

モリタ イズミ

氏名(本籍)	森田 いずみ (兵庫県)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	論博第44号
学位授与年月日	平成30年12月20日
学位授与の条件	学位規程第4条第2項該当者
学位論文の題名	低分子薬物・バイオマーカーの高性能モニタリングを指向した特異モノクローナル抗体の新規調製と機能改変
論文審査委員	主査 教授 小林 典裕 副査 教授 土反 伸和 副査 准教授 竹内 敦子 副査 准教授 八巻 耕也

論文内容の要旨

緒言

我が国における覚せい剤、麻薬、危険ドラッグなど、いわゆる規制薬物の乱用に係わる問題は、依然憂慮すべき状況にある。これら規制薬物の税関における密輸の取り締まりや、被疑者確保の現場における使用歴の証明などのために、捜査現場で検査と結果の判定が可能で、かつ十分な感度と特異性を有する「オンサイト分析法」が必要とされている。一方、我々は日常生活において、様々な有害物質に曝露されるリスクを抱えている。最も身近な例として受動喫煙が挙げられるが、その程度を評価するうえで、タバコ煙に含まれるニコチンの主代謝物、(S)-(-)-コチニン (cotinine ; CT) が有用な環境バイオマーカーとなる。このような規制薬物やバイオマーカーのモニタリングには、免疫測定法(イムノアッセイ)が適しているが、その性能は用いる抗体の性能に支配される。したがって、実用的な免疫測定法を確立するためには、分析対象物質に対して十分な親和力と特異性を示す抗体を入手することが必須である。¹⁾ 今日、様々な物質に対する抗体が市販されているが、これまでに測定例のない物質について免疫測定法を確立する場合には、抗体を新規に作製することが必要になる。

現在、分析・診断用抗体の大半はB細胞ハイブリドーマ法により調製されている。²⁾ すなわち、標的抗原で動物を免疫し、活性化されたB細胞をミエローマ細胞と融合させ、目的とする特異抗体を産生しつつ増殖を続けるハイブリドーマ細胞クローンを樹立するもので、継続的に一定品質の抗体を得ることができる。規制薬物や環境バイオマーカーの多くは、それ自体で免疫原性を持たない低分子化合物であり、免疫化学的に「ハプテン」に分類される。ハプテンを認識する抗体を得るためには、これを適切な高分子キャリアーとの結合体としたのちに動物に免疫投与することが必要である。しかし、分子量がとくに小さく、特徴的な官能基に乏しいハプテンについては、その化学構造上の特徴を活かした免疫原を調製することが困難なため、親和力の高い抗体を得ることは難しい。

こうした問題の解決策として、ハイブリドーマ抗体のような動物由来の(天然の)抗体分子を遺伝子レベルで改変してより優れた機能を持つ人工の抗体分子種を創製する、抗体工学的アプローチが有望と期待されている。分析・診断用抗体の多くはイムノグロブリンG(IgG)であるが、2本のH鎖と2本のL鎖を有する。

のL鎖から成る分子量約15万の糖タンパク質で、その抗原結合部位はH鎖およびL鎖の2つの可変部ドメイン（それぞれV_HとV_L）の間に形成される。これら可変部ドメインの遺伝子をクローニングし、それらを連結して一本鎖Fvフラグメント（single-chain Fv fragment ; scFv）の遺伝子を構築したのちに、ランダムな核酸塩基の変異を導入する。scFvは、いわば人工のミニ抗体で、IgGに比べて分子量が小さく（約1/6）、遺伝子操作が容易である。これを大腸菌などに発現させて、莫大な種類の変異抗体の分子集団（ライブラリー）を作製する。そのなかから「偶然に」もとの抗体（野生型抗体）よりも優れた性能を獲得した分子種（クローン）を選択・単離するもので、そのプロセスは、生体内で起こるクローン選択と類似している。実際、この抗体工学の戦略により、タンパク質抗原については既に実用的な抗体が得られているが、^{3,4)} 抗ハブテン抗体の機能改善についてはいまのところ成功例が少ない。^{4,5)}

著者は、規制薬物および環境バイオマーカーとなる低分子化合物の高性能なモニタリングシステム構築を目的に、必須となる特異モノクローナル抗体の新規調製を試みるとともに、抗体工学の手法を用いてその機能改変に取り組むこととした。さらに、得られた変異scFvについて、ELISAにおける感度や特異性について検討を行った。

第1章 ハイブリドーマ法による特異モノクローナル抗体の新規調製

第1節 序

規制薬物や様々なバイオマーカーについて、高感度で迅速なモニタリングを行ううえで有用な免疫測定法を確立するため、測定対象物に対してより高い親和力と特異性を示す抗体が不可欠である。また、遺伝子レベルで改変した人工抗体を用いる先端の免疫測定法を開発するためには、抗体可変部の遺伝子情報が必要であり、そのためにも抗体産生ハイブリドーマの自作が望まれる。そこで本章では、そのオンサイトでのモニタリングが求められている低分子量の規制薬物・バイオマーカーのなかからΔ⁹-テトラヒドロカンナビノール（Δ⁹-tetrahydrocannabinol ; THC）、ケタミン（ketamine ; KT）、およびCTを取り上げ、ハイブリドーマ法により実用的なマウスモノクローナル抗体を新規に調製することを試みた。

第2節 Δ⁹-テトラヒドロカンナビノールに対する抗体の調製と諸性質

大麻（マリファナ）は *Cannabis sativa* L. から得られる生薬で、世界中で最も乱用されている規制薬物であり、^{6~8)} THC（図1）が主な向精神作用化合物である。THCは典型的なハブテンであり、抗THC抗体を得るためには、これを適切なキャリアーと連結して動物に投与する必要があるが、THCの化学修飾は極めて難しい。そこで、市販のTHC-BSA結合体を免疫原とし、BALB/cマウスを繰り返し免疫し、血中の抗THC抗体価の上昇を比較した。抗体価の評価は、THC-BSAを固定化したマイクロプレートを用い、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ（peroxidase ; POD）で標識した抗マウス抗体を用いるELISAにより行った。良好な免疫応答を示したマウスに最終免疫を行い、3日後に脾細胞をP3/NS1/1-Ag4-1（NS1）ミエローマ細胞と融合させた。^{9,10)} この融合細胞をHAT培地により培養してハイブリドーマを選択し、その培養上清を先述のELISAに付してスクリーニングを行った。抗体産生能の強い7ウェルのハイブリドーマを限界希釈法によりクローニング

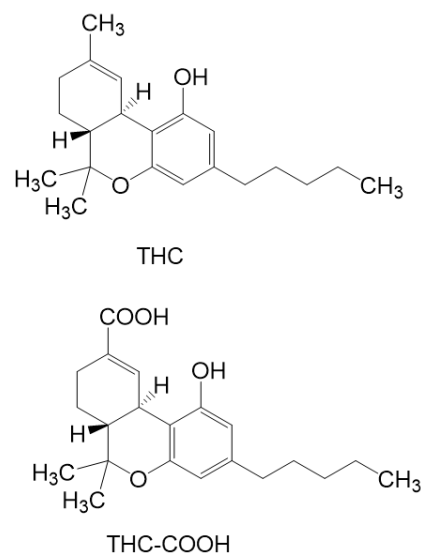


図1. THC および THC-COOH の構造

して、4種の抗THC抗体産生細胞株を樹立した。これらの産物として得られた4種のモノクローナル抗体を用いて競合ELISAを行い、アッセイ感度の指標となるmidpoint (50%阻害率を示すTHC量)を比較したところ、Ab-THC#12、#15、#30、#33でそれぞれ7.0、3.0、40、1.1 ng/assayであった(図2)。最も高感度に応答したAb-THC#33は、被疑物質中のTHCの検出に応用が可能と考えられた。本抗体をパパイン処理してFabフラグメントを調製し、バイオレイヤー干渉(biolayer interferometry; BLI)法によりセンサーチップ上のTHC基に対する結合パラメータの測定を行ったところ、結合速度定数(k_a)、解離速度定数(k_d)はそれぞれ、 2.1×10^4 L/(mol·s)、 3.4×10^{-4} 1/sであり、結合定数 $K_a (=k_a/k_d)$ は 6.2×10^7 L/molと算出された。本抗体は、THCのヒト尿中代謝物であるTHC-COOH(図1)には更に高感度に応答し(midpoint 0.20 ng/assay)、大麻使用歴の判定にも応用が可能と期待された。しかし、そのTHCに対する結合定数 K_a は 10^7 L/molのオーダーにとどまり、更なる改善が可能か、興味を持たれた。

第3節 ケタミンに対する抗体の調製と諸性質

KTは優れた麻酔薬であるが、世界中で規制薬物として問題視されており、特に若い世代では、「クラブドラッグ」として乱用が拡大している。^{11,12)} 日本では、医療用として(R)-KTと(S)-KT(図3)のラセミ体が塩酸塩[(±)-KT·HCl]として供給されているが、各異性体の薬理作用は異なっており、(S)-KTがより強い鎮痛作用と麻酔作用を示すことが知られている。^{13~15)} 新たに免疫測定法を開発するためには、高感度かつ特異的にKTに反応する抗体が不可欠であるが、現在、抗KT抗体の入手は難しい。そこで、抗KT抗体の自力作製を試みた。市販のKT-BSA(a)と自作したKT-BSA(b)[著者らが合成したKT-COOH(図3)をBSAに結合させたもの]を、それぞれBALB/cもしくはA/Jマウスへ繰り返し投与した。KT-BSA(a)、KT-BSA(b)のそれぞれの免疫群のなかで良好な免疫応答を示したマウスに最終免疫を行い、第2節に準じて細胞融合を行い、クローニングを経て、KT-BSA(a)免疫群から2種、KT-BSA(b)

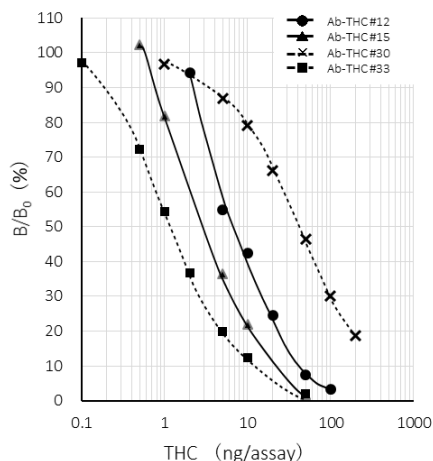


図2. モノクローナル抗THC抗体を用いたELISAにおけるTHCの用量作用曲線

各点は2重測定の平均値である。

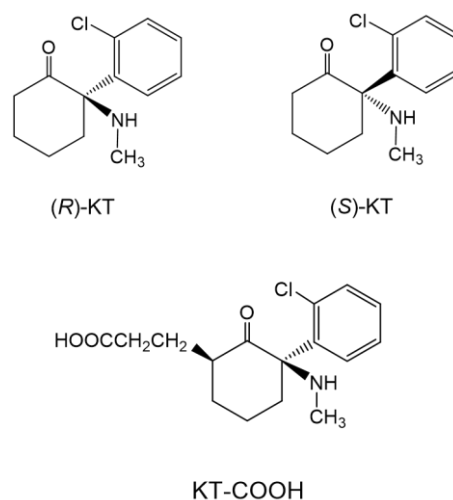


図3. KTおよびKT-COOHの構造

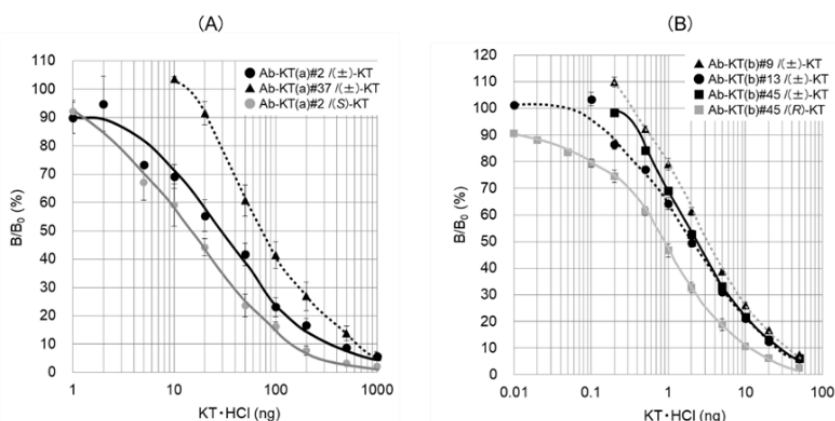


図4. モノクローナル抗KT抗体を用いたELISAにおけるKT·HClの用量作用曲線

(A): KT-BSA(a)免疫群由来の抗体による用量作用曲線

(B): KT-BSA(b)免疫群由来の抗体による用量作用曲線

エラーバーは、4重測定における標準偏差 (standard deviation; SD) を示す。

免疫群から2種、KT-BSA(b)

免疫群から3種の抗体産生細胞株を樹立した。これらの産物として得られた5種モノクローナル抗体のうち、KT-BSA(a)に由来する2種 [Ab-KT(a)#2、#37] は(S)-KT・HClに、KT-BSA(b)に由来する3種 [Ab-KT(b)#9、#13、#45] は(R)-KT・HClに、それぞれ特異的であった。5種抗体のうち、Ab-KT#45は(±)-KT・HClに対するELISAにおいて高感度な用量作用曲線 (midpoint 2.1 ng/assay) を与えた(図4)。また、BLI法において、(±)-KT基に対して満足のいく結合定数 K_a (7.7×10^8 L/mol) を示した。(±)-KT・HClに対する反応性を100%とすると、本抗体の(R)-KT・HClに対する交差反応性は210%、(S)-KT・HClに対する交差反応性は3.6%であった。乱用目的で流通しているKTは(±)-KTか(S)-KTであるが、Ab-KT#45は、(S)-KT・HClについても実用上十分な感度に応答するため (midpoint 50 ng/assay)、KT不正使用の取り締まりを目的とするオンサイト分析に適するものと考えられた。

第4節 コチニンに対する抗体の調製と諸性質

タバコ煙曝露により体内に吸収されたニコチンは半減期2時間程度と短く不安定で、CTおよびその誘導体に変換されて尿中に排泄される(図5)。^{16~18)} CTの半減期は20時間と長く、化学的に安定であるため、受動喫煙によるタバコ煙曝露量を知る客観的指標として最適と考えられている。^{16,19~21)} そこで、受動喫煙のモニタリングに有用な免疫測定法の確立を目標として、モノクローナル抗CT抗体の新規調製を試みた。ハプテンキャリアー結合体(CT-BSA)は、著者らが合成したCT誘導体(CT-COOH)(図5)をBSAと結合させて調製した。BALB/cマウスをCT-BSAで繰り返し免疫し、その血中の抗CT抗体価をELISAにより比較した。すなわち、CT-COOHと卵白アルブミンの結合体を固定化したプレートに、希釈したマウス血清を加え、プレート上に結合した抗体をPOD標識抗マウスIgG抗体で検出した。強い反応を示したマウス個体に最終免疫を行い、第2節と同様に細胞融合を行い、クローニングを経て、12種の抗体産生細胞株を樹立した。得られる12種のモノクローナル抗体を用いて競合型ELISAを行った。すなわち、第2抗体をプレートに固定化したのち、抗CT抗体を含むハイブリドーマ培養上清を加えた。次に、CT標準品と自作したビオチン標識CT(CT-bio)を競合的に反応させたのち、プレート上のCT-bioをPOD標識ストレプトアビジンで検出した。このELISAにおいて、細胞株#45-2に由来する抗体Ab-CT#45が最も高感度なCTの用量作用曲線を与えた(図6●)。しかし、そのmidpointは4.7 ng/assayであり、ステロイド類の免疫測定法(通例<1 ng)と比べた場合、高感度とは言い難い。CTに対する結合定数 K_a を蛍光消光法により求めたところ、

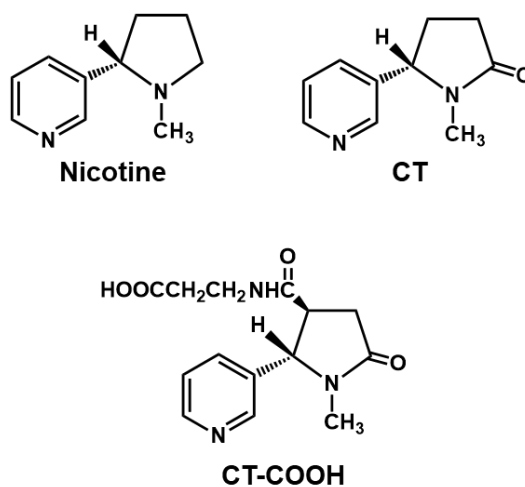


図5. ニコチン、CT、およびCT-COOHの構造

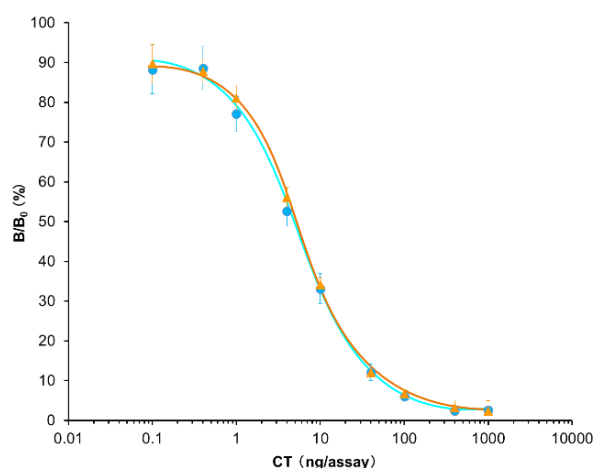


図6. モノクローナル抗CT抗体Ab-CT#45を用いたELISAにおけるCTの用量作用曲線

●: ブランク尿 (-)
▲: ブランク尿 (+)
エラーバーは、4重測定におけるSDを示す。

4×10⁶ L/molにとどまり、測定感度の不足と符合する結果であった。本抗体は尿中の CT 代謝物を十分に識別し、ブランク尿の添加により尿成分による妨害を抑えることで、試料の前処理を行うことなく受動喫煙の評価が可能な尿中 CT の ELISA が可能であった。しかし、抗体の親和力が低いため、用量作用曲線の感度が不十分であり(ブランク尿添加時の midpoint は 5.3 ng/assay ; 図 6 ▲)、受動喫煙下限レベル (5 ~10 ng/mL) の試料を測定するためには、改善が必要と思われた。

第 5 節 考察

本章では、取り組んだ 3 種のハプテン (THC、KT、CT) のいずれについても実用的な特異性を示すモノクローナル抗体を樹立することができたが、抗 THC 抗体 ($K_a < 10^8$ L/mol) と抗 CT 抗体 ($K_a < 10^7$ L/mol) については、その親和力に不満が残った。この問題の解決策として、本研究で用いたものとは異なるマウス系統あるいはラット、モルモットを免疫することも選択肢の一つであろう。これに対して、著者の所属する研究室では、遺伝子工学的手法を用いて抗体の構造を改変することにより親和力の向上した変異抗体分子種を創製し、アッセイ感度の向上に成功している。そこで、本章で得られた抗 THC 抗体および抗 CT 抗体について第 2 章で同様の手法を用い、親和力を向上させた変異体への改変に取り組むこととした。

第 2 章 遺伝子操作による抗体機能の改変

第 1 節 序

超高感度な免疫測定法を確立するためには、大きな親和力で測定対象の抗原と結合する抗体が必須である。ハプテンの測定では、いまのところ競合法に頼らざるを得ず、過剰量の抗体を反応させることができないため、この制約が特に厳しい。1990 年代から急速に発展してきた抗体工学の手法を用いることにより、動物からは得られない一次構造を持ち、天然の抗体を上回る抗原結合能 (親和力や特異性) を示す変異抗体を得ることが可能視される。実際、著者の所属する研究室では、卵胞ホルモンであるエストラジオール-17β に対するマウス抗体を、3 段階の変異導入と改良型変異種の選択を経て、同抗体の Fab フラグメントよりも 250 倍大きな K_a を示す scFv に改変することに成功している。^{22,23)} そこで、本章では、前章で樹立した THC および CT に対するモノクローナル抗体の親和力の改善を目的として、遺伝子工学による抗体分子の改変を企てた。

第 2 節 抗 Δ⁹-テトラヒドロカンナビノール抗体の機能改変

前章で作製した Ab-THC#33 を scFv に変換し、その遺伝子に変異を導入することにより THC への親和力が向上した変異体の創製を試みた。まず、Ab-THC#33 産生ハイブリドーマ株より総 RNA を抽出し、逆転写反応を行って、H 鎖および L 鎖の可変部遺伝子 (V_H および V_L 遺伝子) を含む cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、ユニバーサルプライマー²⁴⁾ を用いる polymerase chain reaction (PCR) あるいは 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends)²⁵⁾ を行い、 V_H および V_L 遺伝子を含む DNA 断片を得た。これらの

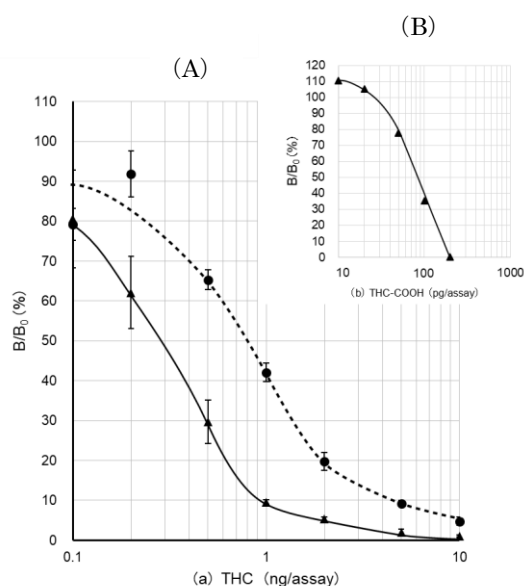


図 7. THC-scFv-wt または THC-scFv#m1-36 を用いた ELISA における THC (A) および THC-COOH (B) の用量作用曲線

● : THC-scFv-wt ▲ : THC-scFv#m1-36
エラーバーは、4 重測定における SD を示す。

DNA 塩基配列をもとに、 V_H 、 V_L 各遺伝子の 5'末端と 3'末端に相補的なプライマーをそれぞれ設計して PCR を行い、*scFv* 遺伝子を構築するための V_H および V_L 断片を調製した。両者を overlap extension PCR に付して、 V_H と V_L をリンカーペプチド (GGGGS)₃ をコードする塩基配列を介して連結し、*THC-scFv-wt* 遺伝子 (5'- V_H -linker- V_L -FLAG-3') を構築した。本遺伝子を *scFv* の発現・ファージ提示用ベクターとして開発された pEXmide 5²⁶⁾ にサブクローニングして、その塩基配列を確認した。

引き続き、条件の異なる error-prone PCR を行って、可変部遺伝子全体へランダム変異を導入し、変異 *scFv* のライブラリーを作製した。すなわち、 Mn^{2+} イオンの添加濃度として 0 または 0.10 mmol/L の 2 条件を、dNTP 混合物の組成として dATP のみを 1/5 に減じた条件と、dGTP のみを 1/5 に減じた条件を採用し、両者の組み合わせ計 4 条件とした。上記の *THC-scFv-wt* 遺伝子を鋳型としてその V_H または V_L 領域を増幅し、変異 V_H 、 V_L の各 DNA 断片を 4 種ずつ得た。同じ条件で得られた変異 V_H と V_L 遺伝子を overlap extension PCR に付し、変異 *scFv* 遺伝子ライブラリー 4 種を得た。それぞれ pEXmide 5 にサブクローニングしたのち大腸菌 XLI-Blue 細胞に導入し、変異 *THC-scFv* 提示ファージのライブラリーを作製した。得られた 4 種のファージライブラリーのうち、dATP を減じて作製したものと dGTP を減じて作製したものについて、 Mn^{2+} イオンが異なる 2 種をほぼ同量ずつ (cfu 値として) 混合してそれぞれパンニングに付したところ、ELISA において *THC-scFv-wt* を提示するファージより 3 倍高い感度 (midpoint の比較による) を示す変異体 *THC-scFv#m1-36* が得られた (図 7A)。この変異 *scFv* は、その V_H -CDR2 の N 末端、すなわち V_H 50 番目にセリン (S) からトレオニン (T) への保存的置換を持つのみであった (図 8)。なお、CDR (complementarity-determining region) は、可変部に 3 カ所存在して抗原と直接相互作用する配列であり、N 末

端側から、1、2、3 と区別されている。続いて、本変異体を可溶性タンパク質として調製し、その諸性質について評価した。センサーチップ上の THC 基に対する

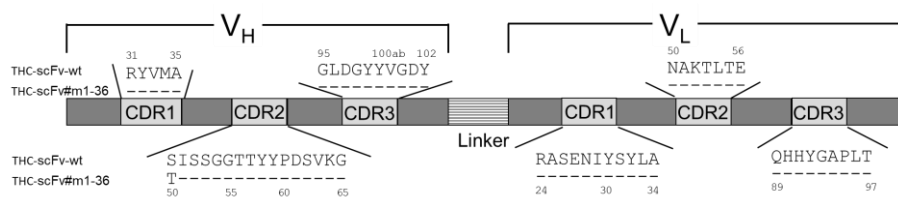


図 8. *THC-scFv-wt* と *THC-scFv#m1-36* の一次構造

CDR (Kabat の定義²⁷⁾ に基づく) のアミノ酸配列を一文字表記で示す。

K_d 値を BLI 法により求めたところ、*THC-scFv#m1-36* では 1.1×10^8 L/mol と、*THC-scFv-wt* (1.1×10^7 L/mol) より 10 倍高い値が得られた。また、*THC-COOH*、*THC-COOH* のグルクロン酸抱合体 (*THC-COOGlu*) に対する交差反応性は、*THC-scFv-wt* では、400%、83%、*THC-scFv#m1-36* については、813%、26%であった。大麻を摂取した場合、THC は速やかにヒトの体内で *THC-COOH* へ、さらには *THC-COOGlu* へと代謝されるため、これらの極性代謝物は大麻摂取歴を示すマーカーとなりうる。変異体 *THC-scFv#m1-36* は、*THC-COOH* に対して上述のように大きな交差反応性を示したが、そのため本代謝物に対してピコグラムオーダーの測定範囲を持つ高感度な用量作用曲線 (midpoint は 80 pg/assay) を与えた (図 7B)。それゆえ *THC-scFv#m1-36* は、実用的な分子認識パターンを有し、大麻試料中 THC のみならず大麻使用者の尿中 THC 極性代謝物の検出にも有用と期待された。

第 3 節 抗コチニン抗体の機能改変

抗 CT 抗体 Ab-CT#45 を *scFv* 化するために、第 2 節に準じてその可変部ドメイン (V_H と V_L) の遺伝子をクローニングして、目的の V_H および V_L の全長をコードする遺伝子断片を得た。これらを overlap extension PCR に付して、リンカーペプチド (GGGGS)₃ をコードする塩基配列を介して連結し、野生型 *CT-scFv-wt* 遺伝子 (5'- V_H -linker- V_L -FLAG-3') を構築した。次に、抗体の CT への親和力の向上を図るために、error-prone PCR によりランダム変異の導入を試みた。添加する Mn^{2+} について 0 または 0.50 mmol/L

の2条件で変異 V_H , V_L 各 DNA 断片を増幅し、以下、第2節に準じ変異 *scFv* ライブラリーを調製した。これらをファージ提示したのち、3サイクルのパンニングに付し、CTに対する結合能を保持する *scFv* 提示ファージを選択した。3サイクル目のパンニングで回収されたファージの感染菌をクローン化し、競合 ELISA によりその CT 結合能を評価したところ、強い陽性シグナルを示す3種(#m1-17、#m1-54、#m1-106)のファージクローンを得た。提示されている

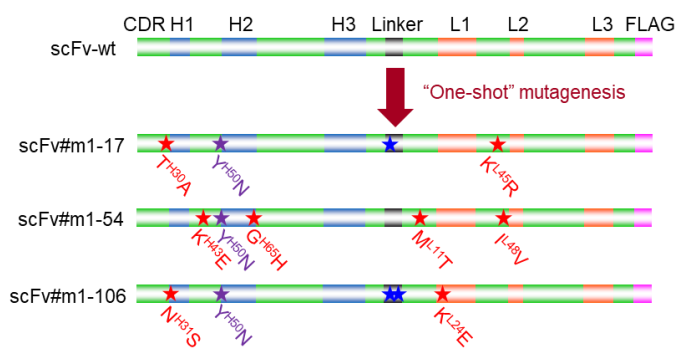


図9. CT-scFv-wt と変異 CT-scFv の一次構造

★は野生型 *scFv* (CT-scFv) からのアミノ酸置換を示す。

scFv の一次構造を図9に示す。これらを可溶性 *scFv* として調製し、その競合 ELISA における感度を比較した。競合反応は、CT-BSA を固定化したプレート中、37°C (60分)、もしくは4°C (240分) で行った。3種の *scFv* のうち、CT-scFv#m1-54 が最も高感度な用量作用曲線を与え、4°Cにおける midpoint は 0.32 ng/assay と、CT-scFv-wt よりも100倍高感度であった(図10)。特異性については、野生型の CT-scFv-wt は、由来するマウス抗体 Ab-CT#45 と類似の認識パターンを示したが、変異体 CT-scFv#m1-54 は、CT の 3'-OH 体について、CT-scFv-wt に比べて4.5倍大きい交差反応性(35%)を示した。しかし、この性質は尿中のタバコ煙曝露量評価においてむしろ適するものと考えられる。

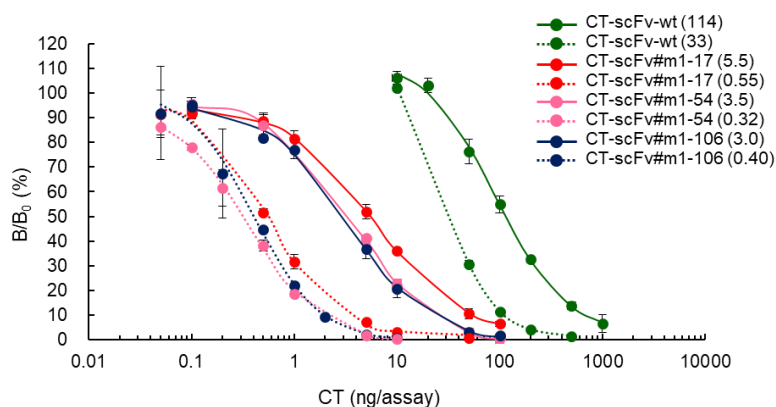


図10. 抗CT抗体 *scFv* を用いた ELISA における CT の用量作用曲線

実線は37°C (60分) での ELISA、破線は4°C (240分) の ELISA により求めた用量作用曲線である。カッコ内は midpoint (ng/assay) を示す。エラーバーは、4重測定における SD を示す。

次いで、ヒト尿中 CT 測定条件の最適化を行い、0.010~2.0 ng/assay の間で測定可能な用量作用曲線を得た(図11)。この ELISA において、midpoint は 0.27 ng/assay となり、Ab-CT#45 を用いた ELISA (5.3 ng/assay) より大幅に感度が向上した。その検出下限は 8.4 pg/assay であり、受動喫煙の検出下限とされる尿中 CT レベル(5~10 ng/mL) を十分に測定することが可能であった。

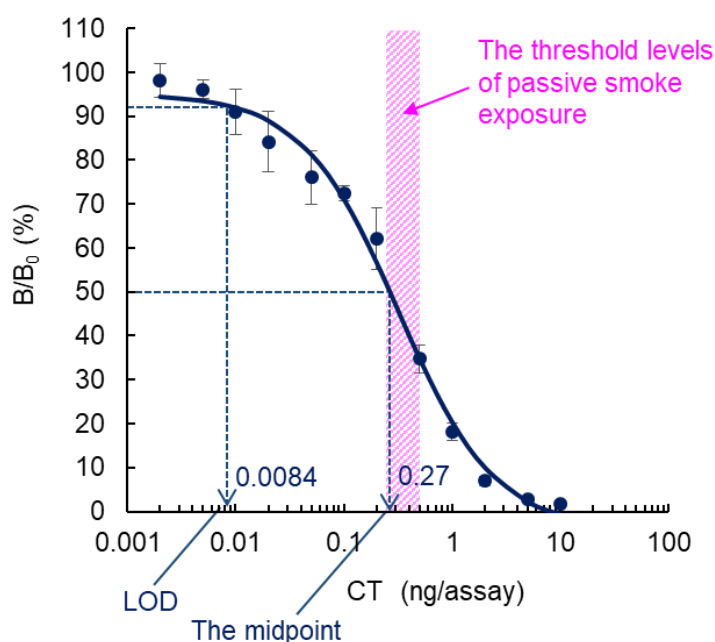


図11. CT-scFv#m1-54 を用いた最適化条件下での ELISA における CT の用量作用曲線

エラーバーは、4重測定における SD を示す。

第4節 考察

本章では、第1章で確立したハイブリドーマ株から産生された THC および CT に対するマウス抗体を遺伝子レベルで改変し、さらに高感度な分析を可能とする高親和力抗体の創製を試みた。これまでに報告された試験管内親和性成熟のうち、100倍以上もの K_a 値の向上を達成しつつ実用的な親和力を持つ変異抗体フラグメントを創出した成果が2例報告されているが、^{23,28)} いずれも3回もしくはそれ以上の変異導入・選択の過程を要し、得られた変異 scFv では10カ所以上のアミノ酸が置換されていた。本研究の抗 THC 抗体、抗 CT 抗体の例では、わずか1段階の変異導入と選択であり、THC については1アミノ酸の置換のみで K_a 値が10倍向上し、CT については5アミノ酸の置換で40倍以上もの K_a 値の向上が達成された。この知見は遺伝子操作による抗体機能改変の潜在力を示唆するものと考えられ、興味深い。

結語

本研究では、規制薬物および環境バイオマーカーとなる低分子化合物について、免疫化学的モニタリングシステムを構築するために必須の「分析試薬」である高性能抗体の作製を企てた。第1章では、規制薬物である THC と KT、および受動喫煙マーカーである CT を標的ハプテンとして、ハイブリドーマ法によりモノクローナル抗体の作製を試みた。いずれのハプテンについても複数の抗体産生ハイブリドーマクローンが得られ、最も実用的な抗体を選別することができたが、抗 THC 抗体と抗 CT 抗体については、親和力について改善すべき課題が残された。そこで第2章では、抗 THC および抗 CT 抗体について、遺伝子操作による親和力の改善を試みた。その結果、THC については、ELISA において野生型より midpoint 比較で約3倍高感度な用量作用曲線を与える変異 scFv を得ることができた。さらに、CT においては約100倍と大幅な高感度化を可能とする変異 scFv の獲得に成功し、受動喫煙レベルの尿中 CT の測定が可能となった。モニタリングが求められるマーカー物質には、THC や CT のように分子量が小さく、従来法では高親和力抗体を得ることが難しいものも少なくない。今後、本研究で示した手法により様々な低分子化合物に対して実用的な高親和力変異抗体が産生され、それらが医療や産業の発展に役立つことを期待する。

引用文献

- 1) 「免疫測定法 基礎から先端まで」、生物化学的測定研究会編、講談社(2014)。
- 2) Köhler G., Milstein C., *Nature*, **256**, 495-497(1975)。
- 3) Hoogenboom H. R., *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1105-1116 (2005)。
- 4) 小林典裕, 臨床化学, **38**, 457-458(2009)。
- 5) Kobayashi N., Oyama H., *Analyst*, **136**, 642-651(2011)。
- 6) Mehmedic Z., Chandra S., Slade D., Denham H., Foster S., Patel A. S., Ross S. A., Khan I. A., Elsohly M. A., *J. Forensic Sci.*, **55**, 1209-1217(2010)。
- 7) Wohlfarth A., Mahler H., Auwärter V., *J. Chromatogr. B*, **879**, 3059-3064(2011)。
- 8) Sharma P., Murthy P., Bharath M. M. S., *Iran J. Psychiatry*, **7**, 149-156(2012)。
- 9) Köhler G., Howe S. C., Milstein C., *Eur. J. Immunol.*, **6**, 292-295(1976)。
- 10) Kobayashi N., Sun P., Fujimaki Y., Niwa T., Nishio T., Goto J., Hosoda H., *Anal. Sci.*, **18**, 1309-1314(2002)。
- 11) Liu Y., Lin D., Wu B., Zhou W., *Brain Res. Bull.*, **126**, 68-73(2016)。
- 12) Han E., Kwon N. J., Feng L.-Y., Li J.-H., Chung H., *Forensic Sci. Int.*, **268**, 25-34(2016)。
- 13) Mion G., Villeveille T., *CNS Neurosci. Ther.*, **19**, 370-380(2013)。
- 14) White P. F., Ham J., Way W. L., Trevor A. J., *Anesthesiology*, **52**, 231-239(1980)。
- 15) WHO. Critical review of Ketamine. *Expert Comm. Drug Depend.*, 1-30(2002)。
- 16) Hukkanen J., Jacob III P., Benowitz N. L., *Pharmacol. Rev.*, **57**, 79-115(2005)。
- 17) Yildiz D., *Toxicol.*, **43**, 619-632(2004)。
- 18) Nakajima M., Yamamoto T., Nunoya K., Yokoi T., Nagashima K., Inoue K., Funae Y., Shimada N., Kamataki T., Kuroiwa Y., *Drug Metab. Dispos.*, **24**, 1212-1217(1996)。
- 19) Watts R. R., Langone J. J., Knight G. J., Lewtas J., *Environ. Health Perspect.*, **84**, 173-182(1990)。
- 20) Haufroid V., Lison D., *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **71**, 162-168(1998)。
- 21) Bjercke R. J., Hammond D. K., Strobel H. W., Langone J. J., *Drug Metab. Dispos.*, **18**, 759-764(1990)。
- 22) Kobayashi N., Oyama H., Kato Y., Goto J., Söderlind E., Borrebaeck C. A. K., *Anal. Chem.*, **82**, 1027-1038(2010)。
- 23) Oyama H., Yamaguchi S., Nakata S., Niwa T., Kobayashi N., *Anal. Chem.*, **85**, 4930-4937(2013)。
- 24) Jones S. T., Bendig M. M., *Biotechnology*, **9**, 88-89(1991)。
- 25) Frohman M. A., Dush M. K., Martin G. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 8998-9002(1988)。
- 26) Jirholt P., Ohlin M., Borrebaeck C. A. K., Söderlind E., *Gene*, **215**, 471-476(1998)。
- 27) Kabat E. A., Wu T. T., Perry H. M., Gottesman K. S., Foeller C., "Sequences of proteins of immunological interest", Washington, DC: U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health(1991)。
- 28) Boder E. T., Midelfort K. S., Wittrup K. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 10701-10705(2000)。

論文審査の結果の要旨

抗原抗体反応に基づく分析法は、高感度で特異性が高く、簡便性、迅速性にも優れるため、多数検体のマスキングや、現場で結果判定を行うオンサイト分析に適している。本学位論文の申請者は、規制薬物および診断・環境バイオマーカーとなる低分子化合物について、実用的な免疫化学的モニタリングシステムを構築するために必須である高性能抗体の作製を企てた。本研究の分析対象は、それ自体で免疫原性を持たない「ハプテン」である。高分子キャリアーと連結したのちに動物に免疫投与すると抗体が得られるが、ハプテン-キャリアー結合体の化学構造が得られる抗体の特異性に大きく影響する。このため、ハプテンに対する抗体産生は高分子抗原と比べて一般により困難である。

申請者は、まず、大麻成分である Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール (THC)、麻薬性麻酔薬のケタミン (KT)、および受動喫煙マーカーであるニコチン代謝物のコチニン (CT) を標的ハプテンとして、ハイブリドーマ法によりモノクローナル抗体の作製を試みた。いずれのハプテンについても複数の抗体産生ハイブリドーマクローンが得られ、最も実用的な抗体を選別することができた。これら抗体を用いてそれぞれの競合 ELISA 系を構築したところ、THC、KT については実用上十分な感度と特異性が認められた。しかし、抗 THC および抗 CT 抗体については、親和力について改善すべき課題が残された。そこで、これら抗体について、遺伝子操作による親和力の改善 (試験管内親和性成熟) を試みた。各抗体を野生型の一本鎖 Fv フラグメント (scFv) に変換したのち、その可変部にランダム点変異を加えて変異 scFv ライブラリーを構築し、親和力の向上した変異体を探索した。その結果、THC については、ELISA において野生型より約 3 倍高感度な用量作用曲線を与える変異 scFv を得ることができた。さらに、CT においては、約 100 倍の大幅な高感度化を可能にする変異 scFv の獲得に成功し、受動喫煙レベルの尿中 CT 測定が可能となった。これらの成果は、試験管内親和性成熟が、免疫化学的測定法の感度を高めるうえで普遍的かつ抜本的な方略であることを示すものと言える。

モニタリングが求められる規制薬物および診断・環境マーカーには、THC や CT のように分子量が小さく、従来法では高親和力抗体を得ることが難しいものも少なくない。今後、本論文で示された手法により、様々な低分子化合物に対して実用的な高親和力抗体が産生され、それらは医療や産業の発展に貢献するもの、と期待される。

上記の論文は博士 (薬学) 論文として、適当と判定する。