〕

(c) B S H - ヘキサ酸 - B S A 複合体 (B S A を用いた免疫原) の合成

セントチューブにウシ血清アルブミン (1 1 m g 、 1 6 4 n m o l) および pH 9 . 4 のホウ酸塩緩衝液 (四ホウ素酸ナトリウム 5 0 m m o l 、 塩化ナトリウム 1 5 . 4 m m o l 、 アジ化ナトリウム 0 . 3 m m o l / 純水 1 0 0 m L) を 7 6 0 μ L 加え、4 で一晩撹拌した後、DMF (4 0 μ L) を加えた (I 液)。

【 0 0 8 3 】

別のセントチューブに上記 (b) で得た化合物 (6 . 0 m g 、 1 8 μ m o l)、N - ヒドロキシコハク酸イミド (1 . 5 m g 、 1 3 . 3 μ m o l)、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド塩酸塩 (2 . 5 m g 、 1 3 . 3 μ m o l)、DMF (2 0 0 μ L) を加え、室温で一晩撹拌した (I I 液)。

【 0 0 8 4 】

I 液に I I 液を室温で滴下 (1 0 μ L / 5 分) し、室温下で 2 . 5 時間撹拌後、4 で一晩撹拌した。これを 1 0 % イソプロパノール - リン酸緩衝液で約 6 0 時間 (緩衝液を 6 回換える) 透析し、B S H - ヘキサ酸 - B S A 複合体 (結合体) を得た。これを I C P 分析によりホウ素濃度を測定した後、1 . 5 m L のエッペンチューブに移して、4 で保存した。

【 0 0 8 5 】

(d) B S H - ヘキサ酸 - K L H 複合体 (K L H を用いた免疫原) の合成

免疫原として、K L H と本発明 B S H ハプテンとの結合体を、上記 (c) と同様にして作製した。

【 0 0 8 6 】

〔実施例 3 (ポリクローナル抗体の作製) 〕

実施例 2 で調整した B S H ハプテン - K L H 結合体をリン酸緩衝溶液 (pH 7 . 4) で 1 m g / m L になるように希釈した。この抗原溶液 6 0 0 μ L を等量の R I B I アジュバ

10

20

30

40

50

ント (MPL + TDM Adjuvant System, SIGMA M6536) と混合し、2～3分間ボルテックスすることで十分混合した。これを5匹のBalb/cマウス(8週齢、オス)に腹腔内注射により免疫した(50 μ g/dose)。これを2週間ごとに行い、3回目の免疫以降は各免疫から1週間後に採血(眼窩採血)を行った。

【0087】

実施例2で調整した抗原(BSHハプテン-BSA結合体)をPBS(pH7.4)で5.0 μ g/mLになるよう希釈し、ELISA用マイクロプレートに100 μ Lずつ分注し、37 $^{\circ}$ Cで1時間静置することで抗原をプレート表面に固定した。

【0088】

その後PBS-Tween溶液(リン酸緩衝液pH7.4、0.05%Tween20)で洗浄し、非特異的吸着を防ぐためにブロッキング溶液(リン酸緩衝液pH7.4、1%Block Ace)を200 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで一時間静置しブロッキングを行った。そして、PBS-Tween溶液で洗浄後、調製したサンプルを100 μ L加え、再び37 $^{\circ}$ Cで1時間静置した。PBS-Tween溶液で洗浄後、二次抗体を50 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間静置し、二次抗体(HRP標識ヤギ抗マウスIgG(鎖特異的))と反応させた。

10

【0089】

PBS-Tween溶液で洗浄後、事前に調整しておいた基質溶液(リン酸クエン酸緩衝液(pH5.0)、0.04%o-フェニレンジアミン)に過酸化水素水を0.02%になるよう調整したものを200 μ L加えた。37 $^{\circ}$ Cで30分静置し発色させた後、マイクロプレートリーダー(BIO-RAD/Model550)を用いて吸光度を測定した。

20

【0090】

〔実施例4(ハイブリドーマおよびモノクローナル抗体の作製)〕

(a)動物の免疫と抗体産生細胞の調製

合成したBSHハプテン-KLH結合体(実施例2)をリン酸緩衝液pH7.4(PBS)(NaCl 137mM、NaHPO₄·12H₂O 8.10mM、KCl 2.68mM、KH₂PO₄ 1.47mM)で500 μ g/mLになるように希釈した。この抗原溶液2mLを40 $^{\circ}$ Cにて10分間加温したRIBIアジュバントシステム(RIBI/MPL(登録商標)+TDM Emulsion, R-700)と混合し、2～3分間ボルテックスし、十分に混合した。

30

【0091】

これを5匹のBalb/cマウス(8週齢、オス)に皮下注射により免疫した(50 μ g/dose)。これを2週間ごとに行い、2回目の免疫以降は各免疫から、1週間後に採血(眼窩採血)を行った。採血した血液は1.5mLチューブに集め、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした後、4 $^{\circ}$ Cにて一晩静置した。

【0092】

(b)細胞融合

(b-1)DMEM培地の調製

ダルベッコ改変イーグル培地(IWAKI DME/LOW、Lot.99562013)1パック、硫酸ゲンタマイシン(ゲンタマイシン642 μ g/mg、SIGMA Lot.105H0457)78.4mg、炭酸水素ナトリウム(関東化学、Lot302F1378)2.2gにMilliQを加えて1Lにした後、0.22 μ mフィルター(MILLIPORE MILLEX(登録商標)-GV、0.22 μ m フィルター SLGV01352)で滅菌して、DMEM培地を調製した。

40

【0093】

(b-2)HAT培地およびHT培地の調製

HAT supplement(SIGMA、Lot#61K8934)一瓶に10mLの滅菌したMilliQを加え、瓶内の試薬を完全に溶かした。この溶液をDMEM培地(15%FCS)の1/50量加えて混合し、HAT培地とした。HT supplement

50

ment (SIGMA、Lot # 32K8928) 一瓶に10 mLの滅菌したMilli Qを加え、瓶内の試薬を完全に溶かし、この溶液をDMEM培地(15% FCS)の1/50量加えて混合し、HT培地とした。

【0094】

(b-3) 50% PEG培地の調製

20 gのPEG6000 (PEG 6000 (M.W. 7300 - 9000)、ナカライテスク、Lot M8H2950)を20 mLのDMEM培地に加え、ホットスターラーで2時間攪拌して完全に溶かした。その後、40 mLにメスアップし、クリーンベンチで0.20 µmフィルターを用いて滅菌した。その後、1.8 mLずつ分注して凍結し、使用直前に溶解し、200 µLのDMSO (SIGMA、Lot # 42K2401)を加えて、50% PEG (10% DMSO)溶液を作製した。

10

【0095】

(b-4) ACK lysis 緩衝液の調製

Milli Q 90 mLに塩化アンモニウム802.3 mg、炭酸水素カリウム10.01 mg、EDTA 3.72 mgを加えpH 7.2~7.4に調整し、100 mLにメスアップした。これをメディウム瓶に入れ、121 で20分間オートクレーブし、滅菌して、ACK lysis 緩衝液(0.15 M塩化アンモニウム、1.0 mM炭酸水素カリウム、0.1 mM EDTA、pH 7.2~7.4)とした。

【0096】

(c) 脾臓細胞の調整

抗体価が飽和に達したマウスに最終免疫(尾静脈注射)を行い、3日後に脾臓を摘出した。摘出した脾臓を氷上のDMEMの入ったシャーレに入れ、クリーンベンチ内に入れた。摘出した脾臓の不要な部分を除き、新しいDMEM培地の入った5 mLシャーレに入れた。2本のピンセットを用いて、脾臓細胞をこそぎだし、セルストレーナー(FALCO-N2350、70 µmナイロン)でろ過して不要なものを取り除き、通過した細胞をガラス製の遠心管に集め、1000 rpmで10分間遠心した。

20

【0097】

上清を捨て、5 mLのACK lysis 緩衝液を加えピペティングにより均一に混合し、室温で5分間静置し、脾臓細胞を洗浄除去した(赤血球の除去)。ここに20 mLのDMEM培地を加え、1000 rpmで10分間遠心し、上清を除去した。さらに20 mLのDMEM培地を加え、ピペティングにより細胞を洗浄し、1000 rpmで10分間遠心した。上清を除去し、DMEM培地を10 mL加え、ピペティングにより混合した後、血球計算盤(Erma Tokyo 4062)を用いて、細胞数をカウントした。

30

【0098】

(d) ミエローマ細胞の調整

ミエローマ細胞(P3X63Ag8U.1)を細胞融合を行う日程にあわせて培養し、使用直前に細胞をガラス製の遠心管に集め1000 rpmで10分間遠心した。上清を除去し、DMEM培地を10 mL加え、ピペティングにより混合した後、血球計算盤(Erma Tokyo 4062)を用いて、細胞数をカウントした。

40

【0099】

(e) 細胞融合

脾臓細胞：ミエローマ細胞が10:3になるようにミエローマ細胞懸濁液の量を調整し、脾臓細胞懸濁液の遠心管に入れ、ピペティングによって混合した。これを1000 rpmで10分間遠心し上清を除去した後、パストールピペットを用いて完全に上清を除去した。

【0100】

その後、遠心管をたたいて、細胞を遠心管の壁に広げた。遠心管を手で暖め、回しながら、1 mLの50% PEG (10% DMSO)溶液を1分以上かけて、徐々に加えた。遠心管を1分間暖めながらまわし、同様の方法で、2 mLのDMEM培地を2分以上かけて

50

加え、さらに8 mLのDMEM培地を5分以上かけて加えた。

【0101】

その後、1000 rpmで10分間遠心し、上清を捨て、さらに10 mLのDMEM培地を加えて細胞を洗浄し、1000 rpmで10分間遠心した。上清を除去し、DMEM (15% FCS) 培地を細胞密度が 2×10^5 個/mLになるように調整し、96穴プレートに100 μ Lずつ分注し、37 で一晩静置した。

【0102】

(f) HAT選択

96穴プレートに分注した細胞に、2倍程度のHAT培地を100 μ Lずつ分注し、37 で1週間放置した。その後、100 μ LのHAT培地を加えた。その後、陽性のウェルのハイブリドーマ細胞を24穴プレートに移し換え、HT培地を用いて全量を1 mLにした。3日後、2次スクリーニングを行い、陽性であったウェルを限界希釈法によってクローニングした。

10

【0103】

(g) 限界希釈法を用いたクローニング

2次スクリーニングで陽性であったウェルのハイブリドーマ細胞の細胞数を血球計算盤 (Erma Tokyo 4062) を用いてカウントして、濃度を求め、クローニング用の培地 (DMEM (15% FCS) 培地 20 mL、Briclone 1 mL) を用いて、段階希釈することにより10 個/mL、5 個/mLに調整した。96穴プレートに100 μ Lずつ分注し、1ウェルあたり細胞が1 個または0.5 個とした。

20

【0104】

これを37 で1週間静置し、その後各ウェルに100 μ Lずつクローニング陽の培地を加え、さらに37 で1週間静置した。陽性であったウェルの細胞を48穴プレートに移し、同様に2回目のクローニングを行い、最終的に単一のハイブリドーマ細胞を得た。

【0105】

(h) 無血清培地からの抗体の精製

無血清培地で培養したハイブリドーマ細胞BSF-2培養液を1000 rpmで10分間遠心し、細胞上清に対し、60%硫酸アンモニウム濃度になるように硫酸アンモニウムを加え、抗体タンパクを沈殿させた。これを4 で2時間攪拌し、さらに一晩放置した。その後、4 、13500 rpmで20分遠心し、結合バッファーに溶解させ、結合バッファーで透析した。

30

【0106】

透析後、8000 rpmで10分間遠心して、上清を0.45 μ mでフィルターろ過してサンプルとした。カラムに5 mLの超純水を流速1滴/秒 (1~2 mL/分) で送液後、3~5 mLの結合バッファーを流速1滴/秒 (1~2 mL/分) で送液し、カラムの平衡化を行った。その後、調整したサンプルを1滴/2秒 (1~2 mL/分) で送液し、抗体をカラムに吸着させた。

【0107】

非吸着成分を3~5 mLの結合バッファー (20 mMリン酸ナトリウム、0.8 M硫酸アンモニウム、pH 7.5) を流速1滴/秒で送液することにより除去した後、5 mL溶出バッファー (20 mMリン酸ナトリウム、pH 7.5) を1滴/秒 (1~2 mL/分) で送液して抗体を溶出させた。溶出液を0.5 mLずつ回収した。

40

【0108】

全てのフラクションの吸光度 (OD = 280 nm) を測定し、抗体タンパクを含んでいるフラクションをブラッドフォード法により、抗体タンパク濃度を測定した。その後、SDS-PAGEでモノクローナル抗体の純度を確認した。また、得られたモノクローナル抗体のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は上述したとおりである。

【0109】

(i) 抗体の感度測定と検量線の作成 (直接競合ELISA法)

PBS溶液 (リン酸緩衝液 pH 7.4) を用いて5 μ g/mLに調製したモノクローナ

50

ル抗体（ハイブリドーマ株（BSF-2から調製）溶液を100 μ Lずつ96穴ELISA用プレートに分注し、37 $^{\circ}$ Cで1時間静置することでプレートに抗体を固相化した。反応後、PBS-Tween溶液（リン酸緩衝液（pH7.4）、0.05%Tween20）で洗浄し、非特異的吸着を防ぐためにプレートにブロッキング溶液（リン酸緩衝液（pH7.4）、1%BSA）を加え、室温で1時間または4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させ、ブロッキングを行った。

【0110】

PBS-Tween溶液で洗浄後、HRP標識した競合剤（HRP結合BSH-ヘキサ酸）のPBS溶液（0.5 μ g/mL）中に、BSHがそれぞれ100~0.001ppmの濃度になるようにサンプルを調整した。

10

【0111】

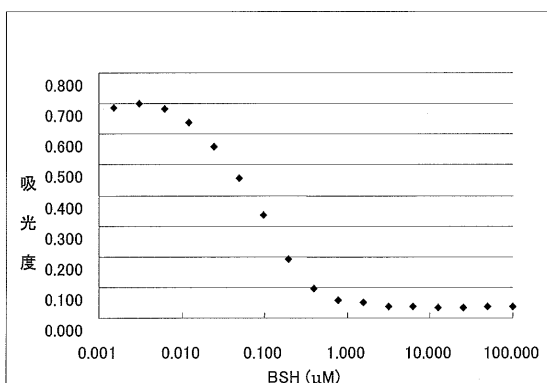
調製したサンプルをそれぞれ100 μ Lずつ96穴ELISA用プレート（IWAKI 3801-096）に加え37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。その後、常法どおりELISA（基礎溶液（50mmolリン酸クエン酸緩衝液（pH5.0）、0.04%o-フェニレンジアミン））を行い、マイクロプレートリーダー（BIO-RAD/Model 550）を用いて490nmにおける吸光度を測定した。

【0112】

測定結果を図1に示す。X軸はBSH濃度を、Y軸は吸光度を表す。図1が示すように、ハイブリドーマ株BSF-2から調製したモノクローナル抗体を用いてBSHを特異的に検出することができ、BSH濃度が0.001~1 μ Mの幅広い範囲で吸光度測定によるBSHの濃度測定が可能であった。このように本発明のハイブリドーマおよび抗体を用いることにより、BSHの幅広い濃度範囲で非常に感度の高い定量評価および定性評価等が可能となる。

20

【図1】



【配列表】

2007097065000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成19年3月2日(2007.3.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

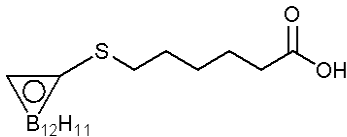
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記式(1)：

【化1】



(1)

で表わされる構造を有するハブテン。

【請求項2】

メルカプトウンデカヒドロドデカボレート(BSH)に対するモノクローナル抗体を製造するために用いられる、請求項1に記載のハブテンと高分子化合物との複合体からなる抗原。

【請求項3】

前記高分子化合物がスカシ貝ヘモシアニン(KLH)である請求項2に記載の抗原。

【請求項4】

請求項1に記載のハブテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることにより得られるメルカプトウンデカヒドロドデカボレート(BSH)に対するモノクローナル抗体。

【請求項5】

前記抗体の重鎖が、下記アミノ酸配列(a)と70%以上の相同性を持つアミノ酸配列を含む請求項4に記載のモノクローナル抗体。

アミノ酸配列(a)

(N-) L E S G P G I L Q R S Q T L S L T C S F S G F S L S T S G M G V G W F
R Q P S T K G L E W L A D I W W N D N K Y Y N P S L K S R L T I S K D T S K N Q
V F L K I A S V D T I D T A T Y Y C S L R N S A E K T N T W G Q G T T L T V S S
A K T T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S M V T L G C L V K G Y F P E P V T V T
W N S G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T L S S S V T V P S S T W P S E T V
T C N V A H P A S S T K V D K K I V P R D C T S

【請求項6】

前記抗体の軽鎖が、下記アミノ酸配列(b)と70%以上の相同性を持つアミノ酸配列を含む請求項4または5に記載のモノクローナル抗体。

アミノ酸配列(b)

(N-) E L V V T Q E S A L T T S P G E T V T L T C R S S T G A V T T S N Y V
N W V Q E K P D H L F T G L I G G T N N R A P G V P A R F S G S L I G D K A A L
T I T G A Q T E D E A I Y F C G L W Y S N H W V F G G G T K L T V L G Q P K S S
P S V T L F P P S S E E L E T N K A T L V C T I T D F Y P G V V T V D W K V D G
T P V T Q G M E T T Q P S K Q S N N K Y M A S S Y L T L T A R A W E R H S S Y S
C Q V T H E G H T V E K S L S R A E C S

【請求項7】

請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 8】

前記ハイブリドーマが Hybridoma BSF-2 (受領番号 ABP-10689) である請求項 7 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 9】

請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を含むメルカプトウンデカヒドロドデカボレート (BSH) の測定キット。

【請求項 10】

請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とするメルカプトウンデカヒドロドデカボレート (BSH) の測定方法。

【請求項 11】

請求項 9 に記載のキットを用いることを特徴とするメルカプトウンデカヒドロドデカボレート (BSH) の測定方法。

【手続補正書】

【提出日】平成19年7月26日(2007.7.26)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

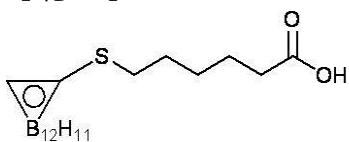
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式 (1) :

【化 1】



(1)

で表わされる構造を有するハプテンとスカシ貝ヘモシアニン (KLH) との複合体からなる抗原であって、

メルカプトウンデカヒドロドデカボレート (BSH) に対するモノクローナル抗体を製造するために用いられる、抗原。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のハプテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることにより得られるメルカプトウンデカヒドロドデカボレート (BSH) に対するモノクローナル抗体。

【請求項 3】

前記抗体の重鎖が、下記アミノ酸配列 (a) と 70% 以上の相同性を持つアミノ酸配列を含む請求項 2 に記載のモノクローナル抗体。

アミノ酸配列 (a)

(N-) L E S G P G I L Q R S Q T L S L T C S F S G F S L S T S G M G V G W F
R Q P S T K G L E W L A D I W W N D N K Y Y N P S L K S R L T I S K D T S K N Q
V F L K I A S V D T I D T A T Y Y C S L R N S A E K T N T W G Q G T T L T V S S
A K T T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S M V T L G C L V K G Y F P E P V T V T
W N S G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T L S S S V T V P S S T W P S E T V
T C N V A H P A S S T K V D K K I V P R D C T S

【請求項 4】

前記抗体の軽鎖が、下記アミノ酸配列 (b) と 70% 以上の相同性を持つアミノ酸配列を含む請求項 2 または 3 に記載のモノクローナル抗体。

アミノ酸配列 (b)

(N -) E L V V T Q E S A L T T S P G E T V T L T C R S S T G A V T T S N Y V
 N W V Q E K P D H L F T G L I G G T N N R A P G V P A R F S G S L I G D K A A L
 T I T G A Q T E D E A I Y F C G L W Y S N H W V F G G G T K L T V L G Q P K S S
 P S V T L F P P S S E E L E T N K A T L V C T I T D F Y P G V V T V D W K V D G
 T P V T Q G M E T T Q P S K Q S N N K Y M A S S Y L T L T A R A W E R H S S Y S
 C Q V T H E G H T V E K S L S R A E C S

【請求項 5】

請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 6】

前記ハイブリドーマが Hybridoma B S F - 2 (受託番号 F E R M B P - 1 0 6 8 9) である請求項 5 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 7】

請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を含むメルカプトウンデカハイドロドデカボレート (B S H) の測定キット。

【請求項 8】

請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とするメルカプトウンデカハイドロドデカボレート (B S H) の測定方法。

【請求項 9】

請求項 7 に記載のキットを用いることを特徴とするメルカプトウンデカハイドロドデカボレート (B S H) の測定方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

本発明は、前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。前記ハイブリドーマは、Hybridoma B S F - 2 (受託番号 F E R M B P - 1 0 6 8 9) であることが好ましい。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0040

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0040】

本発明では、前記方法によりハイブリドーマを作製し、B S F - 2 等の複数のハイブリドーマ株を樹立した。このうち、Hybridoma B S F - 2 について、受託番号 F E R M B P - 1 0 6 8 9 の下、2006年10月2日に独立行政法人 産業技術総合研究所、特許生物寄託センター（郵便番号305-8566、茨城県つくば市東1丁目1番1号）に国際寄託されている。また、B S F - 2 について、受託番号 F E R M P - 2 0 8 0 5 の下、2006年2月22日に独立行政法人 産業技術総合研究所、特許生物寄託センター（郵便番号305-8566、茨城県つくば市東1丁目1番1号）に国内寄託されている。

【手続補正書】

【提出日】平成19年10月23日(2007.10.23)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

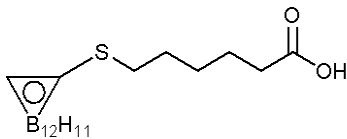
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式(1)：

【化 1】



(1)

で表わされる構造を有するハプテンとスカシ貝ヘモシアニン(KLH)との複合体からなる抗原であって、

メルカプトウンデカヒドロドデカボレート(BSH)に対するモノクローナル抗体を製造するために用いられる、抗原。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のハプテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることにより得られるメルカプトウンデカヒドロドデカボレート(BSH)に対するモノクローナル抗体。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の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】

前記ハイブリドーマが Hybridoma BSF-2 (受託番号 FERM BP-10689) である請求項 3 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 5】

請求項 2 に記載のモノクローナル抗体を含むメルカプトウンデカヒドロドデカボレート(BSH)の測定キット。

【請求項 6】

請求項 2 に記載のモノクローナル抗体を用いる、メルカプトウンデカヒドロドデカボレート(BSH)の測定方法。

【請求項 7】

請求項 5 に記載のキットを用いる、メルカプトウンデカヒドロドデカボレート(BSH)の測定方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2006/319977
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07F5/02(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i 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) C07F5/02, C07K16/00, C12N5/10, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2-207086 A (Shionogi & Co., Ltd.), 16 August, 1990 (16.08.90), Full descriptions (Family: none)	1 2-8
X A	JP 7-330773 A (Toyo Hakka Kogyo Co., Ltd.), 19 December, 1995 (19.12.95), Claim 5; Par. Nos. [0027] to [0029]; examples (Family: none)	1 2-8
X A	JP 2001-233883 A (Okayama-ken Shin Gijutsu Shinko Zaidan), 28 August, 2001 (28.08.01), Claims; examples (Family: none)	1 2-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 application or patent 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 20 November, 2006 (20.11.06)		Date of mailing of the international search report 19 December, 2006 (19.12.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/319977

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Irina SLEPUKHINA et al., Fragmentation of $B_{12}H_{11}S-R(2-)$ in electrospray mass spectrometry, Journal of Organometallic Chemistry, 2005, vol.690, no.11, p.2796-2801	1 2-8
X A	Koichiro NAGASAWA et al., SYNTHESIS AND POLYHEDRAL BORANE DERIVATIVES HAVING A CARBOXY GROUP, Tetrahedron Letters, 1990, vol.31, no.28, p.4029-4032	1 2-8
X Y	Teruyoshi KAGEJI et al., Subcellular biodistribution of sodium borocaptate (BSH: $Na_2B_{12}H_{11}SH$) in a rat glioma model in boron neutron capture therapy, Journal of Neuro-Oncology, 2002, vol.59, p.135-142, particularly, p.136 Antigen for antibody production and Antibody production, p.137 Immunohistochemistry	2 2-8
A	Roman G. KULTYSHEV et al., S-Alkylation and S-Amination of Methyl Thioethers - Derivatives of <i>ciso</i> - $[B_{12}H_{12}]^{2-}$. Synthesis of a Boronated Phosphonate, <i>gem</i> -Bisphosphonates, and Dodecaborane- <i>ortho</i> -carborane Oligomers, Journal of the American Chemical Society, 2002, vol.124, no.11, p.2614-2624	1-8

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2006/319977	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07F5/02(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i			
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.Cl. C07F5/02, C07K16/00, C12N5/10, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577			
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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2006年 日本国実用新案登録公報 1996-2006年 日本国登録実用新案公報 1994-2006年			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus (STN) REGISTRY (STN)			
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	
X Y	JP 2-207086 A (塩野義製薬株式会社) 1990.08.16, 明細書全文 (ファミリーなし)	1 2-8	
X A	JP 7-330773 A (東洋薄荷工業株式会社) 1995.12.19, 請求項 5, 【0027】 ~ 【0029】, 実施例 (ファミリーなし)	1 2-8	
X A	JP 2001-233883 A (岡山県新技術振興財団) 2001.08.28, 特許請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	1 2-8	
☞ 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 20.11.2006		国際調査報告の発送日 19.12.2006	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 関 美祝 電話番号 03-3581-1101 内線 3443	4H 9045

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2006/319977
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
X A	Irina SLEPUKHINA et al., Fragmentation of $B_{12}H_{11}S-R(2-)$ in electrospray mass spectrometry, Journal of Organometallic Chemistry, 2005, vol.690, no.11, p.2796-2801	1 2-8
X A	Koichiro NAGASAWA et al., SYNTHESIS AND POLYHEDRAL BORANE DERIVATIVES HAVING A CARBOXY GROUP, Tetrahedron Letters, 1990, vol.31, no.28, p.4029-4032	1 2-8
X Y	Teruyoshi KAGEJI et al., Subcellular biodistribution of sodium borocaptate (BSH: $Na_2B_{12}H_{11}SH$) in a rat glioma model in boron neutron capture therapy, Journal of Neuro-Oncology, 2002, vol.59, p.135-142, 特に, p.136 Antigen for antibody production 及び Antibody production, p.137 Immunohistochemistry の項	2 2-8
A	Roman G. KULTYSHEV et al., S-Alkylation and S-Amination of Methyl Thioethers - Derivatives of <i>closo</i> - $[B_{12}H_{12}]^{2-}$. Synthesis of a Boronated Phosphonate, <i>gem</i> -Bisphosphonates, and Dodecaborane- <i>ortho</i> -carborane Oligomers, Journal of the American Chemical Society, 2002, vol.124, no.11, p.2614-2624	1-8

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/02	(2006.01)		C 1 2 N 15/00			C
G 0 1 N 33/53	(2006.01)		G 0 1 N 33/53			S
C 1 2 P 21/08	(2006.01)		C 1 2 P 21/08			

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100104101

弁理士 谷口 俊彦

(72) 発明者 切畑 光統

大阪府堺市中区学園町 1 1

(72) 発明者 浅野 智之

大阪府堺市北区長曽根町 1 3 0 4 2 2 0 2

(72) 発明者 上原 幸樹

大阪府堺市北区長曽根町 1 3 0 4 2 2 0 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA31 BA43 HA15
 4B064 AG27 CA20 CC24 DA01 DA14
 4B065 AA91X AA92X AB05 BA08 CA25 CA44 CA46
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA50 DA76 DA86 EA28 EA51 FA74
 4H048 AA01 AA03 AB80 VA20 VA40 VA77 VB10

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。