

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3888695号
(P3888695)

(45) 発行日 平成19年3月7日(2007.3.7)

(24) 登録日 平成18年12月8日(2006.12.8)

(51) Int. Cl.	F I	
C O 7 K 16/30 (2006.01)	C O 7 K 16/30	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
G O 1 N 33/577 (2006.01)	G O 1 N 33/577	B
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C

請求項の数 8 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-542021	(73) 特許権者 株式会社医学生物学研究所 愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内ビル5階
(86) (22) 出願日 平成9年5月26日(1997.5.26)	
(86) 国際出願番号 PCT/JP1997/001775	
(87) 国際公開番号 W01997/045451	
(87) 国際公開日 平成9年12月4日(1997.12.4)	(74) 代理人 弁理士 足立 勉
審査請求日 平成16年4月5日(2004.4.5)	
(31) 優先権主張番号 特願平8-132160	(72) 発明者 新井 孝夫 千葉県野田市山崎2641 東京理科大学 理工学部応用生物科学科内
(32) 優先日 平成8年5月27日(1996.5.27)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	
微生物の受託番号 FERM BP-5301	審査官 小暮 道明
微生物の受託番号 FERM BP-5302	
微生物の受託番号 FERM P-15638	
微生物の受託番号 FERM P-15639	
微生物の受託番号 FERM P-15640	
微生物の受託番号 FERM P-15641	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト L E C T 2 に対する抗体、それを産生する細胞、その測定法及び測定用キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

融合細胞クローン G 2 A 5 D 7 (受託番号 F E R M P - 1 5 6 3 8) によって産生され、新規蛋白質ヒト L E C T 2 (配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質)と特異的に反応することを特徴とする抗体。

【請求項2】

融合細胞クローン A 1 G 1 C 6 (受託番号 F E R M P - 1 5 6 3 9) によって産生され、新規蛋白質ヒト L E C T 2 (配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質)と特異的に反応することを特徴とする抗体。

【請求項3】

融合細胞クローン 5 C 5 (受託番号 F E R M P - 1 5 6 4 0) によって産生され、新規蛋白質ヒト L E C T 2 (配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質)と特異的に反応することを特徴とする抗体。

【請求項4】

融合細胞クローン H 1 2 D 1 0 D 6 (受託番号 F E R M P - 1 5 6 4 1) によって産生され、新規蛋白質ヒト L E C T 2 (配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質)と特異的に反応することを特徴とする抗体。

【請求項5】

請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載の抗体を産生することを特徴とする融合細胞

。

10

20

【請求項 6】

融合細胞クローン G 2 A 5 D 7 (受託番号 F E R M P - 1 5 6 3 8)、A 1 G 1 C 6 (受託番号 F E R M P - 1 5 6 3 9)、5 C 5 (受託番号 F E R M P - 1 5 6 4 0)、及び H 1 2 D 1 0 D 6 (受託番号 F E R M P - 1 5 6 4 1) の群から選ばれた一つである請求の範囲第 5 項記載の融合細胞。

【請求項 7】

下記 a) ~ c) 及び d) ~ f) の工程を含み、下記第 1 の抗体は請求の範囲第 1 項 ~ 第 4 項のいずれかに記載された抗体であり、下記第 2 の抗体は請求の範囲第 1 項 ~ 第 4 項のいずれかに記載された抗体であって前記第 1 の抗体とは異なるものであることを特徴とするヒト L E C T 2 の測定法。

a) ヒト L E C T 2 と特異的に反応する第 1 の抗体を不溶性支持体に結合せしめてなる固相化抗体に標準物質としてのヒト L E C T 2 を反応せしめた後、

b) ヒト L E C T 2 と特異的に反応する第 2 の抗体を標識物質により標識化した標識抗体を反応させ、

c) この反応生成物の標識量を測定することにより検量線を作成する工程、及び

d) 前記固相化抗体に検体を反応せしめた後、

e) 前記標識抗体を反応させ、

f) この反応生成物の標識量を測定し、前記検量線から検体中に含まれるヒト L E C T 2 を測定する工程。

【請求項 8】

ヒト L E C T 2 と特異的に反応する第 1 の抗体を不溶性支持体に結合せしめてなる固相化抗体と、

ヒト L E C T 2 と特異的に反応する第 2 の抗体を標識物質により標識化した標識抗体とを備え、

前記第 1 の抗体は請求の範囲第 1 項 ~ 第 4 項のいずれかに記載された抗体であり、前記第 2 の抗体は請求の範囲第 1 項 ~ 第 4 項のいずれかに記載された抗体であって前記第 1 の抗体とは異なるものであることを特徴とするヒト L E C T 2 の測定用キット。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、新規な蛋白質ヒト L E C T 2 と反応する抗体、その抗体を産生する融合細胞、ヒト L E C T 2 の測定法及び測定用キットに関する。

背景技術

最近、好中球の癌細胞破壊反応への関与が知られるようになり、癌組織において好中球の浸潤像が観察されることから、好中球が癌細胞の分泌する走化性因子に反応したものと考えられている。

L E C T 2 (Leukocyte-derived chemotaxin 2) は、このような癌細胞から分泌される走化性因子を探索する中から見いだされたものであり、T 細胞白血病細胞 S K W - 3 の培養上清から得られた走化性因子と考えられるものである。

ヒト L E C T 2 は、T 細胞白血病細胞 S K W - 3 の培養上清中に存在するウシ血清中の L E C T 2 をコードする D N A を用いてヒトの c D N A ライブラリーの中から 9 0 % 以上のホモロジーを有する蛋白質として新たに見出されたものである。下記表 1 は、ヒト L E C T 2 とウシ L E C T 2 のアミノ酸配列を比較できるように示したものである。

【表 1】

10

20

30

40

ヒトLECT2 ウシLECT2	1 Met	Phe	Ser	Thr	5 Lys	Ala	Leu	Leu	Leu	10 Ala	Gly	Leu	Ile	Ser	15 Thr
ヒトLECT2 ウシLECT2	Ala	Leu	Ala	Gly	20 Pro	Trp	Ala	Asn	Ile	25 Cys	Ala	Gly	Lys	Ser	30 Ser
ヒトLECT2 ウシLECT2	Asn	Glu	Ile	Arg	35 Thr	Cys	Asp	Arg	His	40 Gly	Cys	Gly	Gln	Tyr	45 Ser
ヒトLECT2 ウシLECT2	Asn	Glu	Ile	Arg	Thr	Cys	Asp	<u>Gly</u>	His	Gly	Cys	Gly	Gln	Tyr	<u>Thr</u>
ヒトLECT2 ウシLECT2	Ala	Gln	Arg	Ser	50 Gln	Arg	Pro	His	Gln	55 Gly	Val	Asp	Val	Leu	60 Cys
ヒトLECT2 ウシLECT2	Ala	Gln	Arg	<u>Asn</u>	Gln	<u>Lys</u>	<u>Leu</u>	His	Gln	Gly	Val	Asp	Val	Leu	Cys
ヒトLECT2 ウシLECT2	Ser	Ala	Gly	Ser	65 Thr	Val	Tyr	Ala	Pro	70 Phe	Thr	Gly	Met	Ile	75 Val
ヒトLECT2 ウシLECT2	Ser	<u>Asp</u>	Gly	Ser	Thr	Val	Tyr	Ala	Pro	Phe	Thr	Gly	Ile	<u>Met</u>	
ヒトLECT2 ウシLECT2	Gly	Gln	Glu	Lys	80 Pro	Tyr	<u>Gln</u>	Asn	Lys	85 Asn	Ala	Ile	Asn	Asn	90 Gly
ヒトLECT2 ウシLECT2	Gly	Gln	Glu	Lys	Pro	Tyr	<u>Lys</u>	Asn	Lys	Asn	Ala	Ile	Asn	Asn	Gly
ヒトLECT2 ウシLECT2	Val	Arg	Ile	Ser	95 Gly	Arg	Gly	Phe	Cys	100 Val	Lys	Met	Phe	Tyr	105 Ile
ヒトLECT2 ウシLECT2	Val	Arg	Ile	Ser	Gly	<u>Gly</u>	Gly	Phe	Cys	<u>Ile</u>	Lys	Met	Phe	Tyr	Ile
ヒトLECT2 ウシLECT2	Lys	Pro	Ile	Lys	110 Tyr	Lys	Gly	Pro	Ile	115 Lys	Lys	Gly	Glu	Lys	120 Leu
ヒトLECT2 ウシLECT2	Lys	Pro	Ile	Lys	Tyr	Lys	Gly	<u>Ser</u>	Ile	Lys	Lys	Gly	Glu	Lys	Leu
ヒトLECT2 ウシLECT2	Gly	Thr	Leu	Leu	125 Pro	Leu	Gln	Lys	Val	130 Tyr	Pro	Gly	Ile	Gln	135 Ser
ヒトLECT2 ウシLECT2	Gly	Thr	Leu	Leu	Pro	Leu	Gln	Lys	Val	Tyr	Pro	Gly	Ile	Gln	Ser
ヒトLECT2 ウシLECT2	His	Val	His	Ile	140 Glu	Asn	Cys	Asp	Ser	145 Ser	Asp	Pro	Thr	Ala	150 Tyr
ヒトLECT2 ウシLECT2	His	<u>Ile</u>	His	Ile	Glu	Asn	Cys	Asp	<u>Leu</u>	Ser	Asp	Pro	Thr	Ala	Tyr
ヒトLECT2 ウシLECT2	151 Leu														

このヒトLECT2もウシLECT2同様の走化性因子であると考えられ、病態の把握や癌の治療への応用が期待されることから、このヒトLECT2の測定法を確立することが望まれた。

なお、当初、ウシLECT2をLECT2 a、ヒトLECT2をLECT2 bと称していたが、従前の名称は相応しくないことから名称を変更した。

本発明は上記課題に鑑みなされたものであり、ヒトLECT2に対する抗体、それを産生する細胞、その測定法及び測定用キットを提供することを目的とする。

発明の開示

上記課題を解決するため、本発明の第1である抗体は、ヒトLECT2（配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質）と特異的に反応することを特徴とする。かかる抗体としては、例えば、融合細胞クローンG2A5D7（受託番号FERM P-15638）によって産生される抗体、融合細胞クローンA1G1C6（受託番号FERM P-15639）によって産生される抗体、融合細胞クローン5C5（受託番号FER

10

20

30

40

50

M P - 1 5 6 4 0) によって産生される抗体、融合細胞クローン H 1 2 D 1 0 D 6 (受託番号 F E R M P - 1 5 6 4 1)、あるいは、融合細胞クローン 8 9 F 2 (受託番号 F E R M P - 1 6 2 2 9) によって産生される抗体がある。

本発明の第 2 である融合細胞は、ヒト L E C T 2 と特異的に反応する抗体を産生することを特徴とする。かかる融合細胞としては、例えば、融合細胞クローン G 2 A 5 D 7 (受託番号 F E R M P - 1 5 6 3 8)、A 1 G 1 C 6 (受託番号 F E R M P - 1 5 6 3 9)、5 C 5 (受託番号 F E R M P - 1 5 6 4 0)、H 1 2 D 1 0 D 6 (受託番号 F E R M P - 1 5 6 4 1)、8 9 F 2 (受託番号 F E R M P - 1 6 2 2 9) がある。

本発明の第 3 であるヒト L E C T 2 の測定法は、下記 a) ~ c) 及び d) ~ f) の工程を含むことを特徴とする。即ち、

a) ヒト L E C T 2 と特異的に反応する第 1 の抗体を不溶性支持体に結合せしめてなる固相化抗体に標準物質としてのヒト L E C T 2 を反応せしめた後、

b) ヒト L E C T 2 と特異的に反応する第 2 の抗体を標識物質により標識化した標識抗体を反応させ、

c) この反応生成物の標識量を測定することにより検量線を作成する工程、及び

d) 前記固相化抗体に検体を反応せしめた後、

e) 前記標識抗体を反応させ、

f) この反応生成物の標識量を測定し、前記検量線から検体中に含まれるヒト L E C T 2 を測定する工程。

本発明の第 4 であるヒト L E C T 2 の測定用キットは、ヒト L E C T 2 と特異的に反応する第 1 の抗体を不溶性支持体に結合せしめてなる固相化抗体と、ヒト L E C T 2 と特異的に反応する第 2 の抗体を標識物質により標識化した標識抗体とを備えたことを特徴とする。

本発明の第 3、第 4 において、第 1 の抗体は、融合細胞クローン G 2 A 5 D 7 (受託番号 F E R M P - 1 5 6 3 8) によって産生される抗体、融合細胞クローン A 1 G 1 C 6 (受託番号 F E R M P - 1 5 6 3 9) によって産生される抗体、融合細胞クローン 5 C 5 (受託番号 F E R M P - 1 5 6 4 0) によって産生される抗体、融合細胞クローン H 1 2 D 1 0 D 6 (受託番号 F E R M P - 1 5 6 4 1) によって産生される抗体、あるいは、融合細胞クローン 8 9 F 2 (受託番号 F E R M P - 1 6 2 2 9) によって産生される抗体であり、前記第 2 の抗体は前記 5 つの抗体のいずれかであって第 1 の抗体とは異なるものであることが好ましい。また、標識物質としては、例えば、ペルオキシダーゼ、ピオチン、- D - ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ及びマイクロペルオキシダーゼからなる群から選ばれたものを用いることができる。

本発明のヒト L E C T 2 の測定法及び測定用キットによれば、検体中に含まれる走化性因子ヒト L E C T 2 を測定することができるため、その測定結果を利用して肝臓等の病態の把握や治療への応用が可能となるという効果が得られる。

【図面の簡単な説明】

図 1 は E L I S A 法によるヒト L E C T 2 の検出結果を表すグラフであり、図 2 はウェスタンブロットによる各クローンのモノクローナル抗体の反応特異性を表す説明図であり、図 3 はヒト L E C T 2 の濃度と吸光度との関係を表すグラフであり、図 4 は急性肝炎患者検体の急性期と寛解期におけるヒト L E C T 2 の測定値を表すグラフであり、図 5 は健康者の組織の染色像を表す写真であり、(A) は 1 0 0 倍拡大写真、(B) は 2 0 0 倍拡大写真であり、図 6 は肝硬変患者の組織の染色像を表す写真であり、(A) は 1 0 0 倍拡大写真、(B) は 2 0 0 倍拡大写真である。

発明を実施するための最良の形態

[ヒト L E C T 2 に特異的に反応する抗体、及び、その抗体を産生する融合細胞]

ヒト L E C T 2 に特異的に反応する抗体の作製について以下に説明する。

A . 抗原

抗原としてはヒト L E C T 2 (配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質) をク

10

20

30

40

50

ローニングし、免疫原として使用した。

B．上記抗原による免疫

免疫動物としては哺乳動物であるマウスのほかラット、ハムスターなども用いることができる。通常マウスが最も汎用され、BALB/cマウス、その他の系(strain)のマウスを用いることができる。この際、免疫計画及び抗原の濃度は十分な量の抗原刺激を受けたリンパ球が形成されるよう選ばれるべきである。例えばマウス1匹に25 µgの抗原を2週間間隔で腹腔に3回免疫後、さらに25 µgを静脈に投与する。最終免疫の数日後に融合のための脾臓細胞を取り出す。

C．細胞融合

上記のごとく免疫した哺乳動物の個体から脾臓を無菌的に取り出し、そこから単細胞懸濁液を調製する。この脾臓細胞(抗体産生細胞)を適当な骨髓腫細胞と適当な融合促進剤の使用により細胞融合させる。骨髓腫細胞としては免疫動物と同種の哺乳動物に由来するものが望ましいが、ラット、ハムスター等の脾臓細胞とマウスの骨髓腫細胞を融合させることもできる。脾臓細胞と骨髓腫細胞の好ましい比率は約20:1~約2:1の範囲である。約 10^8 個の脾細胞について0.5~1.5 mlの融合媒体の使用が適当である。好ましい融合促進剤としては、例えば平均分子量1000~4000のポリエチレングリコールを有利に使用できるが、この分野で知られている他の融合促進剤(例えばセンダイウイルス(別名HVJ))を用いることもできる。また、これら融合促進剤を用いた方法以外に電気ショックを用いる方法により細胞融合を行ってもよい。

D．目的とする抗体を産生する融合細胞の選択

別の容器(例えばマイクロタイタープレート)で未融合の脾細胞、未融合の骨髓腫細胞及び融合した融合細胞の混合物を未融合の骨髓腫細胞を支持しない選択培地で希釈し、未融合の細胞を死滅させるのに十分な時間(約1時間)培養する。培地は薬物抵抗性(例えば8-アザグアニン抵抗性)で未融合の骨髓腫細胞を支持しないもの(例えばHAT培地)が使用される。この選択培地中では未融合の骨髓腫細胞は死滅する。この未融合の脾細胞は非腫瘍性細胞なので、ある一定期間後(1週間後)死滅する。これに対して融合した細胞は、骨髓腫の親細胞の腫瘍性と親脾細胞の性質を合わせ持つため、選択培地中で生存できる。

かくして、融合細胞が検出された後、前記のヒトLECT2に対する抗体について酵素免疫測定法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)によりスクリーニングを行い、ヒトLECT2と特異的に結合するモノクローナル抗体を産生する融合細胞だけを選択する。このような融合細胞として、例えば融合細胞クローンG2A5D7(受託番号FERM P-15638)、融合細胞クローンA1G1C6(受託番号FERM P-15639)、融合細胞クローン5C5(受託番号FERM P-15640)、融合細胞クローンH12D10D6(受託番号FERM P-15641)、融合細胞クローン89F2(受託番号FERM P-16229)が挙げられる。

F．目的とする抗体の取得

目的とする抗体を産生する融合細胞を適当な方法(例えば限界希釈法)でクローン化した後、抗体は2つの異なった方法で産生することができる。その第1の方法によれば、融合細胞を一定期間、適当な培地で培養することにより、その培養上清からその融合細胞の産生するモノクローナル抗体を得ることができる。第2の方法によれば、融合細胞は同質遺伝子、または半同質遺伝子を持つ免疫動物の腹腔に注射することができる。一定時間後の宿主動物の血液および腹水中より、その融合細胞の産生するモノクローナル抗体を得ることができる。

[ヒトLECT2の測定法]

A．固相化抗体

ヒトLECT2と特異的に反応する抗体を不溶性支持体に結合せしめてなる固相化抗体を作成するには、この抗体と不溶性支持体を接触させることにより不溶性支持体の表面に抗体を吸着させて行うほか、共有結合等の化学的な方法によっても結合させることができる。

10

20

30

40

50

不溶性担体としては、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリルニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライドなどの高分子、その他紙、ガラス、金属、アガロースおよびこれらの組み合わせなどを例示することができる。また、不溶性担体の形状としては、トレイ状、球状、棒状、線維状、盤状、容器状、セル、試験管など種々の形状であることができる。

B．標識抗体

ヒトLECT2に特異的に反応する抗体は、完全抗体であってもよく、FabまたはF(ab)₂等のフラグメントであってもよい。

標識物質としては、通常の免疫学的測定方法に使用し得るものであれば特に限定されるものではないが、酵素、アビジン、蛍光物質、発光物質及び放射性物質等を使用するのが好ましい。酵素としてはペルオキシダーゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、マイクロペルオキシダーゼ、蛍光物質としてはフルオレッセインイソチオシアネート、フィコビリプロテイン、フィコエリスリン等、発光物質としてはイソルシノール、ルシゲニン等、そして放射性物質としては¹²⁵I、¹³¹I、¹⁴C、³H等を用いることができる。また、標識物質としてビオチンを用いた場合にはさらに酵素標識アビジンを用いることにより高い感度を得ることができるので、より好ましい。この場合の標識酵素としては抗体に標識した場合の酵素と同様の酵素を用いることができるが、ペルオキシダーゼは特に好ましい。

酵素を標識物質として用いた場合にはその活性を測定するために基質、必要により発色剤が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質としてH₂O₂を用い、発色剤として2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩(ABTS)、5-アミノサリチル酸、o-フェニレンジアミン(OPD)、4-アミノアンチピリン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン等、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質としてo-ニトロフェニルフォスフェート等、酵素に α -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオロセイン-ジ-(α -D-ガラクトピラノシド)、4-メチルウンベリフェリル- α -D-ガラクトピラノシド等を用いることができる。

C．検量線の作成

固相化抗体に標準物質としてのヒトLECT2を反応せしめ、次いで固相化抗体と特異的に反応したヒトLECT2に標識抗体を反応させ、その後、この標識抗体の標識量を測定する。これにより、ヒトLECT2の量に対する標識量の関係、即ち検量線が得られる。この免疫学的測定方法において用いられる反应用媒体としては、例えばリン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、酢酸緩衝液などを含んだpH6.0~8.0の範囲のものが示される。

D．検体に含まれるヒトLECT2の測定

固相化抗体に検体を反応せしめ、次いで標識抗体を反応させる。このときに検体中に含まれるヒトLECT2の濃度に応じて標識抗体が反応する。その後、この標識抗体の標識量を測定する。この測定値を検量線に照らすことにより、検体中のヒトLECT2の濃度が測定される。尚、反应用媒体については、上記C.で述べた通りである。

[ヒトLECT2の測定用キット]

測定用キットは、少なくとも、

(1)ヒトLECT2と特異的に反応する第1の抗体を不溶性支持体に結合せしめてなる固相化抗体、

(2)ヒトLECT2と特異的に反応する第2の抗体を標識物質により標識化した標識抗体

を含み、その他に、反应用媒体を含んでいてもよいし、あるいは、標準物質(ヒトLECT2)を含んでいてもよい。尚、標識抗体の標識物質が酵素の場合には、通常、酵素の活性を測定するための基質及び反応停止液を含む。また、不溶性支持体、標識物質については上述したのでその説明は省略する。この測定用キットによれば、上述の測定法を実施することができる。

以下に、本発明の好適な実施例を図面に基づいて説明する。尚、本発明の実施の形態は、

下記の実施例に何ら限定されるものではなく、本発明の技術的範囲に属する限り種々の形態を採り得ることはいうまでもない。

[実施例1] 免疫原(ヒトLECT2)の作製

[1-1] ヒトLECT2のクローニングおよびクローニングされたヒトLECT2のヌクレオチド配列の決定

ヒトLECT2 cDNAのクローニングは次のようにして行った。50 µg/mlのPHA-P (DIFCO社製)でT細胞白血病細胞SKW-3を処理しpolyA⁺RNAを調製した。5 µgのpolyA⁺RNAを用い、oligo-dTをプライマーにしてファーストストランドcDNA(1st cDNA)を合成した。

次に、ウシLECT2(配列番号9にそのアミノ酸配列を示す)の部分アミノ酸配列を基にPCRのプライマーを合成した。即ち、アミノ酸配列WAIICAより6種類のオリゴヌクレオチドを演繹して5'のプライマーとし、アミノ酸配列HIENC Dより4種類のオリゴヌクレオチドを演繹して3'のプライマーとした。PCR法により、1st cDNAを鋳型とし上記プライマーの組み合わせである24種類の反応にてDNA断片の増幅を行った。アミノ酸配列DVLCS D GST V Y A P Fを基にDNAプローブ(GATGTC/GCTA/GTGCTCT/CGATGGC/GTCT/CACT/AGTC/GTATGCT/CCCT/CTT、配列番号4参照)を使い、増幅されたDNA断片をアガロースゲルで分離し、サザンブロットにより解析した。その結果、約370 bpのDNA断片が検出され、それをpUC19にクローニングした。

ヒト肝臓cDNAライブラリーを、クローニングされたcDNA断片をプローブとしてスクリーニングしたところ、130万個のクローン中12クローンの陽性クローンを得た。それぞれのクローンはすべて、制限酵素の解析により2種類に分けられることがわかり、それぞれのグループの一番長いcDNA断片のクローンの塩基配列の決定をした。その結果、2種類のcDNAは同一の遺伝子由来で3'側に存在する2種類のpolyAシグナルにより生じることが推定された。また、コードされたタンパク質のアミノ酸配列よりウシLECT2の決定されたアミノ酸配列に約90%のホモロジーを有することが判明し、このコードされると考えられるタンパク質をヒトLECT2と命名した。このヒトLECT2のアミノ酸配列及び塩基配列を配列番号1及び2に示す。

[1-2] ヒトLECT2遺伝子を含む組換えプラスミドの構築

クローニングされたヒトLECT2 cDNAをもとに、5'側のプライマーとしてGGCGAATTCGAAAACCTGTATTTTCAGGGGCCCTGGGCTAATATATG(配列番号5参照)、3'側のプライマーとしてCGCAAGCTTTTACAGGTATGCAGTAG(配列番号6参照)をそれぞれ用い、熱変性: 94、1分間、アニーリング: 55、2分間、伸長反応: 72、3分間、の25サイクルのPCR法にてヒトLECT2のcDNAを含むDNA断片を増幅させた。EcoRI、HindIIIでの処理後、この断片をpMALTM-C(Biolab Inc.)のEcoRI/HindIII部位にクローニングした。この組換えプラスミドを、pMAL-TEV-ヒトLECT2と命名した。この発現ベクターは、IPTG存在下で、tacプロモーターの制御下マルトース結合タンパク質(maltose-binding-protein)とヒトLECT2の融合タンパク質を産生させることができ、その連結部分にTEVプロテアーゼ(Tabacco Etch Virus由来)の切断部位が入っているので特異的な切断ができることが特徴である。

また、クローニングされたヒトLECT2 cDNAをもとに、5'側のプライマーとしてGCGGGATCCCCGGGCCATGGGCTAATAT(配列番号7参照)、3'側のプライマーとしてCGCGGATCCTTACAGGTATGCAGTAG(配列番号8参照)をそれぞれ用い、熱変性: 94、1分間、アニーリング: 55、2分間、伸長反応: 72、3分間、の25サイクルのPCR法にてヒトLECT2のcDNAを含むDNA断片を増幅させた。BamHIで処理後、この断片をpGEX-3X(Pharmacia Inc.)のBamHI部位にクローニングした。この組換えプラスミドを、pGEX-Xa-ヒトLECT2と命名した。この発現ベクターは、IPTG存在下で、tacプロモーターの制御下グルタチオン-S-トランスフェラーゼとヒトLECT2の融合タンパク質を産生させることができ、その連結部分にXaプロテアーゼの切断部位が入っているので特異的な切断ができることが特徴である。

[1-3] ヒトLECT2遺伝子を含む組換えプラスミドによる大腸菌の形質転換

10

20

30

40

50

上記のようにして得られた組換えプラスミド pMAL-TEV-ヒトLECT2 を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換後、得られた大腸菌クローンを、デオキシ法により期待された塩基配列を有するものに関してスクリーニングし、期待される DNA 断片を持つ大腸菌クローン Mal-ヒトLECT2 (受託番号 FERM P-14669、なお国際寄託へ移管請求したことにより受託番号 FERM BP-5302 が付された) を得た。

[1 - 4] 動物細胞によるヒトLECT2 の産生

pUC19 の BamHI 部位に HindIII から EcoRI の方向でクローニングされたヒトLECT2 cDNA の 5' 側をエキソヌクLEASE III により -14 の塩基配列まで欠失させ、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端にした後、PstI リンカーをライゲーションし、PstI と BglII で切断し、発現ベクター pCDL-SR 294 の PstI / BamHI 部位にクローニングした。この組換え発現ベクターをチャイニーズハムスター CHO 細胞にトランスフェクションし、ヒトLECT2 を高発現する株 1 株 (C1D8-1) (受託番号 FERM P-14668、なお国際寄託へ移管請求したことにより受託番号 FERM BP-5301 が付された) を得た。

(分子量の決定)

リコンビナントヒトLECT2 (動物細胞発現) は、³⁵S-メチオニンによってメタボリックラベルし、CHO 細胞の培養上清を SDS ゲル電気泳動にかけることにより検出した。その結果、分子量が約 14 kDa と 16 kDa の 2 本のバンド (16 kDa が主要であり、2 つのバンドはプロセッシングの違いにより生じると考えられる) が得られた。

[実施例 2] 免疫

上記実施例 1 のように作製した免疫原ヒトLECT2 100 μl とフロイントの完全アジュバント 100 μl を良く混合して懸濁液を作製し、この懸濁液を 2 匹のマウス (雄 BALB/c) の腹腔に 1 匹当たり抗原として 25 μl ずつ投与した。さらに 1 週間おきに同量の抗原を 5 回投与し、その 3 日後に脾臓を取り出し融合実験を行った。

別に、家兎 2 羽に対しても同様に免疫し、採決して血清を分離した後、常法に従い吸収操作を行い、IgG 分画を分離してポリクロナール抗体を得た。

[実施例 3] 細胞融合及び目的とするモノクローナル抗体を産生する融合細胞の選択と取得

摘出したマウスの脾臓細胞と、同系マウスの骨髄腫細胞 (SP-2/O-Ag-14) とを約 10 : 1 の割合で混合し、50% ポリエチレングリコール 4000 を融合促進剤として細胞融合を行った。融合後の細胞は 1×10^6 cells/ml の細胞濃度となるように 10% 牛血清を含む HAT 培地 (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む培地) に懸濁し、96 ウェルのマイクロタイタープレート (ヌンク社製マキシソープ、以下同じ) に 1 ウェルあたり 100 μl ずつ分注した。

融合細胞は、CO₂ インキュベータ (5% CO₂、37 °C) 中で培養し、HAT 培地で培地交換を行い、HAT 培地中で馴化し、さらに 10% FCS-RPMI 1640 培地で馴化した。

融合培養細胞上清中の抗体は、ヒトLECT2 蛋白質を固相化したマイクロタイタープレートを用いて ELISA 法により検出した。陽性となったウェルに対しては限界希釈法によるクローニングを 2 回繰り返して、ヒトLECT2 に対する反応性を有するクローンを 5 種類選択し、それぞれを G2A5D7、A1G1C6、5C5、H12D10D6、89F2 (受託番号 FERM P-15638、FERM P-15639、FERM P-15640、FERM P-15641、FERM P-16229) と命名した。

得られたクローンはそれぞれ 10% DMSO を含む 90% 牛血清中に懸濁させ、液体窒素中に保存した。各クローンの産生するモノクローナル抗体は、クローンをマウスの腹腔内で増殖させ、その腹水中からプロテイン-A セファロースカラムを用いてそれぞれを精製した。

[実施例 4] モノクローナル抗体の特異性の確認

1 ELISA 法による特異性の確認

ヒトLECT2 の PBS 溶液 (1 ~ 1000 ng/ml) を調製し、この溶液でヒトLECT

10

20

30

40

50

CT2を固相化したマイクロタイタープレートに各クローンの抗体溶液を反応させた後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン(カベル社製)を反応させ、オルトフェニレンジアミンと過酸化水素の溶液を基質として波長492nmにおける吸光度を測定した。その結果を図1に示す。

吸光度の値は固相化したヒトLECT2の濃度に伴って上昇し、ある濃度からは一定になることから、各クローンともヒトLECT2に特異的に反応することが確認された。

2 ウェスタンブロットによる特異性の確認

ヒトLECT2とマルトース結合タンパク質(MBP)の混合物を抗原としてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)(16.5%モノアクリルアミド/ビスアクリルアミド; 3%ビス/モノアクリルアミド+ビス)を行い、泳動後ウェスタンブロットにより反応の特異性を確認した。各クローンのモノクローナル抗体とも約16kDに反応性を認め、MBPとは反応しなかった。この結果を図2に示す。

尚、図2でCBBはクマーシーブリリアントブルーの略で蛋白染色を示す。第1レーンは分子量マーカー、他はヒトLECT2+MBPを抗原として泳動し、第1レーン、第2レーンは蛋白染色、他は各モノクローナル抗体によるウェスタンブロットを示す。

[実施例5] ELISA法によるサブクラスの確認

上記実施例3で得られた各モノクローナル抗体について、アメリカンコーレックス社製モノクローナルサブクラスイソタイプングキットを用いてクラス・サブクラスを確認した。結果はクローンA1G1C6及びG2A5がIgG2b、クローンH12D10がIgMであった。尚、クローン5C5、89F2については未確認である。

[実施例6] 抗体固相化

上記実施例3で得られたモノクローナル抗体クローンG2A5を0.1M炭酸緩衝液pH9.0で5 μ l/mlの濃度に調製し、96ウエルのマイクロタイタープレートの各ウエルに100 μ lずつ加え、4で20時間静置反応させた。抗体溶液を捨て、1%BSA、5%ショ糖を含むPBSを各ウエルに200 μ lずつ加え、室温(20~25)で2時間静置してブロッキングを行った。ブロッキング液を捨て、プレートを風乾し、固相化抗体を得た。この固相化抗体は乾燥剤と共に密封して保存した。

[実施例7] 標識抗体の作製

上記実施例2で得たポリクローナル抗体の精製IgG1mg当たり0.056Uのフィシンを添加し、37で8時間反応させた後、Ultragel ACA44を用いてゲルろ過し、Fab'分画を得た。このFab'分画にマレイミド法によりペルオキシダーゼを標識し、ペルオキシダーゼ標識抗体とした。なお、標識は医学書院刊、石川栄治著、「酵素免疫測定法第3版」に従って行った。

[実施例8] ヒトLECT2の測定

ヒトLECT2蛋白質をPBSで希釈して0.001~20ng/mlの溶液を調製し、この液200 μ lを上記実施例6で得た抗体固相化プレートの各ウエルに添加し、室温で1時間反応させた後、各ウエルをPBS300 μ lで4回洗浄し、余分のPBSを除き、上記実施例7で得たペルオキシダーゼ標識抗体(100 μ l)を加え、室温で1時間反応させ、再度PBSで洗浄し、テトラメチルベンジジンと過酸化水素の溶液100 μ lを加えて反応させ、1.5Nリン酸100 μ lを加えて反応を停止し、波長450nmにおける吸光度を測定した。このときの測定結果を表2及び図3に示す。

【表2】

10

20

30

40

Std. conc. (ng/ml)	A450
0.001	0.05
0.3	0.07
0.6	0.085
1.25	0.125
2.5	0.22
5	0.41
10	0.73
20	1.25

10

これにより、ヒトLECT2の量に対する標識量の関係、即ち検量線が得られ、この検量線を用いることにより検体中のヒトLECT2の量に対する標識量の関係、即ち、検量線が得られ、この検量線を用いることにより検体中のヒトLECT2の含有量を知ることができる。

急性肝炎の患者検体について、その急性期と寛解期における測定値の比較を行ったデータを表3及び図4に示す。

20

【表3】

検体	疾患名	病態	測定値(ng/ml)
T. S.	HA(B-type)	急性期	73
		寛解期	21
Y. H.	HA(B-type)	急性期	149
		寛解期	13
T. N.	HA(B-type)	急性期	70
		寛解期	18
C. S.	HA(C-type)	急性期	32
		寛解期	15
O. A.	HA(resistant)	急性期	121
		寛解期	31

30

測定系に関する予備的検討の結果、検体中のヒトLECT2は比較的早期にその抗原性を喪失すること、特に血清では速やかに抗原性が消失することが明らかとなったことから、検体として血漿を用い、各血漿は採血後速やかに分離することによって得たあと、測定時までには-20以下で凍結保存した。また、検体の希釈率が5倍以下の場合、測定値に影響を与える可能性があることから、検体は10倍希釈して測定した。

各検体の急性期及び寛解期の測定値を比較すると、明らかに寛解期において測定値が低下していることから、検体中のヒトLECT2の濃度は患者の病態を反映しているものと判断した。

このように、検体中の走化性因子ヒトLECT2の含有量を測定することができるため、その測定結果を利用して病態の把握や治療への応用が可能となる。

40

50

[実施例 9] 免疫組織染色

健常者の肝臓組織及びC型肝硬変患者の肝臓組織を取り、常法に従いホルマリン固定し、パラフィン包埋した。このパラフィン包埋組織からマイクロームを用いて組織切片を作製し、常法に従い脱パラフィンを用い、実施例3で得たモノクローナル抗体クローン89F2より精製したIgG分画のPBS溶液約100 μ l(5 μ g/ml)を切片にのせ、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後、PBSで洗浄した。これにペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG(ダコ社製)を37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させ、再度PBSで洗浄した後、3, 3', 5, 5'-ジアミノベンジジンと過酸化水素の溶液を反応させ染色した。細胞の核はヘマトキシリンで染色した。

図5は、健常者の組織の染色像を表す写真であり、(A)は100倍拡大写真、(B)は200倍拡大写真である。また、図6は、肝硬変患者の組織の染色像を表す写真であり、(A)は100倍拡大写真、(B)は200倍拡大写真である。

健常者、肝硬変患者の組織切片とも、肝細胞の細胞質にびまん性の染色を認めた。具体的には、健常者、肝硬変患者とも肝実質細胞にジアミノベンジジンの顆粒状の染色(茶色に染まっている)が認められたが、肝硬変患者では陰陽性の細胞の混在が認められ、健常者とは異なる染色パターン(健常者では肝実質細胞がすべて陽性)を示した。結合組織には染色は認められなかった。なおM図5及び図6の写真中、青く点状に染まっているのは核である。このことは、LECT2が細胞周期と何らかの関連を持っていることを示唆している。

産業上の利用可能性

本発明のヒトLECT2に対する抗体によれば、免疫治療や診断、及びこれらに関連した産業分野において有用である。また、本発明の融合細胞によれば、ヒトLECT2に対する抗体を入手するうえで有用である。更に、本発明のヒトLECT2に対する抗体は、ヒトLECT2の測定法及び測定用キットに用いることができる。この測定法及び測定用キットによれば、検体中に含まれるヒトLECT2(走化性因子と考えられる)を測定することができるため、その測定結果を利用して病態の把握や治療への応用が可能となるという効果が得られる。具体的には、例えば種々の疾患(例えば肝炎や肝硬変など)の患者から取り出した組織等に対し、本発明の抗体を反応させて、LECT2を発現している細胞が組織のどこに存在しているかを調べることができる。これにより各種疾患の診断や治療へつなげることが可能となる。

寄託機関

C1D8-1及びMaI-ヒトLECT2は、以下の国際寄託機関に、それぞれ下記の受託番号と寄託日で寄託されている。

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

住所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305)

受託番号及び寄託日

(1) C1D8-1

FERM BP-5301: 1994年11月25日

(2) MaI-ヒトLECT2

FERM BP-5302: 1994年11月25日

融合細胞クローンG2A5D7、A1G1C6、5C5、H12D10D6、89F2は、以下の国内寄託機関に、それぞれ下記の受託番号と寄託日で寄託されている。

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

住所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305)

受託番号及び寄託日

(1) 融合細胞クローンG2A5D7

FERM P-15638: 1996年5月21日

(2) 融合細胞クローンA1G1C6

FERM P-15639: 1996年5月21日

(3) 融合細胞クローン5C5

配列の長さ：1092

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源：ヒト

細胞の種類：肝臓

配列の特徴：

特徴を表す記号：5'UTR

存在位置：1..200

10

特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号：3'UTR

存在位置：657..1092

特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号：CDS

存在位置：201..656

特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号：mutation

存在位置：replace(372,"a")

replace(748,"g")

20

replace(961,"c")

replace(967,"c")

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：polyA signal

存在位置：684..689

1060..1065

特徴を決定した方法：E

配列

AAATCAAATA GCTATCCATG GAATATTAGA ACTTGACTTG CTCCATCCTC TTAAACTTTT 60
 TGTGTCTCAC ACTAAAGAAA TGAGAGATGC AGAATTCTAA GGCTAAATAG CTAGGAAGTA 120
 TTCATTCAAA CTTGAATATC TTCAAAGAGA GTGTGGGGGC AACTCTAATC AGAGGAAGAA 180
 ACTAAAGGAA GTAAAACCAG ATG TTT TCC ACC AAA GCC CTC CTT TTG GCT GGT 233

Met Phe Ser Thr Lys Ala Leu Leu Leu Ala Gly

1 5 10

CTG ATT TCT ACC GCA CTG GCA GGG CCA TGG GCT AAT ATA TGT GCT GGC 281

Leu Ile Ser Thr Ala Leu Ala Gly Pro Trp Ala Asn Ile Cys Ala Gly

15 20 25

AAG TCT TCC AAT GAG ATC CGG ACG TGT GAC CGC CAT GGC TGT GGA CAG 329

Lys Ser Ser Asn Glu Ile Arg Thr Cys Asp Arg His Gly Cys Gly Gln

30 35 40

TAC TCT GCT CAA AGA AGT CAG AGG CCT CAC CAG GGT GTG GAC GTC TTG 377

Tyr Ser Ala Gln Arg Ser Gln Arg Pro His Gln Gly Val Asp Val Leu

45 50 55

TGC TCT GCT GGA TCT ACT GTG TAG GCA CCA TTC ACT GGA ATG ATT GTG 425

Cys Ser Ala Gly Ser Thr Val Tyr Ala Pro Phe Thr Gly Met Ile Val

60 65 70 75

GGC CAG GAG AAA CCT TAT CAA AAC AAG AAT GCT ATC AAT AAT GGT GTT 473

Gly Gln Glu Lys Pro Tyr Gln Asn Lys Asn Ala Ile Asn Asn Gly Val

80 85 90

CGA ATA TCT GGA AGA GGT TTT TGT GTC AAA ATG TTC TAC ATT AAG CCA 521

Arg Ile Ser Gly Arg Gly Phe Cys Val Lys Met Phe Tyr Ile Lys Pro

95 100 105

ATT AAG TAT AAA GGT CCT ATT AAG AAG GGA GAA AAA CTT GGA ACT CTA 569

Ile Lys Tyr Lys Gly Pro Ile Lys Lys Gly Glu Lys Leu Gly Thr Leu

10

20

30

40

110	115	120	
TTG CCC TTG CAG AAA GTT TAT CCT GGC ATA CAA TCG CAT GTG CAC ATT			617
Leu Pro Leu Gln Lys Val Tyr Pro Gly Ile Gln Ser His Val His Ile			
125	130	135	
GAA AAC TGT GAC TCG AGT GAC CCT ACT GCA TAC CTG TAAATCGAAG			663
Glu Asn Cys Asp Ser Ser Asp Pro Thr Ala Tyr Leu			
140	145	150	
GCCAATGGTC AGATCTTCAA AATAAAAAGT CATCTTAAAA ACCTGGATGC ATACCCTTCT			723
CTTCAAGAAA TTTGTGTTCA CAAAAGAAAA ATGCATGAAG GGATGGATAC CCCATTTTCC			783
ATGACATGAT TATTACACAT TGCATGCCTG TATCAAACA TCTCACGTAC CTCATAAACA			843
TATACACCTA TGTACCCACA AAAATTTTTT AATTAATAAA AGGAAATTTG AGTTTAAATA			903
GAAACATGAT AAATGCAAGA AAGAAAACAT TTTGATTTTA ACTCATTGTC ACTCTGATGT			963
TCATGTGAAC TGGTTGCTTC GGGCTCTTTG ATCTGTCACC TATGGAATCT GAGTGGTTTT			1023
ATTTTTTAGA TTTCTCAGTC CCAAAGATCT AAGATAAATA AACAAGAGAA CTAAAAAAA			1083
AAAAAAAA			1092

配列番号 : 3

配列の長さ : 1092

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

起源 : ヒト

細胞の種類 : 肝臓

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : 5'UTR

存在位置 : 1..200

特徴を決定した方法 : P

特徴を表す記号 : 3'UTR

存在位置 : 657..1092

特徴を決定した方法 : P

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 201..656

特徴を決定した方法 : P

特徴を表す記号 : mutation

存在位置 : replace(372,"a")

replace(748,"g")

replace(961,"c")

replace(967,"c")

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : polyA signal

10

20

30

40

50

存在位置 : 684..689

1060..1065

特徴を決定した方法 : E

配列

AAATCAAATA GCTATCCATG GAATATTAGA ACTTGACTTG CTCATCCTC TTAACTTTT 60

TGTGTCTCAC ACTAAAGAAA TGAGAGATGC AGAATTCTAA GGCTAAATAG CTAGGAAGTA 120

TTCATTCAAA CTTGAATATC TTCAAAGAGA GTGTGGGGGC AACTCTAATC AGAGGAAGAA 180

配列の型：核酸

トポロジ：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA (プライマー)

配列

GGCGAATTGG AAAACCTGTA TTTTCAGGGG CCCTGGGCTA ATATATG

配列番号：6

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジ：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA (プライマー)

10

配列

CGCAAGCTTT TACAGGTATG CAGTAG

配列番号：7

配列の長さ：28

配列の型：核酸

トポロジ：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA (プライマー)

配列

GCGGGATCCCCGGGCCATGGGCTAATAT

配列番号：8

20

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジ：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA (プライマー)

配列

CGCGGATCCTTACAGGTATGCAGTAG

配列番号：9

配列の長さ：98

配列の型：アミノ酸

トポロジ：直鎖状

配列の種類：タンパク質

30

配列

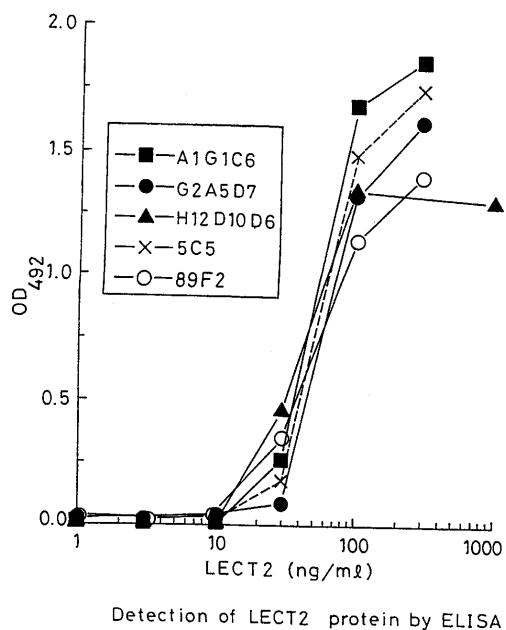
Gly Pro Trp Ala Ile Ile Cys Ala Gly Lys Ser Ser Asn Glu Ile Arg
 1 5 10 15
 Thr Cys Asp Gly His Gly Cys Gly Gln Tyr Thr Ala Gln Arg Asn Gln
 20 25 30
 Lys Leu His Gln Gly Val Asp Val Leu Cys Ser Asp Gly Ser Thr Val
 35 40 45
 Tyr Ala Pro Phe Thr Gly Ile Met Gly Gln Glu Lys Pro Tyr Lys Asn
 50 55 60
 Ile Ser Gly Gly Gly Phe Cys Ile Lys Tyr Lys Gly Ser Ile Val Tyr
 65 70 75 80
 Pro Gly Ile Gln Ser His Ile His Ile Glu Asn Cys Asp Leu Ser Asp
 85 90 95
 Pro Thr

10

20

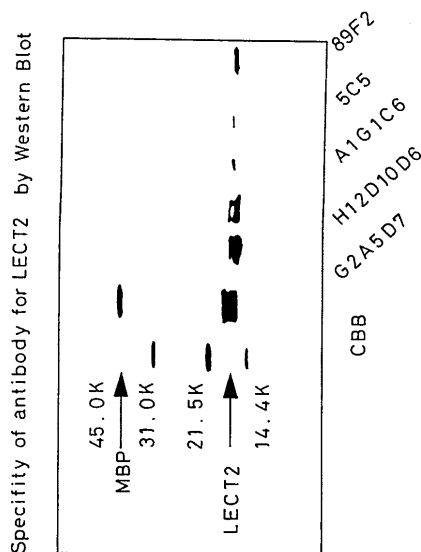
【 1 】

FIG.1



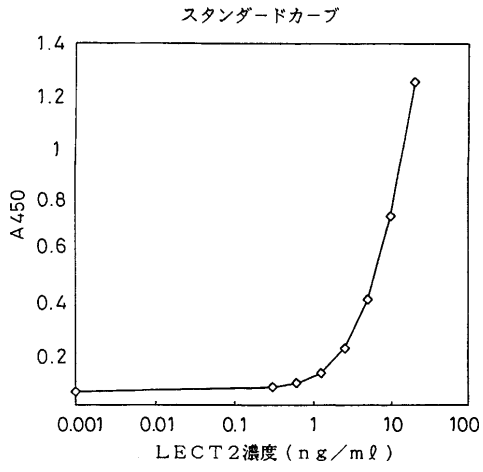
【 2 】

FIG.2



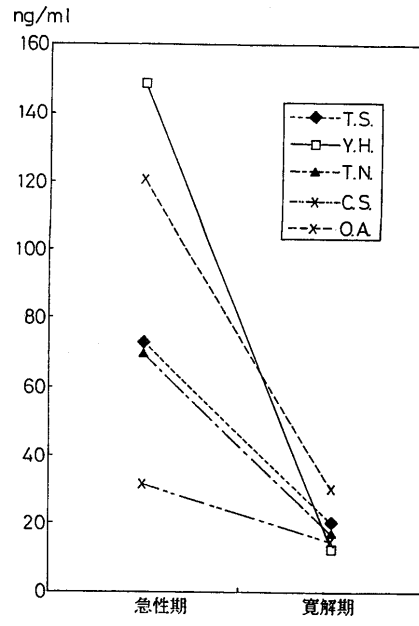
【 図 3 】

FIG. 3



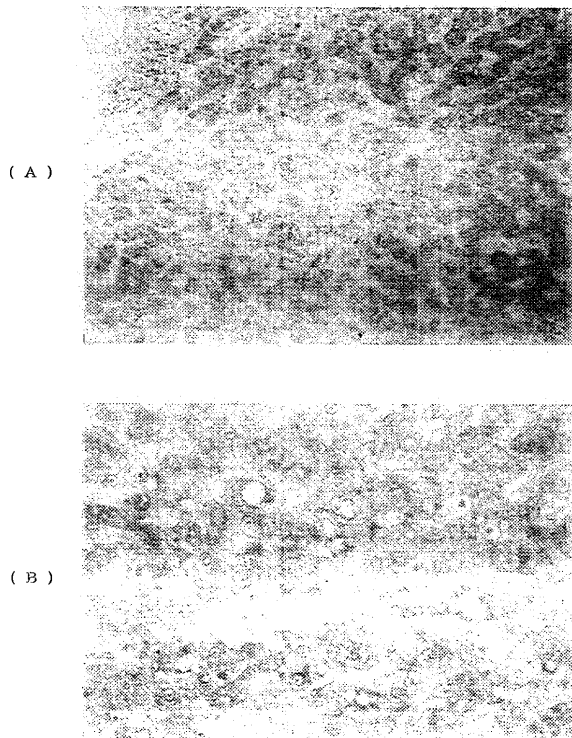
【 図 4 】

FIG. 4



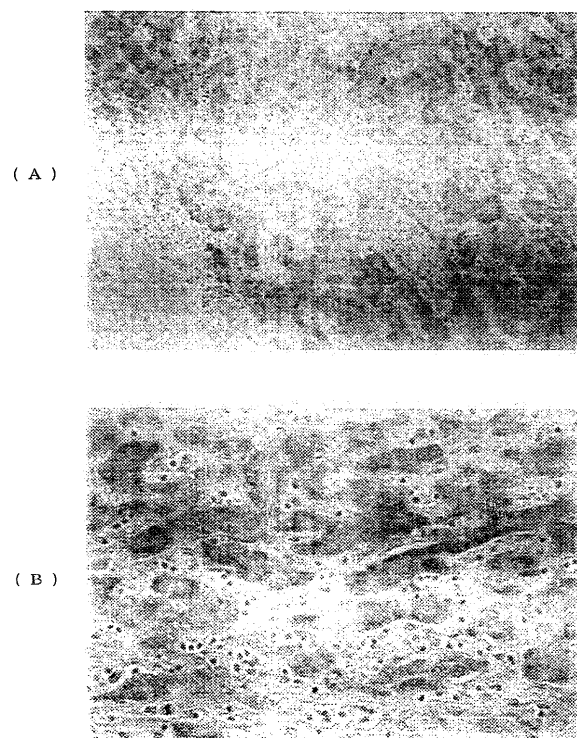
【 図 5 】

FIG. 5



【 図 6 】

FIG. 6



フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/02 (2006.01) C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08
C 1 2 R 1/91 (2006.01) C 1 2 R 1:91

微生物の受託番号 FERM P-16229

(56) 参考文献 特開平 0 8 - 1 4 0 6 8 3 (J P , A)

Journal of interferon research, 13[suppl.1](1993) S76

1993年10月24日-28日に、東京の京王プラザホテルで開催された「The 1993 ISICR meeting on the interferon system」において山越智氏によって発表された事項(PW1-19)

(58) 調査した分野(Int.Cl. , D B名)

C12N 15/00 - 15/90

BIOSIS/WPI(DIALOG)

JSTPlus(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/Geneseq

CA/REGISTRY(STN)