

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

2018

森田 いずみ



## 目次

略語表	vi
緒論	1
本論	7
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	7
第1節 序	7
第2節 $\Delta^9$ -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	9
2-1 項 研究の背景	
2-2 項 モノクローナル抗体の調製	
2-3 項 モノクローナル抗体の諸性質	
2-4 項 小括	
第3節 ケタミンに対する抗体の調製と諸性質	18
3-1 項 研究の背景	
3-2 項 ハプテン-キャリアー結合体の調製	
3-3 項 モノクローナル抗体の調製	
3-4 項 モノクローナル抗体の諸性質	
3-5 項 小括	
第4節 コチニンに対する抗体の調製と諸性質	29
4-1 項 研究の背景	
4-2 項 免疫原および固定化抗原の調製	
4-3 項 モノクローナル抗体の調製	
4-4 項 モノクローナル抗体の諸性質	
4-5 項 尿中コチニン測定への応用	
4-6 項 小括	
第5節 考察	41
第2章 遺伝子操作による抗体機能の改変	43
第1節 序	43
第2節 抗 $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノール抗体の機能改変	45

2-1 項	研究の背景	
2-2 項	抗体可変部遺伝子のクローニングと一次構造解析	
2-3 項	野生型 <i>scFv</i> 遺伝子の作製	
2-4 項	<i>scFv</i> の試験管内親和性成熟	
2-5 項	野生型および変異 <i>scFv</i> の諸性質	
2-6 項	小括	
第 3 節	抗コチニン抗体の機能改変	56
3-1 項	研究の背景	
3-2 項	抗体可変部の遺伝子クローニングと一次構造解析	
3-3 項	野生型 <i>scFv</i> 遺伝子の作製	
3-4 項	<i>scFv</i> の試験管内親和性成熟	
3-5 項	野生型および変異 <i>scFv</i> の諸性質	
3-6 項	改良型変異 <i>scFv</i> のヒト尿試料測定への応用	
3-7 項	小括	
第 4 節	考察	71
結論		73
謝辞		75
実験の部		76
研究全般に関する項目		76
1.	装置	
2.	器材	
3.	ソフトウェア	
4.	緩衝液	
5.	抗原とその類縁化合物	
6.	抗体類および抗体関連試薬	
7.	抗体以外の免疫化学関連試薬	
8.	酵素類	
9.	基質溶液	
10.	その他の試薬・器材	
11.	細胞、大腸菌およびファージ用培地	
12.	細胞とファージ	
13.	ベクターDNA	
14.	プライマー	

- 15. キット類
- 16. 電気泳動用ゲルと泳動条件
- 17. 実験動物
- 18. 依頼分析

第 1 章付属実験—————85

第 2 節付属実験—————85

- 2-1 項 抗 THC 抗体産生ハイブリドーマ株の樹立
- 2-2 項 モノクローナル抗 THC 抗体の調製
- 2-3 項 THC-BSA 免疫マウス血清および培養上清中抗 THC 抗体の ELISA による検出
- 2-4 項 モノクローナル抗 THC 抗体のアイソタイプの決定
- 2-5 項 モノクローナル抗 THC 抗体 Fab フラグメントの調製
- 2-6 項 BLI 法による抗原抗体反応の速度定数と結合定数の測定
- 2-7 項 モノクローナル抗 THC 抗体の ELISA における諸性質の検討

第 3 節付属実験—————88

- 3-1 項 ハプテン誘導体の合成
- 3-2 項 KT-BSA (b) の調製
- 3-3 項 GAL 標識 KT の調製
- 3-4 項 抗 KT 抗体産生ハイブリドーマ株の樹立
- 3-5 項 モノクローナル抗 KT 抗体の調製
- 3-6 項 モノクローナル抗 KT 抗体のアイソタイプの決定
- 3-7 項 KT-BSA(a) 免疫マウス血清および培養上清中抗 KT 抗体の ELISA による検出
- 3-8 項 KT-BSA(b) 免疫マウス血清および培養上清中抗 KT 抗体の ELISA による検出
- 3-9 項 モノクローナル抗 KT 抗体 Fab フラグメントの調製
- 3-10 項 BLI 法による抗原抗体反応の速度定数と結合定数の測定

第 4 節付属実験—————92

- 4-1 項 ハプテン誘導体の合成
- 4-2 項 CT-アルブミン結合体の調製
- 4-3 項 抗 CT 抗体産生ハイブリドーマ株の樹立
- 4-4 項 モノクローナル抗 CT 抗体の調製
- 4-5 項 モノクローナル抗 CT 抗体のアイソタイプの決定
- 4-6 項 CT-BSA 免疫マウス血清および培養上清中抗 CT 抗体の

## ELISA による検出

- 4-7 項 ビオチン標識 CT の調製
- 4-8 項 モノクローナル抗 CT 抗体の ELISA における諸性質の検討
- 4-9 項 蛍光消光法による抗原抗体反応の結合定数の算出
- 4-10 項 測定値補正用ブランク尿の調製
- 4-11 項 抗 CT 抗体を用いる ELISA によるヒト尿試料の測定

## 第 2 章付属実験———97

### 第 2 節付属実験———97

- 2-1 項 抗 THC 抗体可変部遺伝子のクローニング
- 2-2 項 Ab-THC#33 抗体の  $V_H$  または  $V_L$  遺伝子を含む DNA 断片のサブクローニング
- 2-3 項 Ab-THC#33 抗体の  $V_H$  および  $V_L$  遺伝子の DNA 塩基配列の決定
- 2-4 項 *THC-scFv-wt* 遺伝子構築のための  $V_H$ -DNA および  $V_L$ -DNA 断片の調製
- 2-5 項 Overlap extension PCR による *THC-scFv-wt* 遺伝子の構築とサブクローニング
- 2-6 項 *THC-scFv-wt* 遺伝子の DNA 塩基配列の決定
- 2-7 項 可溶型 *THC-scFv-wt* の調製と精製
- 2-8 項 Error-prone PCR による変異  $V_H$ -DNA および  $V_L$ -DNA 断片の調製
- 2-9 項 Overlap extension PCR による変異 *THC-scFv* 遺伝子ライブラリーの構築とサブクローニング
- 2-10 項 変異 *THC-scFv* 提示ファージライブラリーの調製とファージ力価の算定
- 2-11 項 抗 THC 活性を持つ変異 scFv 提示ファージのパンニングによる選択
- 2-12 項 変異 *THC-scFv* 提示ファージクローンの調製
- 2-13 項 ELISA による *THC-scFv* 提示ファージの抗 THC 活性の評価
- 2-14 項 *THC-scFv#m1-36* 遺伝子の DNA 塩基配列の決定
- 2-15 項 *THC-scFv-wt* および *THC-scFv#m1-36* の分子モデリング
- 2-16 項 可溶型変異 *THC-scFv#m1-36* の調製
- 2-17 項 可溶型変異 *THC-scFv#m1-36* の精製
- 2-18 項 可溶型 *THC-scFv* の THC 結合能の評価
- 2-19 項 可溶型 *THC-scFv* の SDS-PAGE とウェスタンブロッティング
- 2-20 項 BLI 法による抗原抗体反応の速度定数と結合定数の測定

- 3-1 項 抗 CT 抗体可変部遺伝子のクローニング
- 3-2 項 Ab-CT#45 抗体の  $V_H$  または  $V_L$  遺伝子を含む DNA 断片のサブクローニング
- 3-3 項 Ab-CT#45 抗体の  $V_H$  および  $V_L$  遺伝子の DNA 塩基配列の決定
- 3-4 項 CT-scFv-wt 遺伝子構築のための  $V_H$ -DNA および  $V_L$ -DNA 断片の調製
- 3-5 項 Overlap extension PCR による CT-scFv-wt 遺伝子の構築とサブクローニング
- 3-6 項 CT-scFv-wt 遺伝子の DNA 塩基配列の決定
- 3-7 項 可溶型 CT-scFv-wt の調製と精製
- 3-8 項 Error-prone PCR による変異  $V_H$ -DNA および  $V_L$ -DNA 断片の調製
- 3-9 項 Overlap extension PCR による変異 CT-scFv 遺伝子ライブラリーの構築とサブクローニング
- 3-10 項 変異 CT-scFv 提示ファージライブラリーの調製とファージ力価の算定
- 3-11 項 抗 CT 活性を持つ変異 scFv 提示ファージのパンニングによる選択
- 3-12 項 変異 CT-scFv 提示ファージクローンの調製
- 3-13 項 ELISA による CT-scFv 提示ファージの抗 CT 活性の評価
- 3-14 項 可溶型変異 CT-scFv#m1-17、54、106 の調製
- 3-15 項 可溶型変異 CT-scFv#m1-17、54、106 の精製
- 3-16 項 CT-scFv#m1-17、54、106 遺伝子の DNA 塩基配列の決定
- 3-17 項 可溶型 CT-scFv の SDS-PAGE とウェスタンブロッティング
- 3-18 項 CT-scFv#m1-54 の分子モデリング
- 3-19 項 可溶型 CT-scFv の CT 結合能の評価
- 3-20 項 最適化した ELISA によるヒト尿中 CT の測定

## 略語表

AAP : abridged anchor primer  
AUAP : abridged universal amplification primer  
BLI : biolayer interferometry  
BSA : bovine serum albumin  
CBD : cannabidiol  
CBN : cannabinol  
cDNA : complementary DNA  
CDR : complementarity-determining region  
cfu : colony-forming unit  
CT : (S)-(-)-cotinine  
CV : coefficients of variation  
dATP : deoxyadenosine 5'-triphosphate  
dCTP : deoxycytidine 5'-triphosphate  
dGTP : deoxyguanosine 5'-triphosphate  
DMSO : dimethyl sulfoxide  
dNTP : deoxyribonucleoside 5'-triphosphate  
DNA : deoxyribonucleic acid  
DNKT : dehydronorketamine  
DTT : dithiothreitol  
dTTP : deoxythymidine 5'-triphosphate  
EDC : 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide  
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid  
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay  
ESI: electrospray ionization  
Fab : antigen-binding fragment  
FCA : Freund's complete adjuvant  
FIA : Freund's incomplete adjuvant  
FR : framework region  
GAL :  $\beta$ -galactosidase  
GC-MS : gas chromatography-mass spectrometry  
HAT : hypoxanthine-aminopterin-thymidine  
HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid  
HMBC : heteronuclear multiple bond coherence

HPLC : high-performance liquid chromatography  
 HT : hypoxanthine-thymidine  
 IgG : immunoglobulin G  
 IgM : immunoglobulin M  
 IPTG : isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside  
 $K_a$  : affinity constant  
 $k_a$  : association rate constant  
 $K_d$  : dissociation constant  
 $k_d$  : dissociation rate constant  
 KT : ketamine  
 LC-MS : liquid chromatography-mass spectrometry  
 LOD : limit of detection  
 mRNA : messenger RNA  
 ND : not detectable  
 NKT : norketamine  
 NMR : nuclear magnetic resonance  
 NOESY : nuclear overhauser effect correlated spectroscopy  
 11-OH-THC : 11-hydroxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol  
 OVA : ovalbumin  
 PCR : polymerase chain reaction  
 POD : peroxidase  
 PVDF : polyvinylidene difluoride  
 RACE : rapid amplification of cDNA end  
 RNA : ribonucleic acid  
 RT : reverse transcriptase (or reverse transcription)  
 SAMHSA : Substance Abuse and Mental Health Services Administration  
 scFv : single-chain Fv fragment  
 SD : standard deviation  
 SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis  
 SPR : surface plasmon resonance  
 TdT : terminal deoxynucleotidyl transferase  
 THC :  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol  
 THCA :  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolic acid  
 THC-COOGlu : 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol glucuronide  
 THC-COOH : 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol  
 Tris : tris(hydroxymethyl)aminomethane



## 結 論

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る問題は、憂慮すべき状況にある。薬物事犯の検挙人数が最近 10 年以上にわたって 1 万人を超えているばかりか（図 1）、覚せい剤や大麻の密輸入が相次いで検挙されている。薬物の乱用は、乱用者自身の精神や身体をむしばむにとどまらない。幻覚、妄想などにより、乱用者が殺人、放火などの凶悪な事件や重大な交通事故などを引き起こすこともあり、社会の安全を脅かす重大な問題である。<sup>1,2)</sup> 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規制薬物使用の証明などのために、現在は主としてガスクロマトグラフ質量分析計（gas chromatography-mass spectrometry；GC-MS）や液体クロマトグラフ質量分析計（liquid chromatography-mass spectrometry；LC-MS）等の分離分析機器が用いられている。しかし、これらの方法は大型の装置が必要であるため、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。

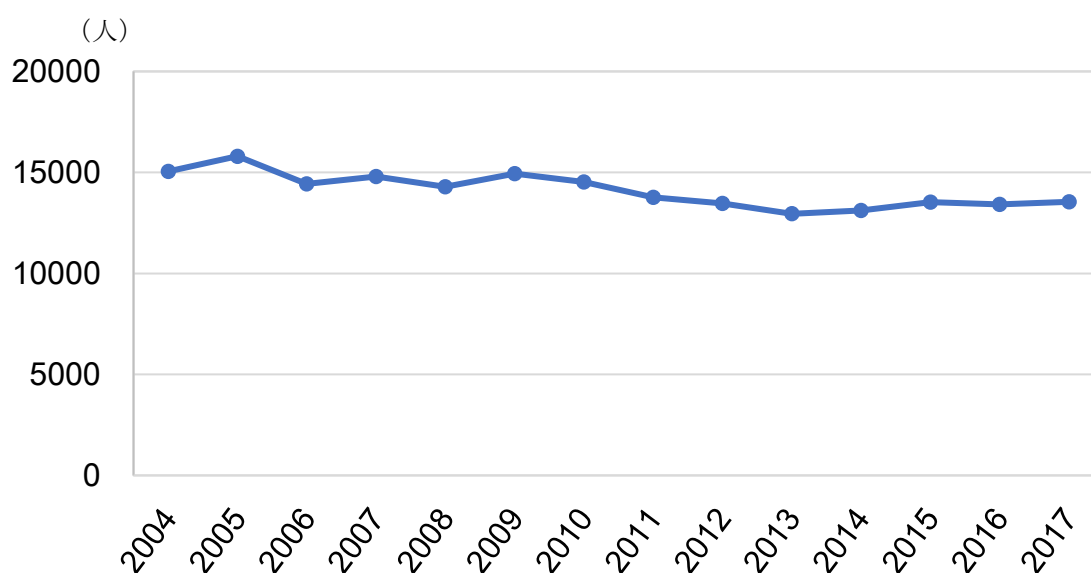


図 1. 薬物事犯検挙状況の推移（2004～2017）<sup>1,2)</sup>

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。最も身近なものは、受動喫煙であろう。タバコ煙を非喫煙者が間接的に吸入することによる健康への影響について社会的関心が高まっている。受動喫煙の程度を評価するうえで、タバコ煙に含まれる有害成分であるニコチンの主代謝物、(S)-(-)-コチニン (cotinine ; CT) の尿中濃度をモニターすることが推奨されている。<sup>3~6)</sup> すなわち、CT は環境バイオマーカーであり、できるだけ大きな母集団についてオンサイトのモニタリングを行うことが望まれる。

規制薬物やバイオマーカーのオンサイト分析には、免疫測定法（イムノアッセイ）が適している。本法は体液性免疫反応、すなわち抗原と抗体の結合反応を利用して抗原あるいは抗体を検出・定量する方法の総称である。抗体は、“鍵（抗原）と鍵穴（抗体）” の関係に例えられる精密な分子認識力を有し、強い親和力で特定の標的分子、すなわち抗原と結合する。このため、免疫測定法は一般に超高感度で、ごく微量 (nmol~ $\mu$ mol) の標的物質を定量することができる。しかも、測定対象の化学構造に対する特異性が高いため、試料の前処理が不必要か、必要であっても GC-MS や LC-MS 法に比べて大幅に簡略化することができる。したがって、簡便性、迅速性にも優れ、体液や排泄物などの複雑なマトリックス中に混在する極微量物質の検出にとりわけ威力を発揮する。規制薬物の使用歴の証明には、尿中に排泄された薬物あるいはその代謝物の特定が有効であるが、この目的にも適した特長と言える。また、タンパク質、核酸などの高分子から合成医薬品やステロイドホルモンなどの低分子化合物まで様々な物質が測定対象になりうる。こうした特長ゆえ、その応用は、生体試料（血液や尿など）中のホルモン・薬物の分析、環境試料（土壌、上下水など）中の農薬、食品中の有害物質の分析など広い範囲にわたる。特に、その開発当初から臨床検査における貢献は絶大で、チロキシシンやエストロゲンなどのホルモン、腫瘍マーカー、治療薬物モニタリングの対象となる薬物、ウイルスなど、様々な診断バイオマーカーに対する特異抗体が、体外診断薬として不可欠の役割を果たしてきた。<sup>7)</sup>

免疫測定法は、抗原抗体反応の様式の違いにより競合法と非競合法に大別されるが、規制薬物は低分子有機化合物であるため、現状では競合法のみ適用が

可能と考えて差支えない。高い測定感度を得るために、抗原または抗体を何らかのシグナル物質で標識することになるが、現在、最も多用されるのは酵素である。抗原（または抗体）を 96 ウェルマイクロプレートに固定化し、酵素で標識した抗体（または抗原）を用いてウェル内で抗原抗体反応を行う方法は、**ELISA**（enzyme-linked immunosorbent assay の略）と呼ばれ、いまや免疫測定法の代名詞と言えるほどに普及している。専用のマイクロウェル洗浄装置や吸光度測定装置を利用して、効率よく多数の検体を測定することが可能であり、オンサイト分析にも展開が可能である。1980 年代から登場したイムノクロマトグラフィー<sup>8)</sup>は、オンサイト分析にさらに適した方法であり、規制薬物等のスクリーニングを目的とする測定キットも販売されている。イムノクロマトグラフィーは、ろ紙や薄膜のような平面状の担体の一端に試料溶液を点着し、水分による毛細管現象を利用して測定抗原を移動させつつ抗原抗体反応を行い、生成する複合体を担体上の着色したバンド（主に、金コロイドで標識した抗体あるいは抗原を利用する）として目視判定するものである。

ELISA、イムノクロマトグラフィーを含めて、すべての免疫測定法の性能は、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。特に、尿中に排泄された薬物未変化体や代謝物をモニターするためにはより親和力の高い抗体が必要である。<sup>7,9)</sup> 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。目的の抗原で実験動物を免疫すると、これを特異的に認識する抗体を含む抗血清を得ることができる。ただし、含まれる抗体は、複数の抗体産生細胞に由来する抗体分子の混合物、すなわちポリクローナル抗体である。同様に免疫したのち、抗体産生に関わる細胞をミエローマ細胞と融合させたのちクローン化すると、単一の抗体産生細胞に由来し、均一な一次構造を持つモノクローナル抗体を調製することができる。現在、市販の分析・診断用抗体は、これらのいずれかの方法で作製されたものであり、動物がその体内に産生する“天然”の抗体である。

規制薬物は、そのほとんどが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。診断や環境バイオマーカーについても、ハプテンに相当するものが少なくない。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、とりわけ分子量が小さいハプテンや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形の免疫原（ハプテンーキャリアー結合体）を調製することが合成化学的に困難なため、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、抗体の遺伝子操作、すなわち「抗体工学」が有望と期待されている。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もので、1990年代から種々試みられるようになった。*in vitro* の実験系で短期間に改良型分子種を得ることから、「試験管内分子進化」とも呼ばれ、従来以上に親和力や特異性に優れた分析・診断用抗体を迅速かつ確実に創出しうる革新的な方法論と期待されてきた。分析・診断用に用いられる抗体の多くはイムノグロブリン G (immunoglobulin G ; IgG) であるが、2本のH鎖と2本のL鎖から成る分子量

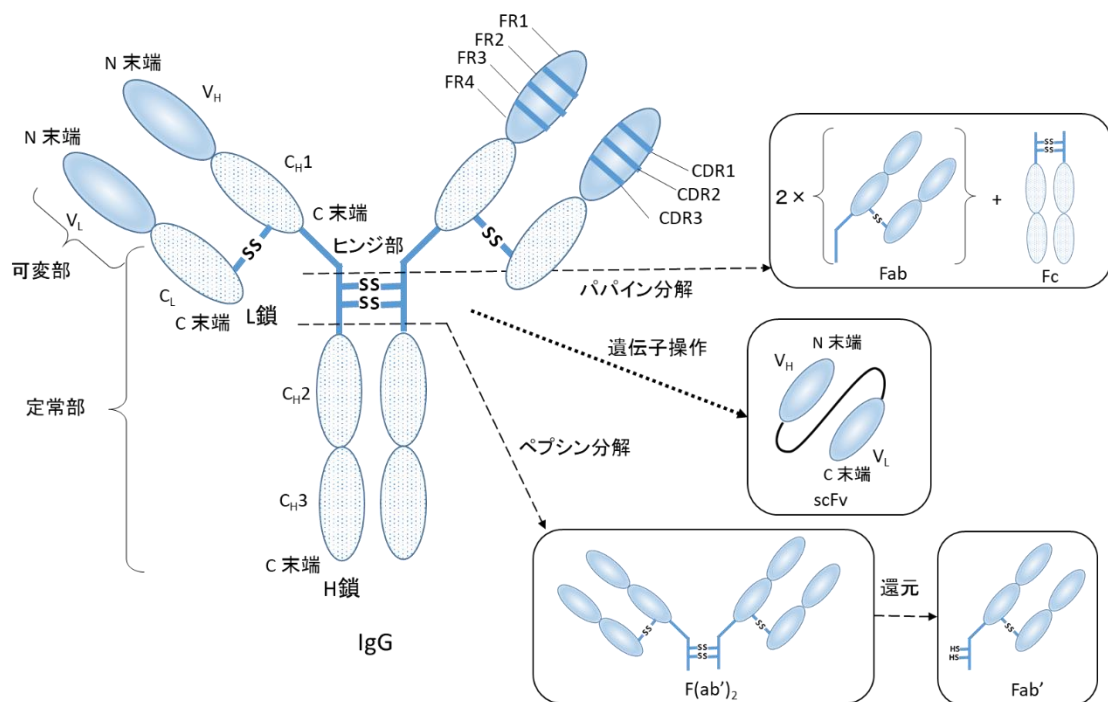


図 2. 抗体の基本構造

約 15 万の糖タンパク質で、その抗原結合部位（パレート）は H 鎖および L 鎖の 2 つの可変部ドメイン(それぞれ  $V_H$  ドメインと  $V_L$  ドメイン) の間に形成される (図 2)。これら可変部ドメインの遺伝子をクローニングし、それらを連結させて一本鎖 Fv フラグメント (single-chain Fv fragment ; scFv) (図 2) の遺伝子を構築したのちに、ランダムあるいは部位特異的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

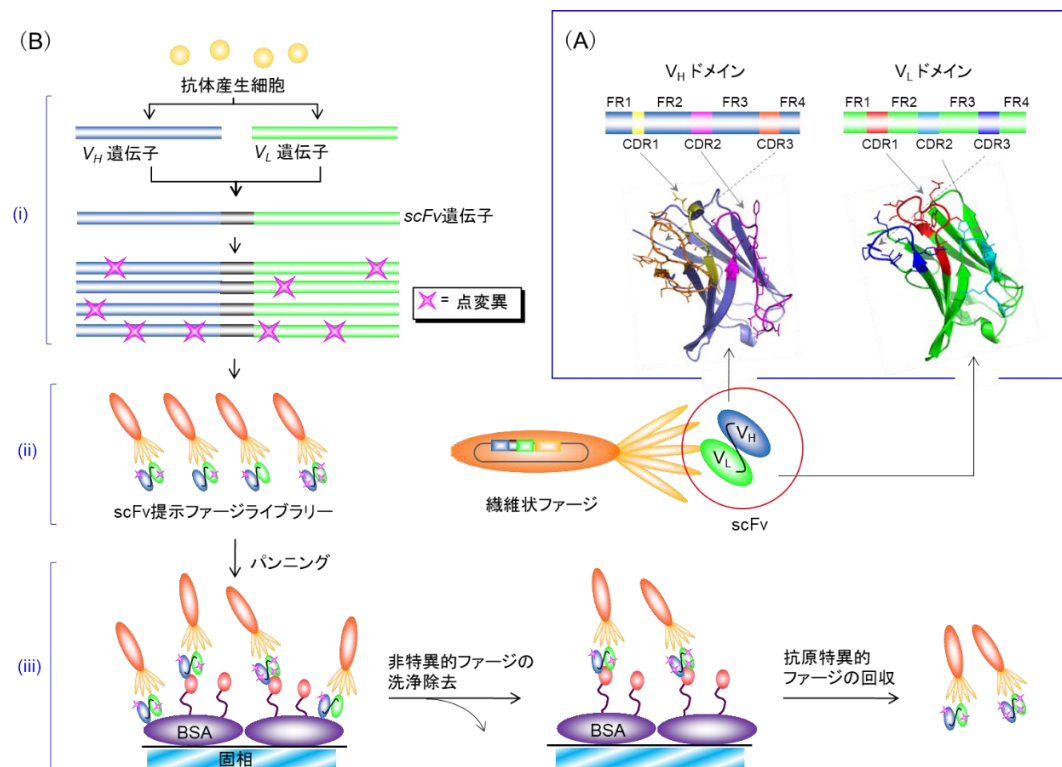


図 3. scFv 提示ファージライブラリーの構築と高親和力変異体の単離 (パンニング)

(A) H 鎖、L 鎖の可変部ドメイン ( $V_H$ 、 $V_L$  ドメイン) は、3 カ所ずつ存在する相補性決定部 (complementarity-determining region ; CDR) と枠組み領域 (framework region ; FR) から構成される。CDR はループを形成して抗原との結合に寄与するとされ、抗体ごとに長さやアミノ酸配列が異なる。

(B) (i) 抗体産生細胞からクローニングした  $V_H$ 、 $V_L$  遺伝子を連結して scFv 遺伝子へ変換したのち、ランダム変異を導入して遺伝子ライブラリーを構築する。(ii) (i) の遺伝子群をファージ提示用プラスミドに組み込み、大腸菌へ導入後、ヘルパーファージを感染させてファージ提示ライブラリーを調製する。(iii) 固相に固定化した抗原にファージライブラリーを反応させ、未反応のファージを洗浄除去する。そののち、固相に残存する抗原特異的なファージを酸や塩基で溶出し、回収する。

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。そのプロセスは、生体内で起こる抗体産生機構、すなわちクローン選択と類似している。この単離を容易にするために、scFv をファージ粒子上に発現させるファージ提示系がしばしば活用される（図 3）。変異導入の鋳型となる野生型抗体として、化学合成オリゴ DNA から構築した人工の抗体も利用できる。実験動物に免疫投与する工程を完全に省くことも、原理的には可能である。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、<sup>10,11)</sup> 抗ハプ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。<sup>11,12)</sup>

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。第 1 章では、大麻の主成分である  $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノール ( $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol; THC)、麻薬指定の麻酔薬であるケタミン (ketamine; KT)、およびニコチン代謝物の CT について、ハイブリドーマ法により特異モノクローナル抗体の新規調製を行った。THC は規制薬物のひとつで、世界各国で広く乱用されている。入手も比較的容易であることから、若者が軽い気持ちで手を出し、いわゆるハード・ドラッグ（コカイン、ヘロイン、覚せい剤など）へのゲートウェイ・ドラッグ（入門薬物）として拡散することが懸念されている。<sup>13,14)</sup> KT は全身麻酔薬、難治性疼痛に対する鎮痛薬として用いられる一方で、幻覚・妄想・体外離脱感を目的とした乱用が社会問題となり、2007 年に麻薬に指定された。<sup>13,14)</sup> CT は、前述のとおり、受動喫煙の指標となる環境バイオマーカーである。

第 2 章では、第 1 章で得られた THC と CT に対する特異モノクローナル抗体について、抗体工学による機能改変を行った。各抗体を scFv に変換したのち、ランダム変異を導入して変異 scFv ライブラリーを作製し、ファージ提示による選択のプロセスを経て抗体の親和力を *in vitro* の実験系で増大させる「試験管内親和性成熟」を行った。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い、その実用性を評価した。

# 本 論

## 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免疫測定法は極めて有用な方法論である。ただし、その確立には測定対象物に対して高い親和力と特異性を示す抗体が不可欠である。今日、様々な抗原に対する抗体が市販されているが、規制薬物やバイオマーカーのなかには未だ実用的な抗体が入手困難なものも多く、これらについては抗体を自作する必要がある。

規制薬物やバイオマーカーは、低分子化合物であることが多く、それらはハプテンと総称される。すなわち、それ自身では免疫原性を示さず、そのまま動物に投与しても抗体は産生されない。しかし、適切な高分子キャリアーと連結して動物に投与することで、キャリアーに対する抗体とともに、ハプテン部分を抗原決定基として認識する抗体が産生される。ある標的ハプテンに対して実用的な抗体を得るためには、その構造を特徴づける官能基からできるだけ離れた位置をキャリアーとの結合部位として利用するなど、ハプテン-キャリアー結合体を的確に調製することが重要である。適切にデザインした免疫原を用いることで、官能基の位置や立体配置など、ハプテン構造を精密に認識する抗体が得られる。キャリアーには、免疫する実験動物に対して強い免疫原性を示す高分子化合物で、1 分子中にハプテンを共有結合させるための官能基を多く含むものが適している。<sup>15,16)</sup> 水に溶けやすく扱いやすいウシ血清アルブミン (bovine serum albumin ; BSA) が最もよく用いられており、抗体の得難い抗原に対しては免疫原性がより強いスカシガイヘモシアニンが有効とされている。<sup>7)</sup> BSA は、1 分子中に 59 のリシン残基、59 のグルタミン酸残基と 40 のアスパラ

ギン酸残基を含み、<sup>17)</sup> これらのアミノ基またはカルボキシ基を利用してハプテンを共有結合させることができる。

現在、分析用あるいは診断用の抗体として利用されている抗体は、目的の抗原を実験動物に免疫投与することにより、動物から得られる「天然型の」抗体である。免疫後に採血して血清を調製すると、複数の B 細胞クローンに由来する複数の抗体分子種を含む抗血清が得られる。これらはポリクローナル抗体と呼ばれるが、最も容易に調製できる特異抗体であり、精製することなく各種免疫測定法に利用できる。ただし、近交系の動物に同じ抗原を同じプロトコールで免疫投与したとしても、同一品質の抗血清を再び得ることは不可能であり、一定品質の抗体として得られる量に限りがある。これは、抗原に刺激される B 細胞クローンの種類や各クローンの抗体産生量などが変動しやすく、動物の個体差も反映されるからである。この難点を根本的に解決する抗体の調製法、すなわち B 細胞ハイブリドーマ法が、1975 年に発表された。<sup>18)</sup> 本法では、動物を免疫して活性化された B 細胞をミエローマ細胞と融合させ、目的の抗原に対する特異抗体の産生能と増殖能を併せ持つハイブリドーマ細胞を作製する。これを単一クローンに分離して培養すると、モノクローナル抗体が得られる。一度樹立したハイブリドーマ細胞株は、継代培養が容易なうえ液体窒素中で凍結が可能のため、大量、継続的、半永久的に一定品質の抗体を得ることができる。このため、ハイブリドーマに由来するモノクローナル抗体（ハイブリドーマ抗体）は分析試薬・診断試薬としての価値が高く、現在、市場に供される抗体の大半を占めるに至っている。

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 THC（第 2 節）、KT（第 3 節）、および CT（第 4 節）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 $\Delta^9$ -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

### 2-1 項 研究の背景

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と言える。<sup>19~21)</sup> 大麻には 500 以上の化合物が含まれ、そのうち主に中枢神経系に存在するカンナビノイド受容体に作用する化合物は 109 種類であり、これらはカンナビノイドと呼ばれている（図 4）。<sup>19)</sup> カンナビノイドのうち THC が主な向精神作用化合物である。しかしながら、新鮮な大麻草中に含まれるカンナビノイドの約 95% は、向精神作用をほとんど示さない  $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノール酸 ( $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolic acid ; THCA) である。加熱することにより速やかに脱炭酸されて THC に変換され、強い向精神作用を示す。<sup>20)</sup> 一方、THC は光と酸素にさらされることにより、カンナビノール (cannabinol ; CBN) へと分解される（図 4）。ヒトの体内においては、THC は図 5 のように代謝され、11-hydroxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC)、11-nor-9-

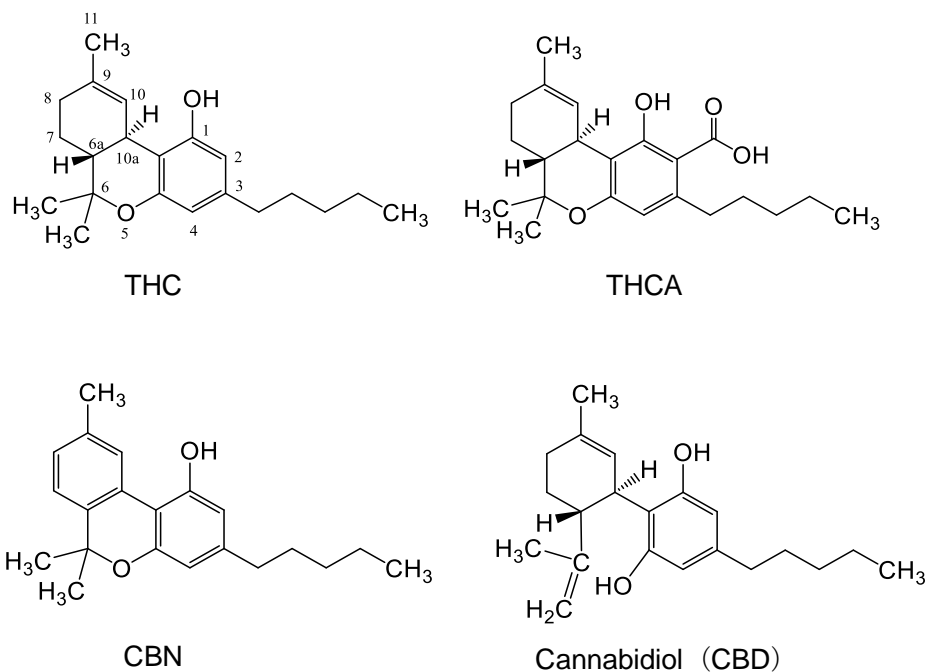


図 4. *Cannabis sativa* L. から抽出される主要なカンナビノイドの構造

carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC-COOH)、そして THC-COOH のグルクロン酸抱合体 (11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol glucuronide ; THC-COOglu) など、極性の高い化合物が生じる。<sup>21,22)</sup>

大麻製品の税関における密輸の取り締まりや、被疑者の大麻使用歴の証明を目的とする尿中代謝物の検出に、現在は主として GC-MS や LC-MS 等が用いられている。前者の目的では THC や CBN が、後者の目的では THC-COOH や THC-COOglu が主な分析対象化合物となる。しかし、これらの方法は大型の装置が必要であるため、現場で迅速に鑑定する目的には適さない。抗原抗体反応に基づく免疫測定法は、操作が簡便で、迅速に結果が得られるため、規制薬物のオンサイト分析に適している。例えば、lateral flow immunoassays、すなわちイムノクロマトグラフィー法などが、既に THC およびその代謝物のオンサイト分析法として利用されている。<sup>14)</sup> 一方、近年、より簡便でかつ高い感度を実現

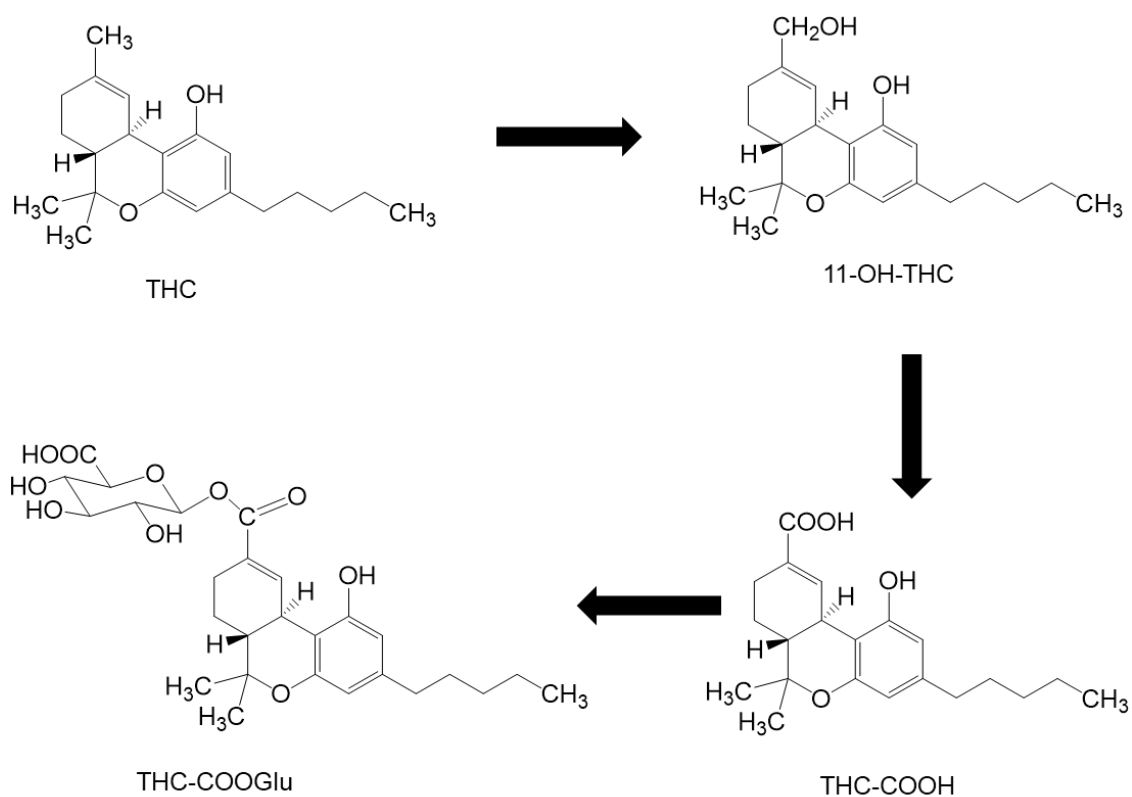


図 5. THC の代謝経路

しうる新たな測定原理が発表された。<sup>23,24)</sup>「Quenchbody (Q-body)」と命名された組換え抗体を用いる免疫測定法で、従来、原理的に不可能と思われてきたハプテンの非競合型測定が可能である。しかも、抗原抗体反応ののちに過剰の試薬を除く操作 (B/F 分離) を必要としないホモジニアス測定である。Q-body とは、測定対象抗原に対する抗体を scFv 化したのち、その V<sub>H</sub> ドメインの N 末端の特定の箇所蛍光色素を標識したものである。抗原が結合していない状態では蛍光は消光 (クエンチング) しているが、抗原が結合すると蛍光が回復する。このような先端の抗体試薬をデザイン、調製するうえで、抗体のみならずその遺伝子を手に入れることが必須であり、この観点からも抗体産生ハイブリドーマの自作が望まれる。なお、THC に対するモノクローナル抗体を産生したとする論文はこれまでに 2 報<sup>25,26)</sup> が確認されるが、THC に対する K<sub>a</sub> 値は記載がないか、<sup>25)</sup> あっても極めて低く (< K<sub>a</sub> 値 4.3 × 10<sup>6</sup> L/mol)、実用的とはいえない。<sup>26)</sup>

以上の観点から、著者はまず、THC に対する抗体産生ハイブリドーマの樹立とモノクローナル抗体の作製を試みた。

## 2-2 項 モノクローナル抗体の調製

THC は典型的なハプテンであり、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。先述のように、特異的な抗ハプテン抗体を得るうえで、ハプテン分子上、キャリアーとの結合部位の選択が重要である。THC 分子を特徴づけるフェノール性ヒドロキシ基や環状エーテル構造、代謝を受けるシクロヘキセン環ビニル位のメチル基から離れた位置、例えばフェノール構造のパラ位やペンチル基上の炭素を結合部位とすることが望ましい。しかし、これらの位置にキャリアー結合用のブリッジ (リンカー) 構造を導入した誘導体は入手が困難で、自力合成も難しい。そこで、やむをえず、市販の THC-BSA 結合体を免疫原として用いることとした。このもののキャリアー結合位置については情報が非公開であるが、後述の理由から、シクロヘキセン環上と推定される。

一方、ハイブリドーマ法によるモノクローナル抗体の調製においては、脾細胞供与動物の選択が重要である。細胞融合法に用いるミエローマ細胞は、その

ほとんどが BALB/c マウスに由来するため、免疫動物として BALB/c マウスが多用されている。このことを考慮して、THC-BSA をフロイントのアジュバントと混合し、BALB/c マウス（雌、8 週齢、5 匹）へ 2 週間ごとに 4 回繰り返し免疫し、血中の抗 THC 抗体価の上昇を比較した（図 6）。抗体価の評価は、THC-BSA を固定化したプレートを用い、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。最も良好な免疫応答を示した（結果は示さず）2 匹のマウスに最終免疫を行い、3 日後に脾細胞を調製して P3/NS1/1-Ag4-1（NS1）ミエローマ細胞と融合させた

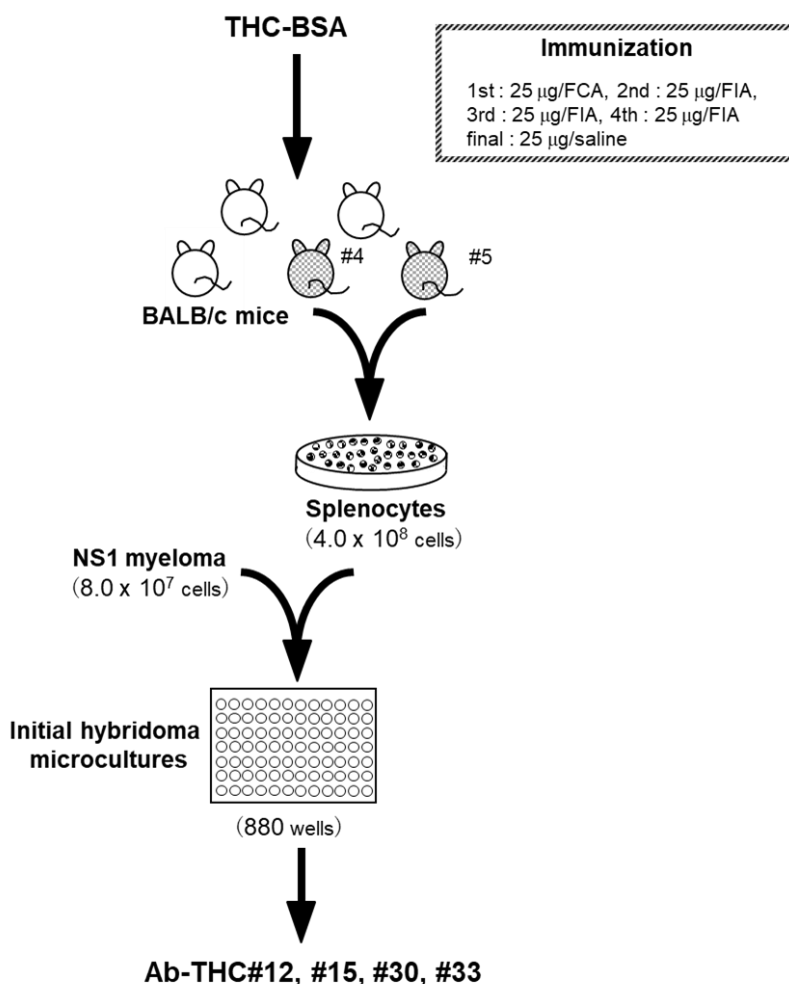


図 6. モノクローナル抗 THC 抗体作製のための免疫と細胞融合実験

(図 6)。<sup>27,28)</sup> この融合細胞を 96 ウェルクラスターディッシュ中 (全 880 ウェル) で hypoxanthine-aminopterin-thymidine (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。その結果、46 ウェルのハイブリドーマが強い抗体産生能を有することが示された。さらに 2 次スクリーニングを行い、より抗体産生能の強い 7 ウェルのハイブリドーマを選択し、限界希釈法によりクローニングを行った。<sup>29,30)</sup> その結果、4 種の抗体産生細胞株 (#12、#15、#30、#33) を樹立した (図 6)。これら細胞株が分泌する抗 THC 抗体 (Ab-THC#12、#15、#30、#33) の H 鎖サブクラスは、Ab-THC#12、#15、#33 は  $\gamma 1$ 、Ab-THC#30 は  $\gamma 2b$  で、L 鎖アイソタイプはすべて  $\kappa$  であった。

## 2-3 項 モノクローナル抗体の諸性質

前項で樹立した細胞株を大量に培養して、対応するモノクローナル抗 THC 抗体をその上清として調製し、競合型 ELISA における諸性質を比較した。すなわち、THC-BSA を固定化したプレートに、これら細胞の培養上清に含まれる抗

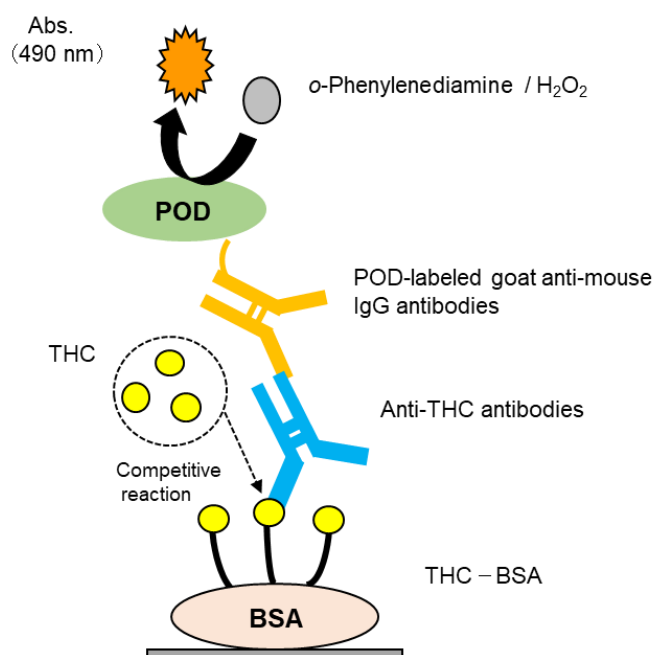


図 7. 抗 THC 抗体の評価に用いた ELISA 系

体と THC 標準品を競合的に反応させたのち、固相上に捕捉されたモノクローナル抗 THC 抗体を POD 標識抗マウス抗体で検出した (図 7)。

#### ① ELISA におけるアッセイ感度

上記の ELISA 系での各抗体の力価を、酵素反応時間 30 分での  $B_0$  (THC 標準品非添加の反応: 用量作用曲線の 0 濃度点に相当する) の吸光度がおよそ 1.0 となる培養上清の希釈率として定め、この条件で THC 標準品に対する用量作用曲線を作製した (図 8)。アッセイ感度の指標となる midpoint (50% 阻害率を示す THC 添加量) 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。すなわち、4 種モノクローナル抗体の中で Ab-THC#33 が最も midpoint の小さい (1.1 ng/assay)、すなわち最も高感度な用量作用曲線を与えた。この感度は、乾燥大麻など被疑物質中の THC の検出に十分と考えられる。

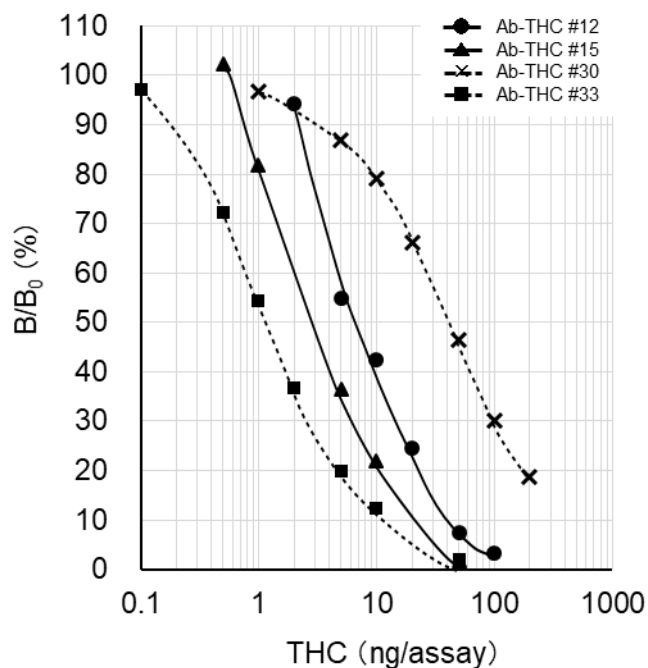


図 8. モノクローナル抗 THC 抗体を用いた ELISA における THC の用量作用曲線

用量作用曲線の各点は、2 重測定の平均値である。

## ② 抗原結合能パラメータ

上記で最も高感度な Ab-THC#33 をプロテイン G カラムで精製したのち、パイン処理に付して Fab フラグメント (Fab-THC#33) を調製し [アビディティー効果 (第 2 章第 2 節 2-5 項参照) を避けるため]、THC を間接的に固定化したバイオセンサーチップを用い、バイオレイヤー干渉 (biolayer interferometry ; BLI) 法により抗原抗体反応の結合パラメータを測定した。その結果、センサーチップ上の THC 基に対する Fab-THC#33 の結合速度定数 (association rate constant ;  $k_a$ )、解離速度定数 (dissociation rate constant ;  $k_d$ ) はそれぞれ、 $2.1 \times 10^4$  L/(mol $\cdot$ s)、 $3.4 \times 10^{-4}$  1/s であり、これらの速度定数から算出される結合定数 [affinity constant ;  $K_a$  ( $=k_a/k_d$ )] は  $6.2 \times 10^7$  L/mol であった。

## ③ ELISA における特異性

抗体 Ab-THC#12、#15、#30、#33 の主要な THC 類縁化合物との交差反応性を、THC との反応性を 100% とする 50% 置換法により検討した (図 9)。その結果、いずれの抗体も THCA (<1%)、CBN (3.7~10%) を十分識別することが示された。しかし、THC-COOH については、86~2,700% と大きな交差反応性を

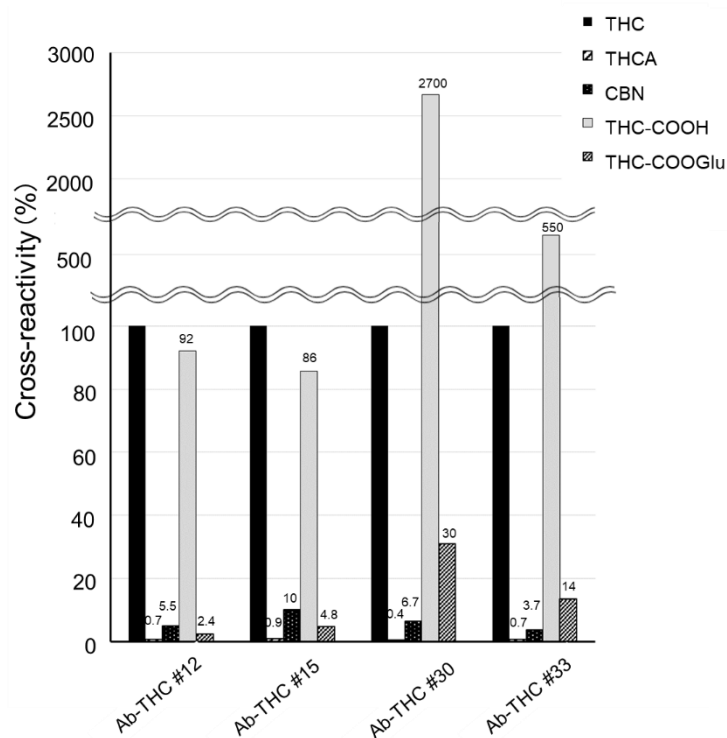


図 9. モノクローナル抗 THC 抗体の交差反応性

示した。また、THC-COOGlu についても、最大で 30% の交差反応性が認められた。本節で免疫原として用いた THC-BSA の構造については、公開されていないが、THC-COOH に対して大きく交差反応することは免疫原において BSA がおそらく THC の 11 位の置換基へ結合されていることを示唆する。しかし、ここで見られた THC と THC-COOH への群特異性は、この抗体が大麻の指標物質である THC の検出に有効であるのみならず（大麻中には THC-COOH は含まれないとされている<sup>13)</sup>）、THC を服用したヒトの尿中の THC とその代謝物として生じる THC-COOH を合わせて測定することを可能とするもので、むしろ有用な性質と思われる。本節で得られた Ab-THC#33 を用いる ELISA では、THC-COOH については、およそ 40~4,000 pg/assay の範囲で測定が可能な用量作用曲線が得られた（図 10）。その midpoint は約 0.2 ng/assay であり、THC に対する用量作用曲線に比べて 5 倍程度高感度であった。米国 Substance Abuse and Mental Health Services Administration（SAMHSA）で、大麻由来の尿中 THC-COOH の検出のカットオフ値として、50 ng/mL が推奨されているが、本抗体による ELISA は、この基準を容易に満たすものと思われる。

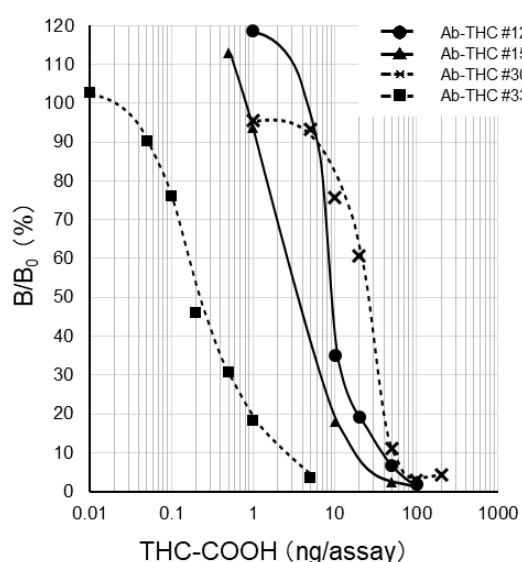


図 10. モノクローナル抗 THC 抗体を用いた ELISA における THC-COOH の用量作用曲線

用量作用曲線の各点は、2 重測定の平均値である。

## 2-4 項 小括

BALB/c マウスを市販の THC-BSA 結合体で免疫し、その脾細胞を NS1 ミエローマ細胞と融合させて、4 種の抗 THC 抗体産生ハイブリドーマを樹立した。これらの産物として得られた 4 種モノクローナル抗体のうち、Ab-THC#33 ( $\gamma 1$ ,  $\kappa$ ) が ELISA において最も高感度に THC に応答し (midpoint 1.1 ng/assay)、被疑物質 (大麻) 中 THC の検出に十分に使用が可能と思われた。本抗体は、THC のヒト尿中代謝物である THC-COOH にはさらに高感度に応答し (midpoint 0.2 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

#### 3-1 項 研究の背景

KT は麻酔薬として用いられてきたが、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。<sup>31,32)</sup> 日本では、医療用として (*R*)-KT と (*S*)-KT (図 11) のラセミ体が塩酸塩 [(±)-KT・HCl] として供給されているが、そ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。<sup>33~35)</sup> また、(*R*)-KT がリラクゼーション状態を誘導するのに対し、(*S*)-KT は精神異常作用を引き起こすとされている。それゆえ、いくつかの国では、現在、(*S*)-KT が主に流通しており、近年、その使用が増えている。<sup>33,35)</sup>

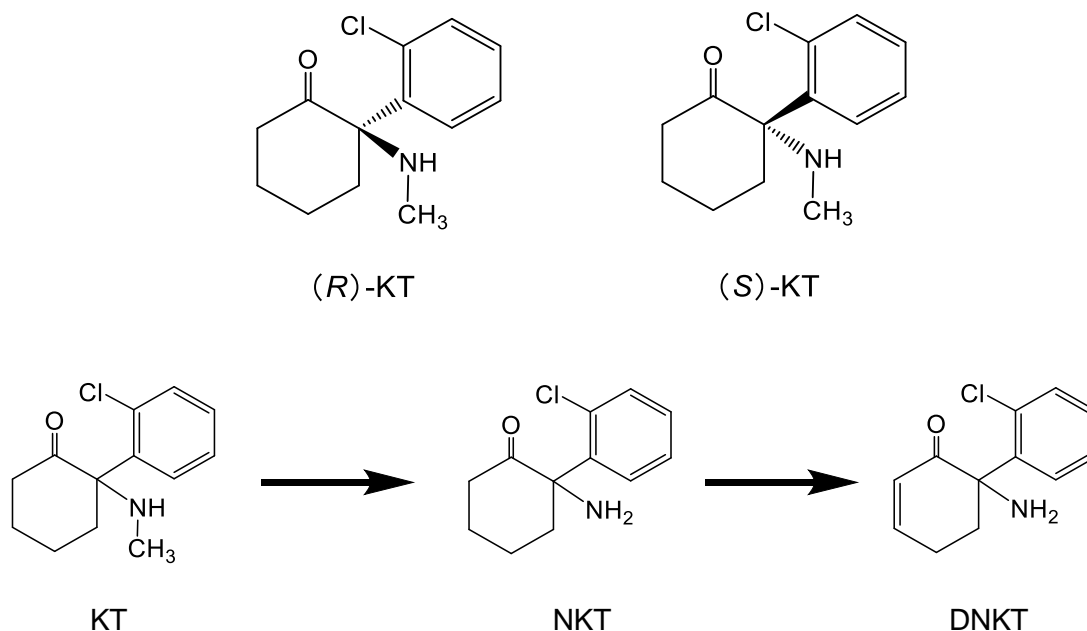


図 11. KT の構造と代謝経路

日本では、麻薬及び向精神薬取締法により、2007 年からその取り扱いが規制されており、KT の不正使用や被疑物質押収の現場で迅速で簡便、かつ高感度に KT の検出が可能なオンサイト分析法の開発が求められている。免疫測定法は、その目的に適しており、実際に抗 KT 抗体を用いたいくつかの免疫測定キットが市販されている。<sup>36~39)</sup> 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 に応答する抗体が不可欠であるが、現在、抗 KT 抗体を手に入れることは難しい。公式には、ポリクローナル抗 KT 抗体の作製について特許 1 報が報告されているのみで、この観点からも抗 KT 抗体の作製は難しいことが推察される。<sup>40)</sup> そこで本節では、市販されている KT-BSA 結合体と、自作の KT-BSA 結合体の 2 種類を免疫原として、抗 KT 抗体の自力作製を試みた。

### 3-2 項 ハプテン-キャリアー結合体の調製

前節で述べたように、KT のように分子量の小さな化合物は、それ自身が免疫原性を示さない。抗体の産生には適切な高分子キャリアーと結合させて動物に免疫投与するが、特異性の高い抗体を産生するためには、ハプテン誘導体のデザインが重要である。報告されている特許では、図 12 の Type A、Type B の化合物を合成しているが、そのうち Type A の化合物が免疫原の作製に用いられて

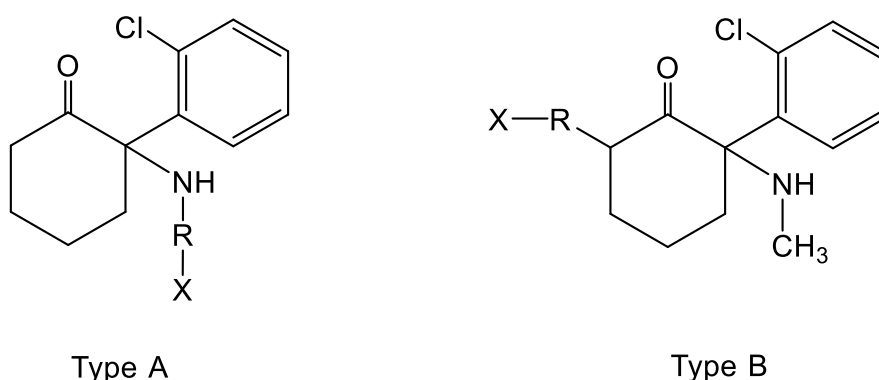


図 12. 既報におけるハプテン誘導体のキャリアー導入位置

“X”の官能基を利用してキャリアータンパク質を導入し、ハプテン-キャリアー結合体を作製する。“R”は KT と X を連結するリンカーである。<sup>40)</sup>

いる。<sup>40)</sup> しかし、KT の *N*-メチル基を修飾してキャリアと結合させているため、当然ながら、得られた抗血清は KT の脱メチル体であるノルケタミン (norketamine ; NKT) (図 11) にも大きな交差反応性 (138%) を示した。なお、KT-BSA 結合体は市販品としても入手できるが、この製品における KT 分子上の BSA 結合部位は不明である。

本研究では、*N*-メチル基を未修飾のまま残した Type B の化合物を合成した。すなわち、(±)-KT・HCl を KT 遊離塩基に変換したのち、*N,N*-ジメチルホルムアミド中、水素化ナトリウムおよび 3-bromopropionic acid ethyl ester を働かせたところ、エステル **1** が無色オイルとして得られた。この反応条件では *N*-アルキル化もあり得ると考えられたが、<sup>1</sup>H-、<sup>13</sup>C-核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance ; NMR) スペクトル、および heteronuclear multiple bond coherence (HMBC) スペクトルから、シクロヘキサノン環のカルボニルα位の炭素がアルキル化されたことが確認された (図 13)。

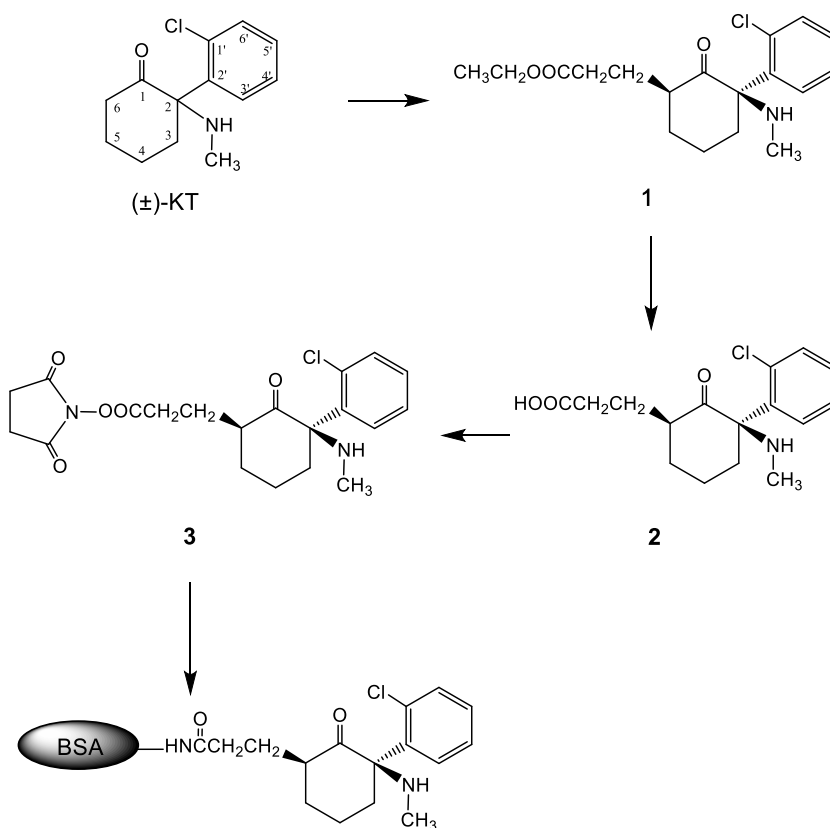


図 13. KT ハプテン誘導体および BSA 結合体の調製

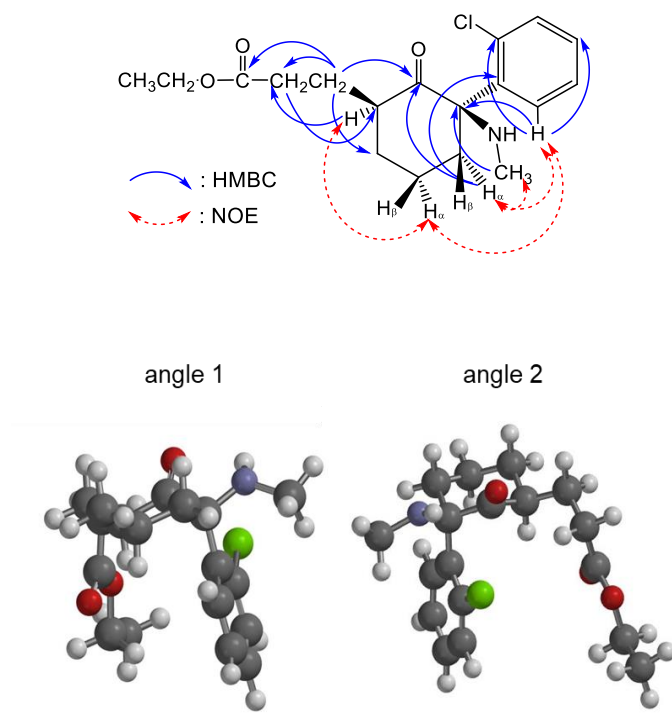


図 14. KT ハプテン誘導体の立体構造の確認

また、導入された置換基が *o*-クロロフェニル基とトランスの立体配置であることも nuclear overhauser effect correlated spectroscopy (NOESY) スペクトルから示され、この立体配置は *ab initio* 計算による最安定構造とも一致した (図 14)。この化合物 **1** のメタノール溶液に 5% 水酸化カリウムを加えて加水分解を行い、カルボン酸 **2** を無色オイルとして得た。化合物 **2** に、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) 塩酸塩と *N*-ヒドロキシコハク酸イミドを反応させて活性エステル **3** に導き、BSA と反応させて KT-BSA 結合体を調製した。

そのタンパク質濃度を Lowry 法に基づいて定量したのち、Habeeb の方法<sup>41)</sup>に従って BSA の未修飾アミノ基を求め、KT/BSA 結合モル比の平均値を推定した。その結果、28 の値が得られ、免疫原として用いるうえで、十分な値であることが確認された。

### 3-3 項 モノクローナル抗体の調製

上述の市販 KT-BSA [KT-BSA(a) とする]と前項で作製した KT-BSA [KT-BSA(b) とする]の 2 種免疫原を、それぞれ図 15 に示すように BALB/c または A/J マウス（それぞれ雌、8 週齢、5 匹）へ 2 週間ごとに 4 回、もしくは 5 回繰り返し投与し、血清中の抗 KT 抗体価の上昇を ELISA により比較した。抗体価の評価は、KT-BSA(a) 免疫群から得た血清については、KT-BSA(a) を固定化したプレートを用い、プレートに捕捉された抗 KT 抗体を POD で標識した抗マウス IgG 抗体を用いて検出した（図 16A）。他方、KT-BSA(b) 免疫群から得た血清については、ヤギ抗マウス抗体を固定化したプレートを用い、捕捉された抗 KT 抗体を、自作した KT の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -galactosidase ; GAL) 標識体 (KT-GAL) により検出した（図 16B）。なお、ここで用いた KT-GAL は、上記の活性エステル **3** を GAL に反応させ（反応モル比 20 : 1）、反応液を PD-10 カラムに付したのち、透析により精製して得たものである。

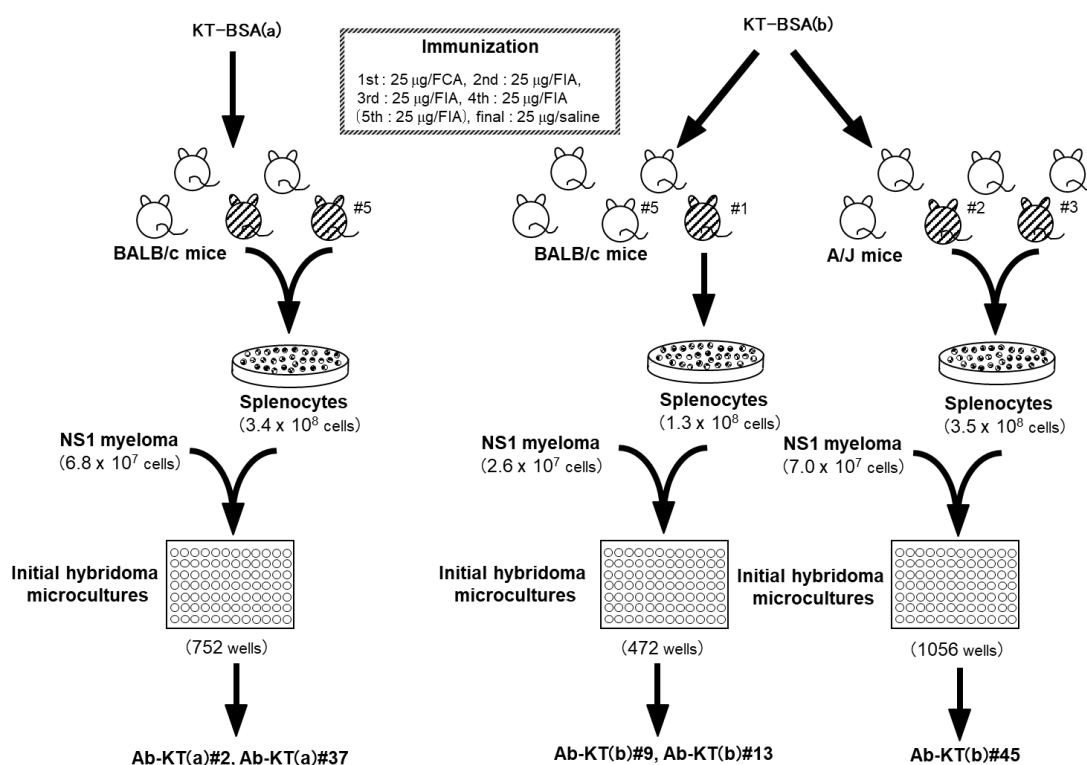


図 15. モノクローナル抗 KT 抗体の調製のための免疫と細胞融合実験

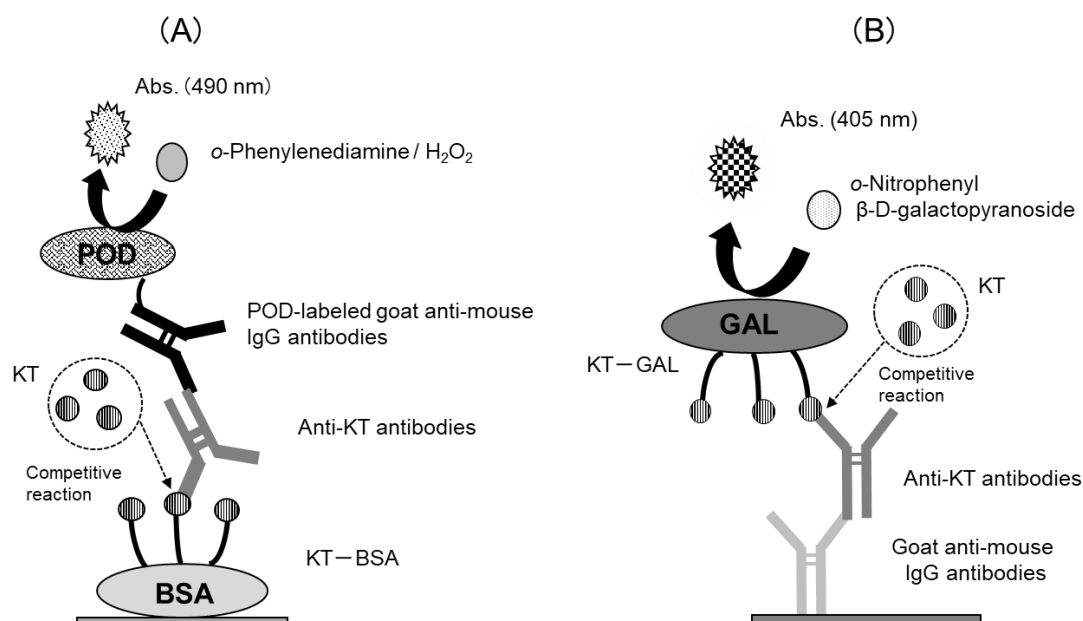


図 16. 抗 KT 抗体の検出に用いた ELISA 系

(A) : KT-BSA(a) 免疫群由来の抗体を検出する ELISA

(B) : KT-BSA(b) 免疫群由来の抗体を検出する ELISA

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（図 15：マウス個体のイラストに斜線を付して示す）に最終免疫を行い、3 日後に脾細胞を調製し、NS1 ミエローマ細胞と融合させた。この融合細胞を 96 ウェルクラスターディッシュ中で HAT 培地により培養して、ハイブリドーマを選択した。その培養上清を先述の ELISA にそれぞれ付してスクリーニングを行い、抗体産生能の強いハイブリドーマを選択し、限界希釈法によりクローニングを行った。その結果、KT-BSA(a) 免疫群から 2 種 [(a)#2、#37]、KT-BSA(b) 免疫群から 3 種 [(b)#9、#13、#45] の抗体産生細胞株を樹立した。これら細胞株が分泌する抗 KT 抗体[Ab-KT(a)#2、#37 および Ab-KT(b)#9、#13、#45]の H 鎖サブクラスはすべて  $\gamma 1$ 、L 鎖アイソタイプは Ab-KT(a)#2、#37 は  $\kappa$ 、Ab-KT(b)#9、#13、#45 は  $\lambda$  であった。

### 3-4 項 モノクローナル抗体の諸性質

前項で樹立した細胞株を大量に培養して、対応するモノクローナル抗 KT 抗体をその上清として調製し、競合型 ELISA における諸性質を比較した。

KT-BSA(a) 免疫群に由来する抗体については、図 16A の ELISA 系を、KT-BSA(b) 免疫群に由来する抗体については、図 16B の ELISA 系を用いた。なお、いずれの ELISA 系でも、酵素反応時間 30 分での  $B_0$  (KT 標準品非添加の反応) の吸光度がおおよそ 1.0 となるように培養上清をそれぞれ希釈して用いた。

#### ① ELISA におけるアッセイ感度

5 種それぞれの抗体について、(±)-KT・HCl 標準品に対する用量作用曲線を作製した (図 17)。アッセイ感度の指標となる midpoint ( $B/B_0$  が 50% となる (±)-KT・HCl 標準品添加量) を比較したところ、Ab-KT(a)#2、#37 ではそれぞれ 30、70 ng/assay であり、決して高感度とは言えない結果であった。他方、Ab-KT(b)#9、#13、#45 ではそれぞれで 3.0、2.0、2.1 ng/assay であり、10 倍かそれ以上に高感度な値を示した。

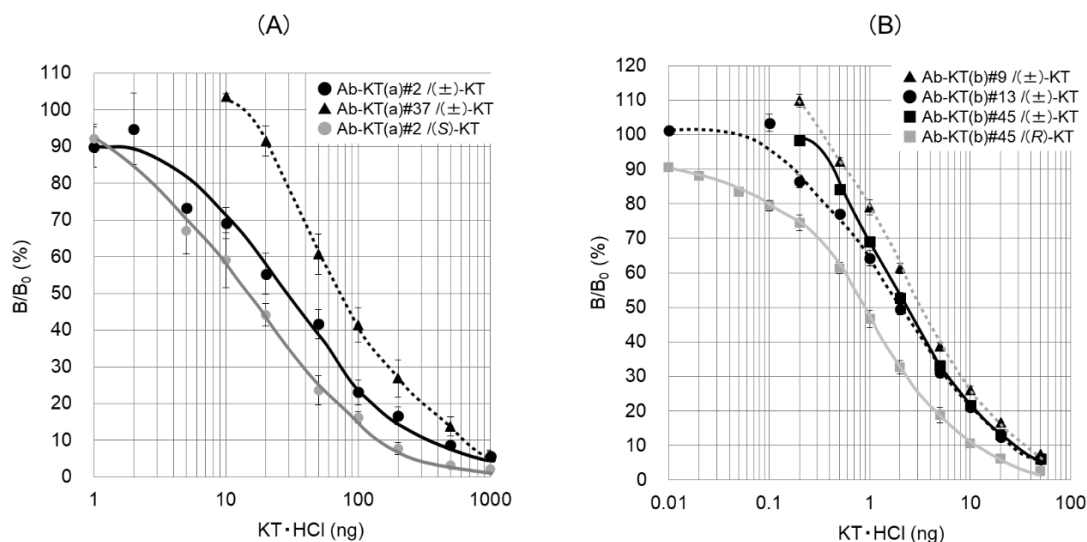


図 17. モノクローナル抗 KT 抗体を用いた ELISA における KT・HCl の用量作用曲線

(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。

## ② ELISA における特異性

これら抗体の特異性を、主要な KT 類縁化合物との交差反応試験により検討した。その結果、5 種いずれの抗体も NKT 塩酸塩 ( $\text{NKT} \cdot \text{HCl}$ ; 7~35%) に対してある程度の交差反応を示したが、デヒドロノルケタミン (dehydronorketamine; DNKT) の塩酸塩 ( $\text{DNKT} \cdot \text{HCl}$ ; 0.4~3.8%) については実用上十分に識別した (図 18)。KT-BSA(b) に由来する抗体については、その免疫原の構造 (KT のメチルアミノ基は未修飾である) と、ほぼ符合する結果と考えられる。そして、KT-BSA(a) 由来の抗体もほぼ同様の認識パターンを示しているということは、免疫原 KT-BSA(a) は、メチルアミノ基をキャリア結合部位とするものではない、ということになる。さらに興味深いことに、これら抗体は明らかなエナンチオ選択性を示した。KT-BSA(a) で免疫したマウスから得られた抗体 Ab-KT(a)#2、#37 は (*S*)-KT $\cdot$ HCl に特異的であり、( $\pm$ )-KT $\cdot$ HCl との反応性を 100% とした場合の (*S*)-KT $\cdot$ HCl の反応性は 210%、130%である一方、(*R*)-KT $\cdot$ HCl との反応性はそれぞれ 2.5、4.0%に過ぎなかった。これに対して、KT-BSA(b) を用いて免疫したマウスから得られた抗体 Ab-KT(b)#9、#13、#45 は (*R*)-KT $\cdot$ HCl に特異的であり、( $\pm$ )-KT $\cdot$ HCl との反応性を 100%とした場合の (*R*)-KT $\cdot$ HCl の反応性は 167~210% である一方、(*S*)-KT $\cdot$ HCl との反応性はいずれも 4.0%前後と小さかった。

本節でハプテン-キャリアの合成に用いた KT-COOH はラセミ体であるため、(*R*)-体、(*S*)-体、いずれの KT エナンチオマーも BSA と結合している。動物の体内では、個々の B 細胞が、その表面 IgG を介してキャリア分子上の (*R*)-KT あるいは (*S*)-KT のどちらかのハプテン残基を優先的に認識して結合し、形質細胞 (抗体産生細胞) へ分化すると考えられる。したがって、ラセミ体で調製した免疫原を用いても得られるモノクローナル抗体が (*R*)-体、(*S*)-体のいずれかに特異性を示すことは理解に難くない。免疫原 KT-BSA(b) では、(*R*)-KT 残基がより強い免疫原性を示したため、(*R*)-KT $\cdot$ HCl に特異的な抗体が産生されたと考えられる。他方、KT-BSA(a) を免疫して得られた抗体 Ab-KT(a)#2、#37 は、(*S*)-KT $\cdot$ HCl に特異的であった。NKT $\cdot$ HCl との交差反応性がそれぞれ 28%、32%であったことも併せて考慮すると、KT-BSA(a) の作製に用いられた KT 誘導体

は、図 12 の Type B の構造で、しかもラセミ体ではなく(S)-配置の誘導体であろうと考えられる。

なお、これら 5 種抗体は、KT とは基本骨格の異なる医薬品、*p*-アセトアミノフェノール、アセチルサリチル酸、クレアチニン、クレアチン、カフェイン、尿酸とはほとんど交差反応性を示さなかった (1%以下)。

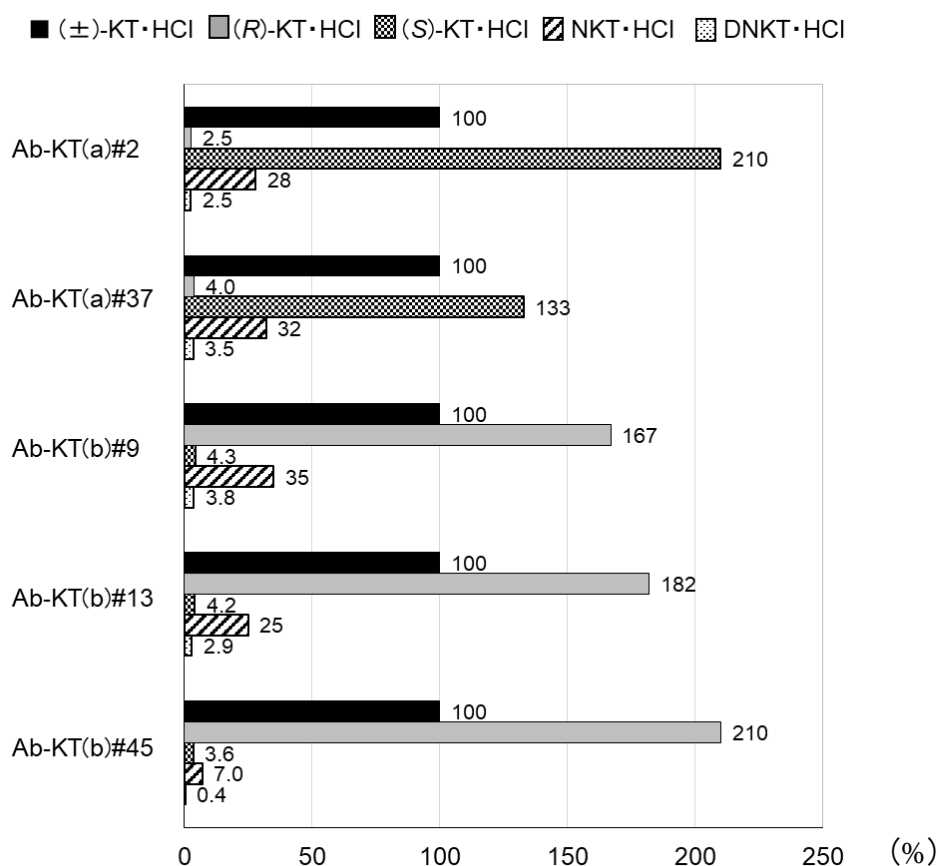


図 18. モノクローナル抗 KT 抗体の ELISA における交差反応性

### ③ 抗原結合能パラメータ

KT-BSA(a) 由来の抗体と KT-BSA(b) 由来の抗体のうち、最も高感度な用量作用曲線を与え、かつ特異性の観点からも有用と思われた抗体は、それぞれ Ab-KT(a)#2 と Ab-KT(b)#45 である。これらについて、(±)-KT に対する結合能パ

ラメータを算出した。培養上清から得られた Ab-KT(a)#2 と Ab-KT(b)#45 をプロテイン G カラムで精製したのち、アビディティー効果（第 2 章第 2 節 2-5 項参照）を避けるためパパイン処理して Fab フラグメント [Fab-KT(a)#2 と Fab-KT(b)#45] とし、それぞれ KT-BSA(a) もしくは KT-BSA(b) を間接的に固定化したバイオセンサーチップを用いて、BLI 法により、速度定数と結合定数を測定した。その結果、センサーチップ上の (±)-KT 基に対する Fab-KT(a)#2 の  $k_a$  は  $3.0 \times 10^5 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ 、 $k_d$  は  $4.0 \times 10^{-3} \text{ 1/s}$  であり、 $K_a$  は  $7.5 \times 10^7 \text{ L/mol}$ 、 $K_d$  は  $1.3 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$  であった。同様に、Fab-KT(b)#45 の  $k_a$  は  $1.1 \times 10^6 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ 、 $k_d$  は  $1.5 \times 10^{-3} \text{ 1/s}$  であり、 $K_a$  は  $7.7 \times 10^8 \text{ L/mol}$ 、 $K_d$  は  $1.3 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$  であった。Ab-KT(b)#45 は、Ab-KT(a)#2 より 10 倍大きな  $K_a$  を示しており、ELISA においてより高感度な用量作用曲線を与えたことと符合する結果である。また、いずれの抗体も  $1 \times 10^5 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$  を上回る大きな  $k_a$  値を示したが、これらの値は反応分子の拡散係数に基づいて推論される抗原抗体反応に関する  $k_a$  の最大値に近い。<sup>42)</sup> したがって、これら抗体は固相上に固定化された抗原に対して迅速に反応するものと推測され、イムノクロマトグラフィーやイムノセンサーのようなオンサイト分析を開発するうえで非常に有利と期待される。

#### ④ 実用性

現在、規制薬物としての KT は、ラセミ体のみならず (S)-KT も流通している。Ab-KT(b)#45 は、Ab-KT(a)#2 より測定感度が高く、(R)-KT・HCl に対する特異性を示すものの (S)-KT・HCl についても 3.6% の交差反応性を示すため 5.0～1,000 ng/assay の範囲 (midpoint 50 ng/assay) で測定が可能である。したがって、KT の不正使用を取り締まるためのオンサイト分析には、Ab-KT(b)#45 が最も適していると思われる。さらに、Ab-KT(a)#2 と併用することで、(S)-KT と (R)-KT を測り分けることも可能であると思われる。最近、うつ病モデルマウスにおいて、(R)-KT は (S)-KT より抗うつ作用が持続的であることが示された。<sup>43~45)</sup> (R)-KT は新規な抗うつ薬として有用である可能性があり、(R)-体に特異的な Ab-KT(b)#45 は、今後の開発研究に役立つものと期待される。

### 3-5 項 小括

BALB/c マウスあるいは A/J マウスを市販の KT-BSA(a) 結合体あるいは著者らが自作した KT-BSA(b) 結合体で免疫し、その脾細胞を NS1 ミエローマ細胞と融合させ、計 5 種の抗 KT 抗体産生ハイブリドーマを樹立した。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 種は (S)-KT・HCl に、KT-BSA(b) に由来する 3 種は (R)-KT・HCl に、それぞれ特異的であった。5 種抗体のうち、KT-BSA(b) に由来する Ab-KT#45 ( $\gamma 1, \lambda$ ) 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、(±)-KT に対して満足のいく結合定数  $K_a$  ( $7.7 \times 10^8$  L/mol) を示した。本抗体は、(±)-KT・HCl に対する反応性を 100% とするとき、(R)-KT・HCl の交差反応性は 210%、(S)-KT・HCl の交差反応性は 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 についても高感度に応答するため (midpoint 50 ng/assay)、KT の不正取り締まりを目的とするオンサイト分析に、最も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

### 4-1 項 研究の背景

近年、タバコ煙曝露により、肺がん<sup>46,47)</sup>や心臓疾患、<sup>48~50)</sup>循環器系疾患<sup>51)</sup>などの様々な疾病の発症リスクが高まるとされ、注意が喚起されている。特に、受動喫煙環境下にさらされた小児において、気管支喘息や気管支炎、肺炎や突然死症候群の危険性が高まるとされている。<sup>52)</sup>それゆえ、能動喫煙のみならず受動喫煙においても、タバコ煙曝露量を簡便かつ正確に評価することが重要である。

ニコチンは喫煙により主として口腔粘膜および肺胞から吸収されたのち、血漿タンパク質に結合し、血液を介して全身を循環し、ほとんどすべての臓器や組織に分布する。移行したニコチンは半減期2時間程度と短く不安定で、主に肝臓内で薬物代謝酵素 CYP2A6 により速やかに代謝され、CT およびその誘導体に変換されて尿中に排泄される (図 19)。<sup>3,53,54)</sup>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。<sup>3~6)</sup>CT は血液中にも存在するが、血液中 CT 濃度はタバコ煙吸入後の経過時間により、著しく変化する。これに対して、尿中濃度はその影響が小さいと言われている。<sup>55,56)</sup>さらに、尿中 CT 濃度は、血液中や唾液中よりも高いため、タバコ煙曝露量を測定するうえで有用である。<sup>55,56)</sup>能動喫煙における尿中 CT 濃度は数百 ng/mL を超えるが、<sup>57)</sup>受動喫煙陽性と判定するうえでの尿中 CT の下限値は、5~10 ng/mL<sup>50)</sup>と提唱されており、高感度な CT 測定法が求められる。

これまでに、尿中 CT 測定法が種々報告されている。<sup>52,57,58)</sup>液体クロマトグラフィー法では、CT やその代謝物を一斉分析することが可能であり、タンデム型質量分析計を検出器として用いることで、高感度かつ正確に定量することが可能である。しかしながら、検体である血液や尿をそのまま分析に付すことは難しく、煩雑な前処理が必要なため、多検体の測定には長時間を要する。一方、抗原抗体反応を利用する免疫測定法は、尿などの生体試料の前処理を行うことなく直接測定することも可能であり、一度に多くの検体を測定することができ

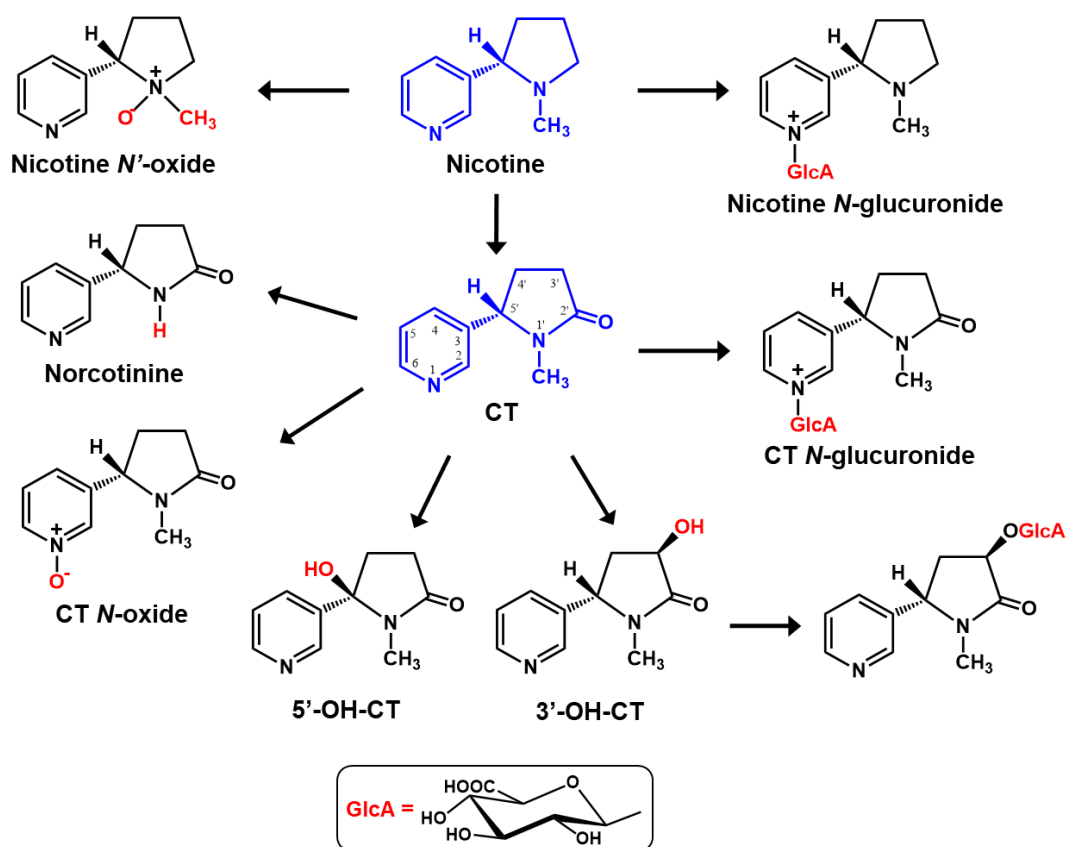


図 19. ニコチンの主要代謝経路<sup>48)</sup>

る。それゆえ、ひとつの目的物に対してマススクリーニングを行ううえで利便性の高い方法である。実際に、生体試料中の CT 量を測定する免疫測定法が確立され、アッセイキットとしても市販されているが、<sup>59~66)</sup> これらのほとんどはウサギのポリクローナル抗体を使用している。<sup>62~64,66)</sup> アッセイ系の標準化が可能であることを考慮すれば、モノクローナル抗体の導入が望ましい。しかしながら、CT に対する実用的なモノクローナル抗体を作製することは難しく、<sup>67,68)</sup> 実際、1986 年に 1 報が報告されているのみである。これらの抗体は ELISA に使用され、尿中 CT 量が測定されているが、ニコチン代謝物との交差反応など、詳細な特異性は報告されていない。<sup>69)</sup> その理由として、ポリクローナル抗体の調製で免疫されるウサギと、モノクローナル抗体の調製で免疫されるマウスの、B 細胞レパートリーの差が考えられる。今日、マウスモノクローナル抗体を、遺伝子操作で改変してその機能を高めることも可能である。そのためには、プロトタイプとなる抗体を産生するハイブリドーマ細胞が必要である。

そこで、本節では、受動喫煙のモニターに利用可能で、簡便、迅速な尿中 CT の標準免疫測定法の確立を最終目標として、マウスモノクローナル抗 CT 抗体の新規調製を試みた。

#### 4-2 項 免疫原および固定化抗原の調製

これまでも述べてきたように、CT のようなハプテンは、そのままでは免疫原性を示さないため、適切な高分子キャリアタンパク質と結合させてから動物に免疫投与する必要がある。そこで、抗 CT 抗体を得るためのハプテンーキャリア結合体を調製した。*trans*-4'-Cotininecarboxylic acid **1** (図 20) は、市販品として入手可能な CT 誘導体であるが、CT はピロリドン環の 3' 位 (図 19) あるいはピリジン環上に代謝を受けることを考慮すると、本化合物はキャリア

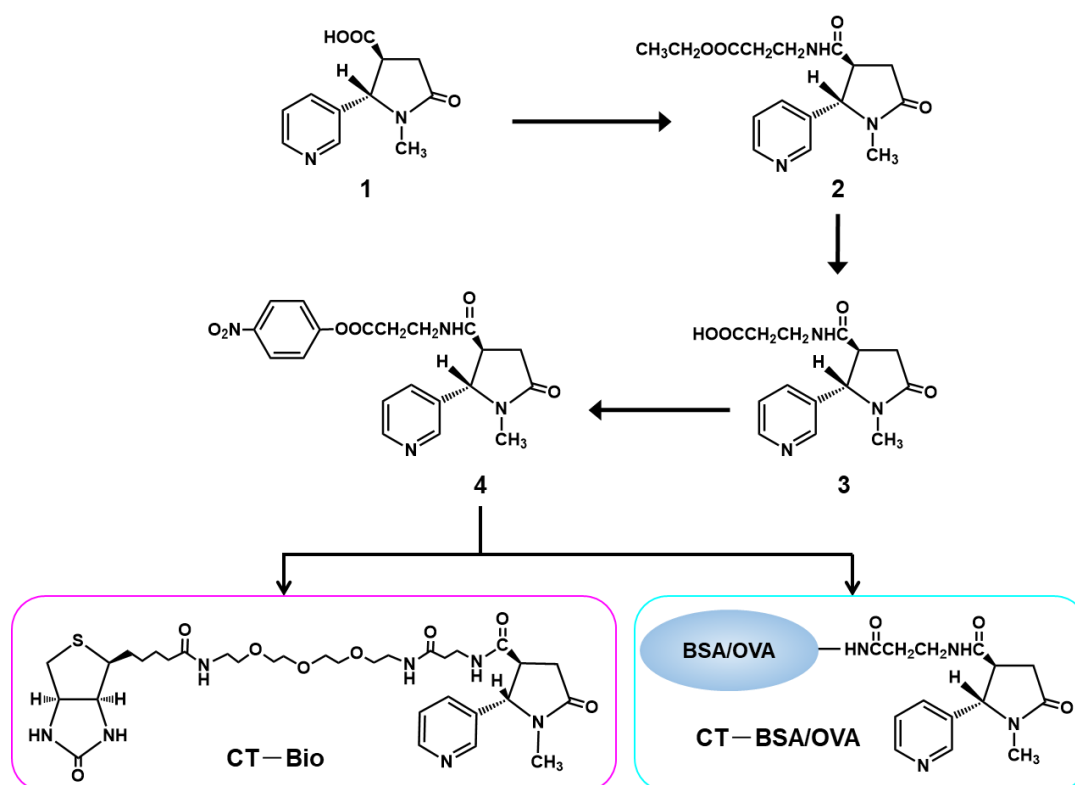


図 20. CT ハプテン誘導体の合成と、CT-アルブミン結合体およびビオチン標識 CT の調製

免疫原として CT-BSA 結合体を用いた。ELISA には、CT-OVA 結合体を固定化抗原として、CT-bio を標識抗原として用いた。

結合用化合物として好適と思われた。そこで、まず化合物 **1** の 4' 位カルボキシ基に  $\beta$ -アラニンエチルエステルを縮合させて化合物 **2** へ導き、アルカリ性条件下で加水分解を行い、キャリア結合用ブリッジを導入した化合物 **3** とした。次いで、*p*-ニトロフェニルエステル **4** に変換し、BSA と反応させてハプテナーキャリア結合体 (CT-BSA) を調製した。同時に、卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) と化合物 **4** を同様に反応させて CT-OVA 結合体 (CT-OVA) を作製し、ELISA の固定化抗原とした。

これらのタンパク質濃度を Lowry 法に基づいて定量したのち、Habeb の方法<sup>41)</sup>に従って BSA または OVA 中の未修飾アミノ基を求め、CT/BSA および CT/OVA 結合モル比の平均値を推定した。その結果、BSA 結合体では 24、OVA 結合体では 3 の値がそれぞれ得られた。

#### 4-3 項 モノクローナル抗体の調製

前項までと同様に、モノクローナル抗体の調製を試みた。CT-BSA をフロイントのアジュバントと混合し、これらを BALB/c マウス (雌、6~8 週齢、6 匹) へ 2 週間ごとに繰り返し免疫し、その血中の抗 CT 抗体価を ELISA により比較した。すなわち、CT-OVA を固定化したマイクロプレートに、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。最も強い反応を示したマウス個体に最終免疫を行い、3 日後に脾細胞を調製し、NS1 ミエローマ細胞と 40% ポリエチレングリコールを用いて融合した。この融合細胞を 96 ウェルクラスターディッシュ中 (全 1,056 ウェル) で HAT 培地により培養してハイブリドーマを選択し、その培養上清を上記の ELISA に付してスクリーニングを行い、12 ウェルの抗体産生能の強いハイブリドーマを選択し、限界希釈法によりクローニングした。その結果、12 種の抗体産生細胞株を樹立することに成功した。

そこで、これら細胞株を大量に培養して、対応するモノクローナル抗 CT 抗体を上清として調製し、その諸性質を吟味した。その結果は次項に記す。

#### 4-4 項 モノクローナル抗体の諸性質

##### ① ELISA におけるアッセイ感度と親和力

前項で得たモノクローナル抗体 12 種について、競合型 ELISA における感度の比較を企てた。はじめに、CT-OVA を固定化したマイクロプレートを用い、第 2 節 (図 7)、第 3 節 (図 16A) のような ELISA を試みたが、CT 添加による阻害が全く認められず、強いアビディティ効果 (第 2 章第 2 節 2-5 項参照) が働いていることが懸念された。そこで、ビオチン標識 CT を作製し、これを用いるアッセイ系に切り替えた (図 21)。まず、前項の化合物 **4** にアミノ基を持つビオチン誘導体 [Amine-PEO<sub>3</sub>-biotin] を反応させてビオチン標識 CT (CT-bio) を調製した (図 20)。次いで、競合型 ELISA の検討を行った。第 2 抗体 [ウサギ抗マウス IgG+IgM (immunoglobulin M)] をマイクロプレートに固定化したのち、ハイブリドーマ培養上清を加え、含まれる抗 CT 抗体を捕捉した。次に、CT 標準品と CT-bio を競合的に反応させたのち、プレート上の CT

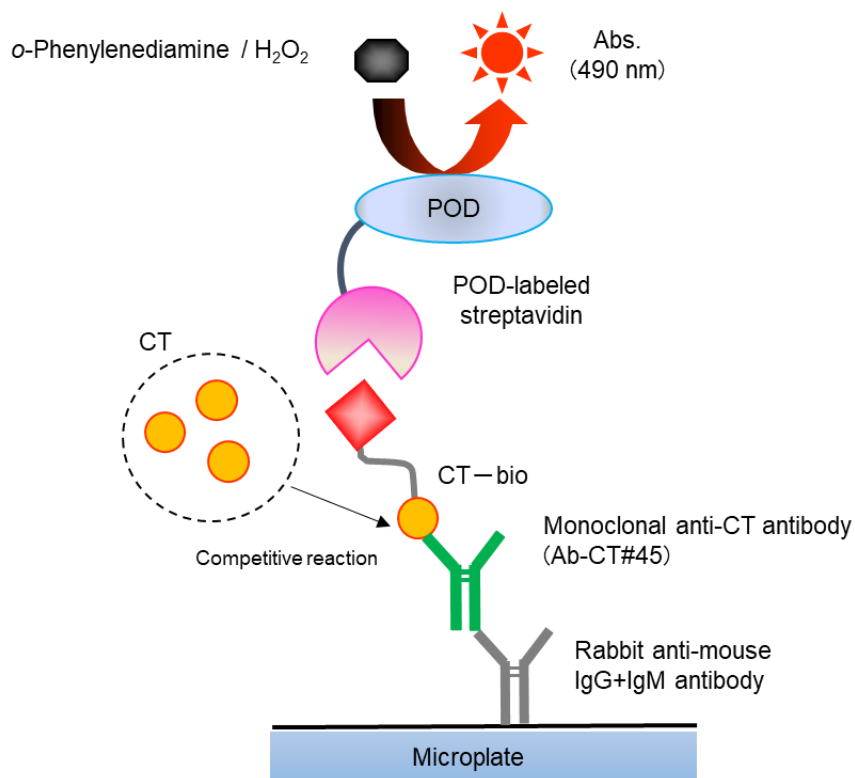


図 21. モノクローナル抗 CT 抗体を用いた CT 測定の ELISA 系

ーbio を POD 標識ストレプトアビジンで検出した。なお、抗 CT 抗体の希釈率は、酵素反応時間 30 分での  $B_0$  (CT 標準品非添加の反応) の吸光度がおおよそ 1.0 となるよう調整した。

この ELISA において、12 種抗 CT 抗体のうち、5 種で測定範囲がおおよそ 1～10 ng/assay の用量作用曲線が得られたが、細胞株#45-2 に由来する抗体 Ab-CT#45 がブランク尿の添加にほとんど影響を受けず、かつ最も高感度な CT の用量作用曲線を与えた (図 22)。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。なお、本抗体の H 鎖のサブタイプは  $\gamma 1$  で、L 鎖のアイソタイプは  $\kappa$  であった。

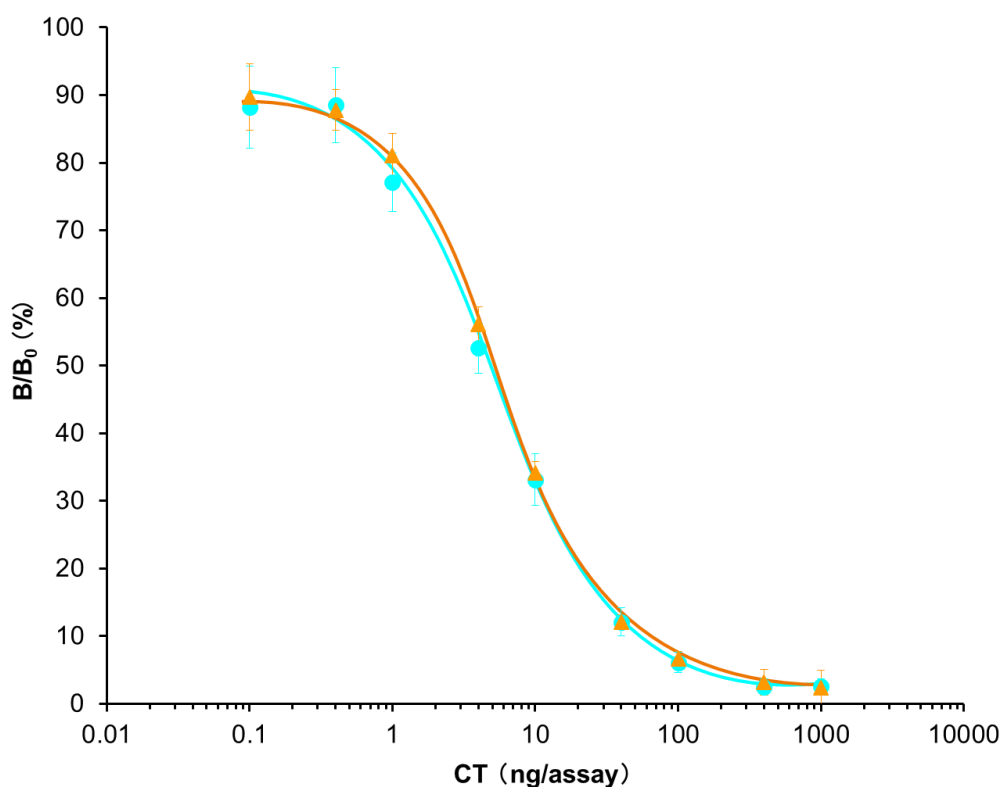


図 22. モノクローナル抗体 Ab-CT#45 を用いた ELISA における CT の用量作用曲線

● : ブランク尿\* (-)

▲ : ブランク尿\* (+)

エラーバーは、4 重測定における標準偏差 SD を示す。

\*ブランク尿は、非喫煙の両親と住む小学生 3 人の尿を混合したものをを用いた。

次に、この抗体の  $K_a$  を蛍光消光法で算出した。これは、抗体のパラトープ付近の芳香族アミノ酸に由来する蛍光が、紫外吸収を持つハプテンとの結合により消光する現象を利用した方法で、50%消光するのに要するハプテン濃度の逆数として  $K_a$  が算出できる。まず、細胞株#45-2 を無血清培地で培養し、その上清を、プロテイン G カラムに付して、精製抗体 Ab-CT#45 を得た。得られた抗体の一定量と各種濃度の CT または CT-bio を試験管に加え、ELISA における競合反応と同じ条件でインキュベーションしたのち、蛍光強度を測定した。その結果、CT に対する  $K_a$  は  $4 \times 10^6$  L/mol と算出された。CT-bio に対する  $K_a$  は  $5 \times 10^6$  L/mol と CT に対する値よりもやや大きく、この抗体が CT 基とビオチン基を結ぶブリッジ部分にも親和性を持つことが示唆された。いずれにしても、低分子バイオマーカーの測定に用いる抗体としては十分とはいえない値で（実用的な測定系の構築には、通常、 $K_a > 10^8$  L/mol であることが求められる）、上記の用量作用曲線の感度と符合する結果と言える。

## ② ELISA における特異性

主なニコチン代謝物と CT 類縁化合物（図 19）の計 9 種の ELISA における交差反応性を 50% 置換法により求めた（表 1）。ブランク尿の添加の有無に影響をほとんど受けない結果となっているが、この抗体はニコチン、CT *N*-glucuronide、CT *N*-oxide、ニコチンアミド、ニコチン酸（いずれも < 0.5%）、3'-OH-CT *O*-glucuronide、(*R*, *S*)-norcotinine（いずれも < 1.5%）のいずれについても十分に識別していた。3'-OH-CT については 8.4% の交差反応性がみられたが、これは CT の 4' 位に BSA を連結した免疫原を用いて Ab-CT#45 を作製したため、その近傍に位置する 3' 位のヒドロキシ基を認識することに難があったものと考えられる。また、(*R*)-(+)-cotinine [(*R*)-CT] との交差反応性は、5.0% であり、光学異性体がある程度識別することが示された。なおタバコに含まれるニコチンにおける (*R*)-ニコチンの含量は 0.1~0.6%<sup>3)</sup> であるため、この交差反応性は実試料の測定において問題にはならないと考えられる。

以上、本節で樹立した Ab-CT#45 は、主な尿中代謝物を十分に識別し、実用的な特異性を有するものと評価される。

表 1. モノクローナル抗 CT 抗体を用いる ELISA の交差反応性

Compound	Cross-reactivity <sup>a</sup> (%)	
	Blank urine (–)	Blank urine (+)
CT	100	100
Nicotine	0.2	0.3
3'-OH-CT <sup>b</sup>	8.4	9.1
3'-OH-CT <i>O</i> -glucuronide	0.6	0.7
CT <i>N</i> -glucuronide	<0.1	<0.07
CT <i>N</i> -oxide	0.05	0.16
( <i>R, S</i> )-Norcotinine <sup>c</sup>	1.5	— <sup>d</sup>
( <i>R</i> )-CT	5.0	7.2
Nicotinic acid	0.0004	0.0004
Nicotinamide	0.007	0.007

<sup>a</sup> Determined by the 50% displacement method. <sup>b</sup> (3'*R, S*)-3'-Hydroxy-CT

<sup>c</sup> Used as a racemic compound. <sup>d</sup> Not determined.

#### 4-5 項 尿中コチニン測定への応用

前項で構築した ELISA 系のヒト尿中 CT 測定への適否について検討した。まず、既報の免疫測定法<sup>66)</sup>で CT 濃度が 10 ng/mL 以下と判定された被験者 13 名の尿を前処理することなく直接この ELISA で測定した。しかしながら、ブランク尿を添加しない条件では、13 名中 7 名の尿が受動喫煙下限レベル (5~10 ng/mL) 以上の値となり (表 2)、尿中の何らかの物質による妨害 (マトリックス効果) が考えられた。そこで、妨害物質の影響を減らすため、測定系へブランク尿を添加し、検討を行うこととした。このブランク尿には、タバコ煙曝露のない小児の尿を用いた。添加量については、種々検討の結果、終濃度 10% とした。先述の尿試料 13 検体について、この条件で測定したところ、表 2 に示すように、11 検体が本 ELISA の検出限界 (limit of detection ; LOD) 以下の値となり、明らかに改善された結果が得られた。なお、LOD は、B<sub>0</sub> (CT 標準品を加えない反応系) の酵素活性を n=10 で測定したときの標準偏差の 2 倍分、B<sub>0</sub>

表 2. ブランク尿添加前後で得られたヒト尿中 CT の測定結果

Specimen <sup>a</sup>	Urinary level <sup>b</sup> (ng/mL)	
	Blank urine (–)	Blank urine (+)
#1	118	ND <sup>c</sup>
#2	ND <sup>c</sup>	ND
#3	ND	ND
#4	ND	ND
#5	168	ND
#6	ND	ND
#7	ND	ND
#8	ND	ND
#9	410	314
#10	288	ND
#11	318	225
#12	222	ND
#13	188	ND

<sup>a</sup> The urine specimens #1~10 were obtained from volunteers who visited a smoking cessation clinic, and #11~13 were from children who were living with non-smoker parents.

<sup>b</sup> Average of duplicate determinations.    <sup>c</sup> Not detectable (below the LOD).

平均値より低い酵素活性を示す CT 添加量として求め、0.15 ng/assay であった。なお、ブランク尿の添加により、用量作用曲線はわずかに高濃度側へ移動したが (midpoint は 5.3 ng/assay) (図 22)、測定感度の変化は無視しうる程度であった。交差反応性については、先述のように、ブランク尿添加の有無にかかわらず、ほとんど同じ結果が得られている (表 1)。

次いで、ブランク尿へ濃度既知の CT 標準品を添加して測定を行い、その回収率を求めたところ、表 3 のように、82.5~115%と満足のいく結果が得られた。前項で、CT の主代謝物のひとつである 3'-OH-CT について 8.4% (ブランク尿

表 3. ブランク尿試料<sup>a</sup>への CT と 3'-OH-CT の添加回収試験

Added (ng/assay)		Urinary CT level <sup>b</sup> (ng/assay)	Recovery <sup>c</sup> (%)
CT	3'-OH-CT		
2.0	0	2.3*	115
4.0	0	3.3*	82.5
4.0	4.0	4.0	100
4.0	8.0	5.0	125
8.0	0	7.8*	97.5
8.0	8.0	7.0	88.0
8.0	16	8.4	105
16	0	16.5*	103

<sup>a</sup> The CT level in this blank urine was below the LOD. <sup>b</sup> Average of quadruplicate (with asterisks) or duplicate (others) determinations. <sup>c</sup> Analytical recovery that was calculated by taking the added CT amounts as 100%.

添加時で 9.1%) の交差反応性がみられたため、本化合物が混在した場合の影響についても調べた。すなわち、CT とともに 3'-OH-CT を 1 : 1、もしくは 1 : 2 の割合で添加した試料を作製して ELISA に付したところ、CT の回収率は 88.0 ~125%であった。これは、3'-OH-CT にある程度の交差反応性が認められたにもかかわらず、本代謝物が共存することによる overestimation は問題にならない程度であることを示している。また、9 人のボランティアから得た尿試料 (I ~IX) について、繰り返し測定を行ったところ、日内変動、日間変動ともに満足 of いく結果が得られた (表 4)。

これら 9 試料のうち 7 種 (I~III、VI~IX) については高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography ; HPLC) でも CT の測定を行い、ELISA の結果と比較した。また、その 7 試料のうち 4 種 (III、VI、VII、IX) については、3'-OH-CT の測定も同時に行った。ELISA の日間測定平均値は、HPLC で得られた CT 測定値の 1.6~4.1 倍高い値を示したが、試料VIを除いて CT と 3'-OH-CT の合計値より低い値を示した。一方、「免疫反応性 CT (CT、3'-OH-

表 4. ELISA による尿中 CT の測定 日内変動、日間変動およびその他の測定法との比較

Specimen <sup>a</sup>	Present ELISA (ng/mL)			HPLC (ng/mL)	
	Intra-assay (CV) <sup>b</sup>	Inter-assay (CV) <sup>b</sup>	After extraction (dilution) <sup>c</sup>	ELISA kit <sup>d</sup> (ng/mL)	CT
I	1580 ± 95 (6.0)	1490 ± 85 (5.7)	580 (1:10); 668(1:20)	1560	706
II	1560 ± 58 (3.7)	1410 ± 119 (8.4)	255(1:10); 312 (1:20)	2880	343
III	1890 ± 185 (9.8)	1900 ± 165 (8.7)	729 (1:10); 798 (1:20)	3230	874
IV	2230 ± 51 (2.3)	2430 ± 189 (7.8)	—	4000	—
V	2770 ± 67 (2.4)	2850 ± 323 (11)	—	5090	—
VI	2740 ± 114 (4.2)	3210 ± 342 (11)	1170 (1:20)	5310	885
VII	2430 ± 460 (19)	2200 ± 418 (19)	1150 (1:10); 978 (1:20)	6520	836
VIII	3770 ± 332 (8.8)	3470 ± 330 (9.5)	1070 (1:20)	12400	1020
IX	1910 ± 218 (11)	1720 ± 231 (14)	—	16000	1090
					2420

<sup>a</sup> The urine specimens were obtained from volunteers who visited a smoking cessation clinic. <sup>b</sup> The urine specimens were directly analyzed using the ELISA. CV indicates the coefficients of variation (n=4).

<sup>c</sup> The urine specimens were analyzed using the ELISA (without adding the blank urine) after being extracted with CHCl<sub>3</sub>. <sup>d</sup> A commercially available ELISA kit for determining "immunoreactive cotinine" was used.

CT、3'-OH-CT *O*-glucuronide を含む) を測定する」とされる市販の ELISA キットを用いた測定値との比較では、著者らの ELISA のほうがかなり低い測定値を示した。また、クロロホルム抽出を行った尿試料について測定を行ったところ、ブランク尿を添加することなく直接測定より低い測定値が得られ、しかも HPLC の CT 測定値に近い値であった。

以上の分析結果より、著者らの ELISA では、尿の直接測定において CT に加えて交差反応性試験を行わなかった未知の極性化合物も合わせて測定している可能性が示唆された。しかしながら、得られた値は尿中 CT 量を反映しており、タバコ煙曝露量のモニターに有用と考えられる。必要に応じて、尿試料をクロロホルム抽出することで、より特異的な CT の測定が可能であろう。ただし、抗体の親和力不足のためアッセイ感度は十分とは言えず、受動喫煙下限レベルの尿中 CT を測定することは困難と判断せざるを得ない。

#### 4-6 項 小括

著者らが自作した CT-BSA 結合体で BALB/c マウスを免疫し、その脾細胞を NS1 ミエローマ細胞と融合させて、12 種の抗 CT 抗体産生ハイブリドーマを樹立した。これらの産物として得られた 12 種モノクローナル抗体のうち、Ab-CT#45 ( $\gamma 1, \kappa$ ) が ELISA において最も高感度に CT に応答したが、CT に対する結合定数  $K_a$  は  $4 \times 10^6$  L/mol にとどまった。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 (midpoint は 5.3 ng/assay)、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、規制薬物である THC (第2節) と KT (第3節)、および受動喫煙のバイオマーカーである CT (第4節) について、迅速で簡便なオンサイト免疫測定法を確立すべく、必須となるモノクローナル抗 THC 抗体、抗 KT 抗体、抗 CT 抗体を新規に調製した。

作製した抗 THC 抗体 Ab-THC#33 は、THC-COOH に対してむしろ大きな交差反応性を示した。したがって、この抗体が大麻の指標物質である THC の検出に有効であるのみならず、尿中の THC 代謝物である THC-COOH を測定することも可能と考えられた。しかし、その THC に対する  $K_a$  値は  $6.2 \times 10^7$  L/mol にとどまり、更なる親和力の向上が望まれた。

抗 KT 抗体の作製には、市販品と自作品の2種類の免疫原を用いたが、その結果、(S)-KT・HCl と (R)-KT・HCl のそれぞれのエナンチオマーに特異的な抗体が得られた。現在、乱用目的の KT としては、ラセミ体もしくは (S)-KT が流通している。自作の免疫原、KT-BSA(b) から得られた抗体 Ab-KT(b)#45 は、親和力 [(±)-KT 基に対する  $K_a$  値は  $7.7 \times 10^8$  L/mol] と特異性のいずれの観点からも実用に供しうると期待された。また、本抗体を Ab-KT(a)#2 と併せて用いることにより、(S)-KT と (R)-KT を測り分けることも可能と期待された。

モノクローナル抗 CT 抗体は、タバコ煙曝露量を簡便、迅速に測定するために極めて有用であるが、これまでその作製は困難視されていた。本研究で構築した抗 CT 抗体 Ab-CT#45 を用いる ELISA では、ブランク尿による補正を加えることで尿マトリックスの影響を抑えて受動喫煙レベルを反映する尿中 CT を測定することが可能と期待された。しかし、本抗体の親和力が不足していたため ( $< 10^7$  L/mol)、受動喫煙下限レベルの実測値を得るには不十分であった。

以上のように、取り組んだ3種のハプテン (THC、KT、CT) のいずれについてもモノクローナル抗体産生株を樹立することができたが、抗体の親和力に不満が残った。代表的な低分子バイオマーカーであるステロイドホルモン (エストラジオール-17 $\beta$ 、コルチゾール、アルドステロンなど) や甲状腺ホルモン (チロキシンなど) に対して産生されたモノクローナル抗体は、一般に  $10^9 \sim 10^{10}$

L/mol レベルの結合定数  $K_a$  を示すが、抗 THC 抗体と抗 CT 抗体については、その  $K_a$  値は  $10^8$  L/mol レベルに満たないものであった。高親和力抗体が得難い理由として、CT の場合はその分子量の小ささ ( $M_r$  176.22) も挙げられよう。Chappey らは、ハプテンの分子サイズが小さくなるほど、得られる抗体の  $K_a$  値が小さくなる傾向があることを報告している。<sup>67)</sup> この傾向は、「B 細胞レセプター (表面 Ig) のパラトープには一定以上の容積があるため、ハプテン-キャリアー結合体で免疫するとき、そのハプテン部分が小さいと、ハプテンのみならずキャリアーの一部までも認識する B 細胞クローンが刺激されて抗体産生細胞へ分化するため」と説明することができよう。THC はステロイドホルモンと同程度の分子量 ( $M_r$  314.45) を持つが、抗体パラトープとの間に水素結合やイオン結合を形成し得る極性官能基に乏しいことが高親和力抗体を得難い一因であろう。

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、モルモットを脾細胞供与動物とすることも選択肢のひとつであろうが、著者の所属する研究室では、これまでに遺伝子工学的手法を用いて、抗体に人工的に変異を加えることにより、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、親和力の向上し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。しかし、高親和力抗体をハイブリドーマ法で調製することは、抗原の投与を繰り返して生体内での親和性成熟を十分に促しても、必ずしも容易ではない。<sup>70,71)</sup> 実際、第1章で作製した抗 THC 抗体と抗 CT 抗体は、数回に及ぶ追加免疫ののちに調製したにもかかわらず、十分な親和力を有していたとは言い難い。

近年、遺伝子操作による抗体分子の人為的な改変、すなわち抗体の遺伝子工学（抗体工学）により、動物から得られる天然の抗体を上回る機能を獲得した様々な人工抗体を試験管内で創製することが試みられている。抗体の  $V_H$  と  $V_L$  をリンカーペプチドで連結した人工の低分子量フラグメント、一本鎖  $F_v$  フラグメント（scFv）は、対応する抗体と同等の抗原結合能を示すことが多い。しかも、その分子量は IgG の約 1/6 と小さく、1 つのオープンリーディングフレームの転写・翻訳により合成されるため、遺伝子操作による構造の改変に適しており、IgG の代替分子として汎用されている。例えば、これら scFv の遺伝子にランダム変異あるいは部位特異的な変異を加えたのち、適切な宿主に発現させることで、標的抗原に対する親和力や特異性が向上した変異 scFv を得る試みがなされている。ハプテン類についても、対応する抗体の遺伝子操作による親和力の改善（「試験管内親和性成熟」）が報告されているが、タンパク質抗原に対応する抗体のそれに比べて、<sup>10,11)</sup> 成功例はいまのところ乏しい。<sup>11,12)</sup> scFv の末端に、酵素や蛍光タンパク質などのような機能性タンパク質を遺伝子レベルで直結させることも可能であり、優れた性能を持つ融合タンパク質の構築も盛んに行われている。<sup>29,72,73)</sup> また、先述のように、scFv や Fab フラグメントの N 末端近傍のアミノ酸 1 残基を蛍光色素で標識した部位特異的蛍光標識抗体断片（クエンチ抗体あるいは Q-body と呼ばれる）が最近報告され、オンサイト分析

に特に適した抗体分子として注目を集めている。<sup>23,24)</sup> 標識された蛍光色素は抗体内のトリプトファン残基との相互作用により消光(クエンチ)されているが、抗原と結合する際に蛍光色素が外部に放出され、蛍光を発するようになる。したがって、標的抗原に過剰量のクエンチ抗体を反応させるだけで抗原量の増大に応じて増強する蛍光が観察される。すなわち、B/F 分離の不要な均一系、かつ非競合型であり、理想的なオンサイト分析法として期待されている。

このような先端のオンサイト法を確立するうえでも抗原に高い親和力で応答する抗体が必須であり、また、抗体分子を改変するためにその遺伝子のクローニングが前提条件となる。そこで、本章では、前章で得られたモノクローナル抗体の遺伝子工学による親和力の改善、すなわち、試験管内親和性成熟(アフィニティーマチュレーション)を企てた。第2節では、第1章第2節で新規に樹立したTHCに対する抗体Ab-THC#33を遺伝子操作により野生型抗THC-scFvに変換し、遺伝子レベルでランダム変異を導入してTHCへの親和力の改善を試みた。

第3節では、第1章第4節で樹立したCTに対する新規なモノクローナル抗体Ab-CT#45について、試験管内親和性成熟を企てた。本抗体はCTに対する $K_d$ が $10^6$ オーダーと低く、ELISAにおいて受動喫煙下限レベルのCTを実測するための感度を得ることが困難であったため、遺伝子操作の潜在力を評価するうえで格好の課題である。第2節と同様に、まず抗CT抗体を野生型抗CT-scFvに変換し、ランダム変異の導入により試験管内親和性成熟を試みた。

## 第2節 抗 $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノール抗体の機能改変

### 2-1 項 研究の背景

競合 ELISA の感度は、抗体の抗原に対する親和力の影響が大きい。現在、分析や診断に用いられている抗体は、主に B 細胞ハイブリドーマ法により作製されている。すなわち、動物を目的の抗原で免疫して、刺激された B 細胞をミエローマ細胞と融合することにより不死化するもので、得られる抗体は動物が産生する天然型の抗体 (*in vivo* 抗体) であるが、その多様性は“動物任せ”であるため、親和力や特異性におのずと限界がある。

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も、卵胞ホルモンであるエストラジオール- $17\beta$  に対するマウス抗体 (Ab#E4-4) を、3 段階の変異導入と改変変異種の選択を経て、Ab#E4-4 の Fab フラグメントよりも 250 倍大きな  $K_a$  を示す scFv ( $K_a = 1.3 \times 10^{10}$  L/mol) に改変することに成功している。<sup>74,75)</sup>

第1章で樹立した抗 THC 抗体 Ab-THC#33 は、その THC に対する  $K_a$  値が  $10^7$  L/mol のレベルで、必ずしも十分とはいえず、この手法により高感度化が可能か、興味を持たれる。そこで、Ab-THC#33 を遺伝子レベルでの分子構造改変に好都合な scFv 型に変換し、ランダム変異の導入により THC への親和力の改良を試みた。

### 2-2 項 抗体可変部遺伝子のクローニングと一次構造解析

まず、Ab-THC#33 の H 鎖および L 鎖の可変部遺伝子 ( $V_H$  および  $V_L$  遺伝子) をクローニングして、塩基配列を決定した。クローニング法としては、抗体産生ハイブリドーマの利用が可能な場合は、reverse transcription-PCR (RT-PCR) を行うのが一般的である。すなわち、ハイブリドーマ細胞から messenger RNA (mRNA) を抽出し、逆転写酵素により complementary DNA (cDNA) を合成し、これを鋳型として polymerase chain reaction (PCR) を行う。抗体の可変部遺伝子

は、その 3'側末端に一定の塩基配列をとる定常部遺伝子が隣接しているが、5'側末端 [すなわち、枠組み領域 (framework region ; FR) 1 およびリーダー配列] の塩基配列は抗体間で変化する。そこで、多様な 5'配列に対応が可能な 5'プライマー (ユニバーサルプライマー) のセットが種々開発されている。<sup>76)</sup>

本節では、 $V_H$  遺伝子のクローニングには、そのリーダー配列に相補的なユニバーサルプライマーセット (MHV-1~12) を用いた。これは、英国 Medical Research Council (MRC) で開発されたものである。<sup>77)</sup> まず、第 1 章第 2 節で樹立したハイブリドーマ株より総 RNA を抽出し、oligo dT をプライマーとして逆転写反応を行い、 $V_H$  遺伝子を含む cDNA を合成した。次いで、この cDNA を鋳型として、MHV-1~12 のいずれかと my1-GSP プライマーを用いて PCR を行ったところ、MHV-4 を用いる反応で増幅産物、すなわち  $V_H$  遺伝子を含む DNA 断片が得られた。

一方、 $V_L$  遺伝子のクローニングについても、oligo dT プライマーを使用して  $V_L$  遺伝子を含む cDNA を合成し、そのリーダー配列に相補的なユニバーサルプライマーセット (MKV-1~7、9、11)<sup>77)</sup> と  $\kappa$  鎖の定常部に特異的なプライマー (mk-GSP) を用いて PCR を試みた。しかし、いずれの組み合わせでも増幅産物は得られなかった。そこで、5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法<sup>78)</sup> によるクローニングを試みた。本法は、解析すべき遺伝子の片側 (3'末端側か 5'末端側) についてのみ塩基配列が既知の場合でも適用が可能な方法で、抗体可変部のように 3'側に定常部 (一定の塩基配列をとる) が隣接している遺伝子のクローニングには非常に有効である。先述の  $V_L$  遺伝子を含む cDNA に terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) と deoxycytidine 5'-triphosphate (dCTP) を働かせて 5'末端にポリ C 配列を付加したのち、ポリ C 配列に相補的なプライマー (abridged anchor primer ; AAP) と  $\kappa$  鎖定常部に相補的な  $C_\kappa$  プライマー (mk-GSP) を用いて PCR を行った。さらに増幅の特異性を高めるために、得られた産物を鋳型として、AAP の 5'側と同じ配列を有するプライマー (abridged universal amplification primer ; AUAP) と MKC プライマーを用いて nested PCR を行い、 $V_L$  遺伝子を含む DNA 断片を得た。

得られた  $V_H$  と  $V_L$  の各遺伝子を含む DNA 断片を pBluescript II ベクターへサ

ブクローニングし、大腸菌 XL1-Blue 細胞へ導入した。形質転換菌のクローンをコロニーPCR に付して目的の遺伝子を保持するクローンを特定し、組換えプラスミドを抽出して、DNA 塩基配列を解析した。対応するアミノ酸配列を Kabat の抗体シーケンスデータベースと照合したところ、118 アミノ酸から成る V<sub>H</sub> と、109 アミノ酸から成る V<sub>L</sub> の一次構造を同定することができた。なお、Kabat らの分類<sup>79)</sup>に基づき、V<sub>H</sub> はサブグループ IIIID、V<sub>L</sub> はサブグループ V に帰属された。

### 2-3 項 野生型 *scFv* 遺伝子の作製

前項で得られた塩基配列をもとに、V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub> 各遺伝子の 5'末端と 3'末端に相補的なプライマー（すなわち、V<sub>H</sub> 増幅用プライマー：THC#33V<sub>H</sub>-Rev、THC#33V<sub>H</sub>-For、V<sub>L</sub> 増幅用プライマー：THC#33V<sub>L</sub>-Rev、THC#33V<sub>L</sub>-For-2 の計 4 種）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 DNA フラグメントを調製した。このとき、V<sub>H</sub> 増幅の 3'プライマー（THC#33V<sub>H</sub>-For）と V<sub>L</sub> 増幅の 5'プライマー（THC#33V<sub>L</sub>-Rev）については、V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub> 両ドメインの連結部となるリンカーペプチド [(GGGGS)<sub>3</sub>] をコードする配列の一部を導入した。この配列の相補性を利用する overlap extension PCR により、V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> を連結して *THC-scFv-wt* 遺伝子を構築した。なお、V<sub>L</sub> の 3'プライマー（THC-#33V<sub>L</sub>-For-2）には、FLAG ペプチド (DYKDDDDK)<sup>80)</sup> をコードする配列を付加した。これは、発現した *scFv* タンパク質の精製や検出を容易に行うためである。こうして得られた *THC-scFv-wt* 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 5<sup>81)</sup> にサブクローニングし、大腸菌 XL1-Blue 細胞に導入した。コロニーPCR により目的の遺伝子 (*THC-scFv-wt*) を保持するクローンを同定し、その塩基配列を確認した。pEXmide 5 ベクターに導入された *scFv* 遺伝子は、*lac* プロモーターの支配下で可溶型タンパク質として発現され、*pelB* リーダーペプチドの働きによりペリプラズム間隙に放出される。<sup>82)</sup> そこで、得られた形質転換菌を isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) とスクロース（ペリプラズムの容積を増大させる）の存在下で培養し、<sup>82)</sup> 浸透圧ショック法に付すことで、野生型 THC の可溶型 *scFv* (*THC-scFv-wt* ; ファージに連結していない状態の

scFv) をペリプラズム抽出物として調製した。その THC 結合能については、次項で述べる。

#### 2-4 項 scFv の試験管内親和性成熟

前述のように、著者らは、エストラジオール-17 $\beta$  について、天然型抗体の Fab フラグメントより 250 倍、野生型 scFv より 150 倍以上も  $K_a$  値の増大した変異 scFv を創製することに成功している。<sup>74,75)</sup> この変異体は、野生型 scFv に対して、3 段階の変異導入と選択を繰り返して得られたものである。各ステップにおいて、error-prone PCR により  $V_H$  と  $V_L$  遺伝子へランダム点変異を導入し、改良型変異体はファージ提示法を活用して選択した。一般に、変異の位置として、抗原と直接相互作用する相補性決定部 (complementarity determining region ; CDR) が機能の改変に効果的と考えられるが、この研究において、FR における変異も親和力を劇的に高めうることが実証された。そこで、本項の研究でも、可変部遺伝子全体へのランダム変異導入法を用いて、変異 scFv のライブラリーを作製し、親和力の向上した変異体を探索することとした。

抗体の親和性成熟を図るうえで、error-prone PCR によりランダムな点変異を導入する方法は、簡便なうえ応用範囲が広い。error-prone PCR は、Leung ら<sup>83)</sup> によってプロトコール化されたもので、PCR の反応緩衝液中に  $Mn^{2+}$  イオンを添加し、さらに、dNTP 混合物を不均等な濃度で加えることにより、故意に DNA 複製の忠実度 (fidelity) を低下させることでアミノ酸の置換を導入する。変異の導入部位やパターンを制御することは困難であるが、変異の導入率については  $Mn^{2+}$  イオンの添加量の加減である程度の制御が可能である。そこで著者は、条件の異なる 4 種の error-prone PCR を行い、scFv ライブラリーの作製を試みた。すなわち、 $Mn^{2+}$  イオンの添加濃度は、0 (無添加：この条件でも低頻度ながら変異は起こる)、0.10 mmol/L の 2 条件下とした。また dNTP 混合物の組成は変異パターンに影響する要素であるため、dATP のみを dCTP、dGTP、dTTP の 1/5 に減じた条件と、dGTP のみを dATP、dCTP、dTTP の 1/5 に減じた条件の 2 条件を採用し、 $Mn^{2+}$  イオン濃度との組み合わせで計 4 条件とした。DNA 増幅酵素としては容易に入手可能で fidelity が比較的低い *AmpliTaq* DNA ポリメラーゼ

を用い、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  $V_H$ 、 $V_L$  各 DNA 断片 ( $mV_H$ -DNA と  $mV_L$ -DNA：それぞれ異なる条件で増幅して得た 4 種類がある) を得た。同じ PCR 条件で得られた変異  $V_H$ 、 $V_L$  遺伝子を 5'- $V_H$ -linker- $V_L$ -FLAG-3' となるように overlap extension PCR に付し、得られた *scFv* 遺伝子ライブラリー (やはり 4 種類できる) をそれぞれ pEXmide 5 ベクターにサブクローニングして、電気穿孔法により大腸菌 XL1-Blue 細胞に導入した。得られた 4 種の形質転換菌ライブラリーについて、ライブラリーサイズ (多様性の指標) を、*scFv* 遺伝子 (約 800 bp) 保持菌の数として求めたところ、いずれも約  $1 \times 10^6$  colony-forming unit (cfu) であった。

引き続き、形質転換菌ライブラリーを用いて変異 *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各 2 種 ( $Mn^{2+}$  イオンが異なる) をほぼ同量ずつ (cfu 値として) 混合してパンニングに付し、THC に対する結合能を保持するファージを選択した。すなわち、THC-BSA を固定化したチューブに上記のファージ (1st パンニングでは、 $1 \times 10^{12}$  cfu、2nd および 3rd パンニングでは、 $1 \times 10^{11}$  cfu) を加えてファージ粒子上に提示された *scFv* と THC の抗原抗体反応を行った。引き続き、非特異的に結合したファージおよび結合力の弱いファージを洗浄して除去し、THC 標準品を加えてインキュベーションすることで、固相に強く結合するファージを遊離させた。得られたファージを対数増殖期まで培養した XL1-Blue 細胞に感染させ、その感染菌に VCSM13 ヘルパーファージを感染させて回収したファージを複製し、次のパンニングに用いた。これを 1 サイクルとして、計 3 サイクルのパンニングを、高親和力のクローンを増やすために行った。なお、ファージの溶出条件を徐々に厳しくした (表 5)。3 サイクル目のパンニングののち、“dATP を減じたライブラリー” と “dGTP を減じたライブラリー” から回収されたファージ感染菌をクローン化し、それぞれから 72 種と 88 種のクローンをランダムに選択し、THC-BSA 固定化プレートを用い、酵素標識抗 M13 ファージ抗体で検出する「ファージ ELISA」によりその THC 結合能を評価した。その結果、“dGTP を減らしたライブラリー” から、野生型の *THC-scFv-wt* を提示するファージより、3 倍の感度 (midpoint

の比較による)を示す抗 THC 変異 scFv (THC-scFv#m1-36)を得た。このファージが提示している scFv の性質について、scFv-wt のそれとともに、次項で詳述する。

表 5. パンニングの各サイクルにおける遊離 THC の添加量と回収されたファージの cfu 値

Round of panning	Amount of free THC (μg)	Added phage (cfu)	Recovered phage (cfu)
1	10	$1 \times 10^{12}$	$1.1 \times 10^8$
2	1.0	$1 \times 10^{11}$	$1.2 \times 10^7$
3	0.10	$1 \times 10^{11}$	$1.5 \times 10^7$

## 2-5 項 野生型および変異 scFv の諸性質

### ① 分子構造

THC-scFv-wt と THC-scFv#m1-36 の一次構造の模式図を図 23 に示す。変異 THC-scFv#m1-36 は、その V<sub>H</sub>-CDR2 の N 末端、すなわち V<sub>H</sub> 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と推測されたが、後述のように THC への親和力が増大していた。このアミノ酸置換により、scFv のパラトープ内に 1 つのメチル基が導入されたことになるが、それによって THC のような疎水性分子との相互作用が増強したものと思われる。アミノ酸配列に基づき、SWISS MODEL Protein Modeling Server<sup>84)</sup> を活用して本変異 scFv の分子モ

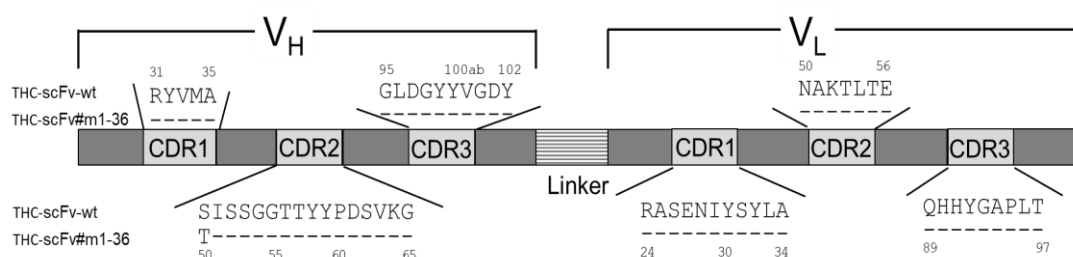


図 23. THC-scFv-wt と THC-scFv#m1-36 の一次構造

CDR (Kabat の定義<sup>79)</sup>に基づく) のアミノ酸配列を一字表記で示す。

デリングを行い、さらに SWISSDOCK<sup>85)</sup> により THC とのドッキングモデルを作成したところ、THC 分子のペンチル基に接触するようにトレオニン由来のメチル基が位置することが示唆された (図 24)。このモデリング構造を見てみると、THC-scFv-wt と THC-scFv#m1-36 の両方において、4 つの CDR (V<sub>H</sub>-CDR1、V<sub>H</sub>-CDR2、V<sub>H</sub>-CDR3、V<sub>L</sub>-CDR3) が THC 分子に近接しており、相互作用に重要な役割を担っていることが示唆された。

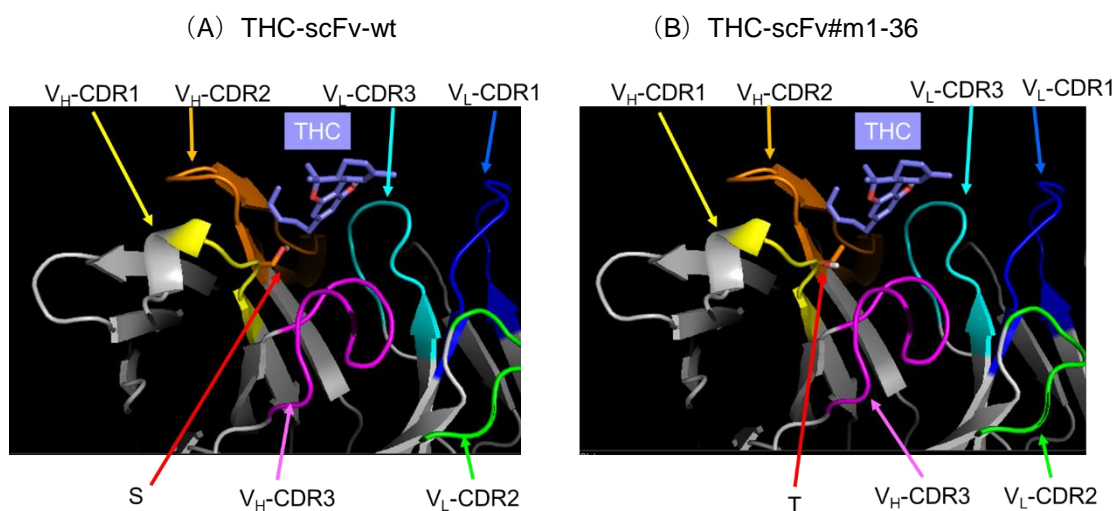


図 24. THC-scFv の THC とのドッキングモデル

親和性成熟により導入された S から T へのアミノ酸置換を赤の矢印で示す。  
主に FR から構成される  $\beta$ -シート構造を太い矢印で示す。

続いて、ファージ上に提示されている野生型および変異型の scFv をそれぞれ可溶性 scFv として調製し、アフィニティーカラムに付して精製したのち、その諸性質について評価した。まず、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) に付したところ、THC-scFv-wt と THC-scFv#m1-36 のそれぞれの理論上の分子量 ( $M_r$ ) 26,805 と 26,819 と符合する位置に、単一のバンドとして検出された (図 25A)。引き続き、ウェスタンブロッティングを行った。分離されたタンパク質をポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride; PVDF) 膜に転写し、C 末端側に付加した FLAG タグを POD 標識抗 FLAG 抗体を用いて可視化したところ、上記のバンドは明瞭に発色し、C 末端までインフレーションで発現されていることが確認された (図 25B)。

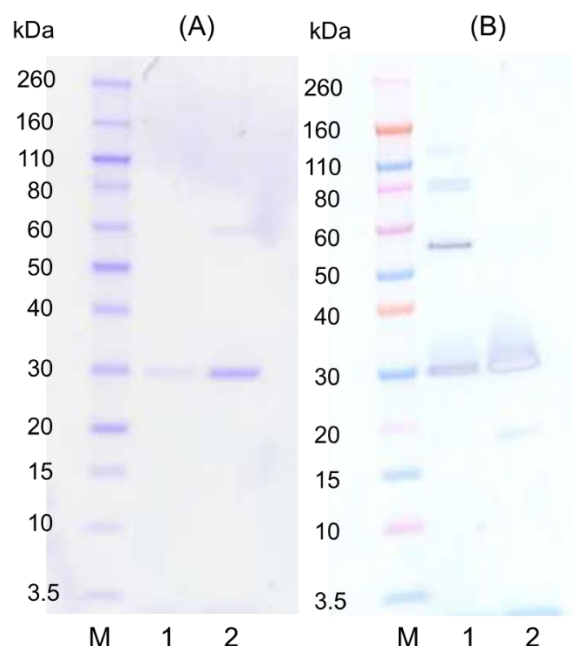


図 25. 可溶型 scFv の SDS-PAGE

M : 分子量マーカー 1 : THC-scFv-wt 2 : THC-scFv#m1-36

(A) クマシーブリリアントブルーによる染色。

(B) イムノブロッティングによる検出。

## ② 抗原結合能パラメータとアッセイ感度

それぞれの scFv について、BLI 法によりセンサーチップ上の THC 基に対する  $K_a$  値を求めたところ、変異型 THC-scFv#m1-36 では  $1.1 \times 10^8$  L/mol であり、野生型の THC-scFv-wt ( $1.1 \times 10^7$  L/mol) より 10 倍高い値が得られた。この違いは、解離速度定数  $k_d$  の違いによるところが大きい。すなわち、THC-scFv#m1-36 の  $k_d$  値は  $3.2 \times 10^{-4}$  1/s であり、THC-scFv-wt の値  $2.2 \times 10^{-3}$  1/s より約 10 倍小さい。他方、 $k_a$  値は、THC-scFv-wt と THC-scFv#m1-36 とでほぼ同じ [それぞれ、 $2.3 \times 10^4$  L/(mol·s)、 $3.6 \times 10^4$  L/(mol·s)] であるため、より解離が遅い抗体へと改変されたことで親和力が向上したことが示された。

THC-scFv-wt の  $K_a$  値は、由来するマウス抗体である Ab-THC#33 の  $K_a$  値 ( $6.2 \times 10^7$  L/mol) (第1章 2-3 項参照) より約 5 倍小さい。それにもかかわらず、競合 ELISA において、THC に対する用量作用曲線の midpoint は、Ab-THC#33 の 1.1 ng/assay に対し、THC-scFv-wt は 0.80 ng/assay であり、感度はむしろ向上し

ていた。この感度の向上は、THC-scFv-wt の結合価が 1 価であることによるものと思われる。Ab-THC#33 のような IgG 型抗体は 1 分子中に 2 つのパラトープを持つ。このため、固相上の抗原決定基に対して同時に複数の結合点が生じ、結果として個々のパラトープによる結合より強い結合が生まれる（アビディティ効果と言う）。その結果、添加した遊離抗原による競合が鈍くなるが、scFv ではこの影響を受けにくい。THC-scFv#m1-36 は、midpoint は 0.27 ng/assay であり、THC-scFv-wt よりも ELISA の感度がさらに 3 倍向上していた（図 26A）。これは、言うまでもなく、アミノ酸置換により THC への親和力が改善されたことによるものである。THC-scFv#m1-36 を用いた ELISA の LOD を、 $B_0$ （THC 濃度ゼロの点）の吸光度の平均値（ $n=10$ ）からその標準偏差の 2 倍を差し引いた吸光度を与える THC の質量として算出したところ、0.10 ng/assay であり、THC-scFv-wt の LOD（0.20 ng/assay）より 2 倍高感度であった。

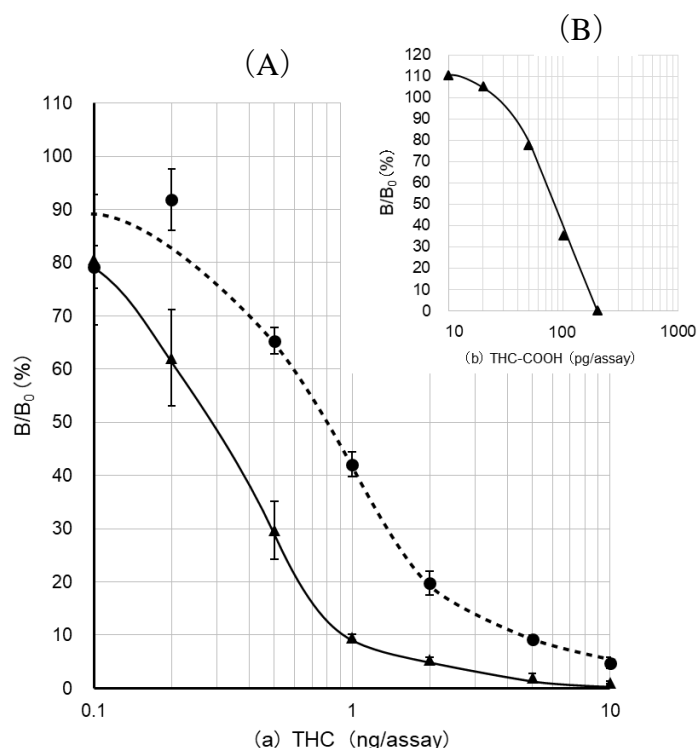


図 26. THC(A) および THC-COOH(B) に対する THC-scFv-wt または THC-scFv#m1-36 による ELISA の用量作用曲線

● : THC-scFv-wt      ▲ : THC-scFv#m1-36

(A) エラーバーは、4 重測定における標準偏差 SD を示す。

(B) 各点は 2 重測定の平均値である。

### ③ ELISA における特異性

scFv の特異性を、ELISA における 4 種の類縁化合物との交差反応性（50%置換法による）を求めて評価した（図 27）。野生型 THC-scFv-wt における THCA、CBN、THC-COOH、THC-COOGlu に対する交差反応性は、それぞれ 0.8%、12%、400%、83%であった。由来するマウス抗体である Ab-THC#33 と同様の認識パターンを示し、11 位に修飾を受けた化合物と大きく交差反応しているが、CBN、THC-COOGlu に対してはそれぞれ 3 倍、5.9 倍大きな値であり、scFv 化による特異性の変化が認められた。他方、変異体 THC-scFv#m1-36 については、THCA、CBN、THC-COOH、THC-COOGlu に対して 2.3%、43%、813%、26%であった。Ab-THC#33 と比べて、いずれも増加しているが、なかでも CBN については 10 倍以上も高い交差反応性を示した。しかし、CBN と THC は、カンナビジオール（CBD）とともに、いずれも *Cannabis sativa* L. から単離される主成分である。

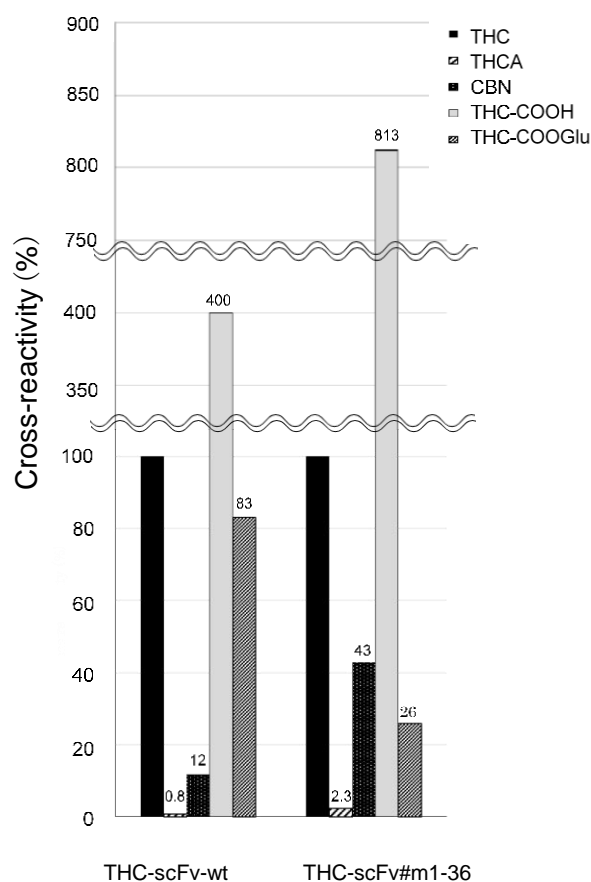


図 27. THC-scFv-wt と THC-scFv#m1-36 の ELISA における交差反応性

したがって、被疑物質が違法な大麻成分を含むか否かを検査するうえで、CBN に対して増加した交差反応性は不利にならないと考えられる。

大麻を摂取した場合、THC は速やかにヒトの体内で、THC-COOH、さらに 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絶好のバイオマーカーとなりえる。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 26B）。それゆえ THC-scFv#m1-36 は、被疑物質中の THC の検出に有効であるのみならず、大麻使用者の尿中の代謝物の測定にも有効であると評価できる。

SAMHSA は、大麻成分分析における尿中 THC 代謝物のカットオフ値として 50 ng/mL を推奨している。変異体 scFv#m1-36 を用いる ELISA における THC-COOH の用量作用曲線において、50 ng/mL の試料は、夾雑物質の影響を考慮して 30 倍希釈したとしても約 50% の  $B/B_0$  値であり、容易に検出が可能である。

なお、カンナビノイド類とは関連のない構造を持つ化合物である *p*-アセトアミドフェノール、アセチルサリチル酸、クレアチニン、クレアチン、カフェイン、および尿酸との交差反応性は、THC-scFv-wt ではいずれも 0.02% 以下、THC-scFv#m1-36 で 0.004% 以下であり、無視しうる程度であった。

## 2-6 項 小括

本節では、第 1 章で新規に調製した THC に対するマウス抗体の  $V_H$  と  $V_L$  遺伝子をハイブリドーマ株からクローニングし、THC-scFv-wt ( $K_a$  値  $1.1 \times 10^7$  L/mol) を調製した。この野生型 scFv をもとに、試験管内親和性成熟により親和力が 10 倍向上した変異 THC-scFv#m1-36 ( $K_a$  値  $1.1 \times 10^8$  L/mol) を創製することができた。この変異 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 や大麻使用者尿中の THC 極性代謝物の検出に適用が可能と期待される。

### 第3節 抗コチニン抗体の機能改変

#### 3-1 項 研究の背景

タバコ煙曝露と肺がんや循環器系疾患、呼吸器系疾患との関連がしばしば問題として取り上げられている。<sup>46~51)</sup> その結果、能動的喫煙のみならず受動喫煙の量を概算するための便利で信頼できる方法が求められている。第1章第4節で述べたように、ニコチンの主代謝物である CT の尿中レベルは、タバコ煙曝露量の良い指標となる。実際に尿中 CT を測定する免疫測定システムがいくつか開発され、市販されている。しかしながら、ハイブリドーマ法により実用的なモノクローナル抗 CT 抗体を作製することが困難なため、これらアッセイのほとんどが、いまだウサギ由来のポリクローナル抗 CT 抗体に頼っている。十分な性能を持ったモノクローナル抗 CT 抗体の産生は、30 年前に報告されているのみである。<sup>69)</sup> ある特許公報は、「モノクローナル抗 CT 抗体の作製を 15 年に渡り何度も試みたがついに成功しなかった」ことを記し、その難しさを強調している。<sup>86)</sup> その原因のひとつとして、分子量が小さく ( $M_r$  176.22)、極性官能基の数が少ないことが挙げられよう。<sup>67,68)</sup> 著者も第1章第4節で、ハイブリドーマ法により抗 CT モノクローナル抗体を作製したが、得られた抗体 (Ab-CT#45) の親和力はやはり十分とは言い難く、これを用いた ELISA では受動喫煙レベルの CT をモニターするうえで十分な感度が得られなかった。

そこで、本節では、Ab-CT#45 を野生型 scFv へ変換したのち、変異 scFv を作製し、その親和力の改善を試みた。さらに、受動喫煙者の尿中 CT 量の測定も可能な ELISA の確立を試みた。この取り組みが成功すれば、動物由来の抗体の限界を遺伝子操作により打ち破る「抗体育種」の有効性が実証されることになるだろう。

#### 3-2 項 抗体可変部の遺伝子クローニングと一次構造解析

抗 CT 抗体 Ab-CT#45 を scFv 化するために、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、塩基配列の同定を試みた。そのクローニング法としては、第2節でも述べたように、ユニバーサルプライマーを用いる方法と

5'-RACE 法の 2 通りがある。本節では、まず、5'-RACE 法<sup>78)</sup>に従いクローニングを試みたが、目的を達することができなかった。そこで、ユニバーサルプライマーによるクローニングを行った。

ユニバーサルプライマーとは、複数の 5'プライマーのセットで、多様性を示す  $V_H$  と  $V_L$  の 5'末端の FR またはさらに上流のリーダー配列にそのいずれかが相補性を持つように設計したものである。<sup>76)</sup> 本節でも、前節と同様に Jones と Bendig により報告されたプライマーセット (MHV-1~12 および MKV-1~11)<sup>77)</sup> を用いた。まず、第 1 章第 4 節で樹立したハイブリドーマ株より総 RNA を抽出し、oligo dT をプライマーとして cDNA を合成した。次いで、これを鋳型とし、 $V_H$  遺伝子の増幅には MHV-1~12 のいずれかと  $\gamma 1$  鎖定常部に相補的な 3'プライマー、 $V_L$  遺伝子の増幅には MKV-1~11 のいずれかと  $\kappa$ 鎖定常部に相補的な 3'プライマーを用いて PCR を行ったところ、 $V_H$  遺伝子では MHV-5、 $V_L$  遺伝子では MKV-4 を用いたときに目的遺伝子の一部を得ることができた。この断片に相補的なプライマーを作製し、PCR を試みたところ、目的の  $V_H$  および  $V_L$  の全長をコードすると思われる遺伝子断片を得た。その DNA 塩基配列を解析し、対応するアミノ酸配列を Kabat の抗体シーケンスデータベースと照合したところ、109 アミノ酸から成る  $V_L$  の一次構造を同定することができた (図 28B)。しかし、 $V_H$  については、NS1 ミエローマ細胞に由来し、CDR3 の半ばでフレームシフトを起こす偽遺伝子と、 $V_H$  に特徴的なアミノ酸配列をインフレームでコードしてはいるが FR1 に 7 アミノ酸分の欠失が認められる 2 種の遺伝子断片が得られるのみで、その一次構造を同定することができなかった。そこで、マウス抗体 Ab-CT#45 を還元条件下で SDS-PAGE に付して H 鎖を分離し (図 29)、エドマン分解に基づくアミノ酸分析を行ったところ、N 末端から 9 残基について、EIQLQQSGP の結果が得られ、これは上記の遺伝子のいずれとも異なるものであった。そこで、この配列を基に縮重塩基を持つ 5'プライマー [CT-5(dg)-Sfi I] を新たに設計し、先述の cDNA に対して PCR を行った。得られた増幅産物の DNA 塩基配列を解析したところ、118 アミノ酸から成る  $V_H$  の一次構造を同定することができた (図 28A)。なお、Kabat らの分類<sup>79)</sup>に基づき、 $V_H$  はサブグループ IIA、 $V_L$  はサブグループ V に帰属された。

(A) $V_H$ -sequence		(B) $V_L$ -sequence	
Ab-CT#45	GAA ATT CAA TTG CAG CAG TCT GGA OCT GAA CTG GTG AGG OCT GGG GCT TCA GTG E I Q L Q S G P E L V R P G A S V	Ab-CT#45	GAC GTC AAG TTG AOC CAG TCT CCA TCT TOC ATG AAT GCA TCT CTA GGA CAA AGA D V K L T Q S P S M N A S L G Q R
Ab-CT#45	AGG ATA TCC TGC AAG ACT TCT GGT TAC TCC TTC ACT AAC TAC ATC ATA TAC TGG R I S C K I S G Y S F I N Y I I Y W	Ab-CT#45	GTC ACT ATC ACT TGC AAG GCG AGT CAG GAC ATT AGT CCC TAT TTA AGC TGG TTC V T I T C K A S Q D I S P Y L S W F
Ab-CT#45	GTG AAA CAG AGC CAT GGA AAG AGC CTT GAA TGG ATT GGA TAT ATT TAT OCT TAC V K Q S H G K S L E W I G Y I Y P Y	Ab-CT#45	CAT CAG CAA CCA GGG ACA TCT OCT AAG AOC CTG ATC TAT CBT ACA GAC AGA TTG H Q Q P G T S P K T L I Y R T D R L
Ab-CT#45	AGT GGT GGT ATT AAA TTC AAC CAG AAG TTC AGS GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTT S G G I K F N Q K F K G K A T L I V	Ab-CT#45	ATA CAT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGA CAA GAT TAT TCT I H G V P S R F S G S G Q D Y S
Ab-CT#45	GAC AAG TCC TCC AGC ACA GCC TTC ATG CAT CTC ATC AGC CTG ACA TCT GAG GAC D K S S S T A F M H L I S L T S E D	Ab-CT#45	CTC ACC ATC AGC AGC CTG GAC TCT GAA GAT ATG GGA ATT TAT TAT TGT CTA CAG L T I S S L D S E D M G I Y C L Q
Ab-CT#45	TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA GAT COG GTA GCA GAT TCT CTG GAC TAC TGG S A V Y Y C A R D P V A D S L D Y W	Ab-CT#45	TAT GAT GAG GTT COG TTC ACAG TTC GGA GGG GGG ACC AAG GTG GAA ATG AAA CGG GCT Y D E V P F T F G G T K V E I K R A
Ab-CT#45	GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA G Q G T S V T V S S		

図 28. 抗コチニン抗体 Ab-CT#45 の可変部遺伝子塩基配列とアミノ酸配列

$V_H$  (A)、 $V_L$  (B) の DNA 塩基配列およびアミノ酸配列を示す。CDR の塩基配列およびアミノ酸配列 (Kabat の定義<sup>79)</sup>に基づく) は太字斜体で示した。下線で示した DNA 塩基配列は、遺伝子クローニングに縮合ブライマーを用いたものから得られたため、実際の  $V_H$  遺伝子の DNA 塩基配列とは異なる可能性がある。

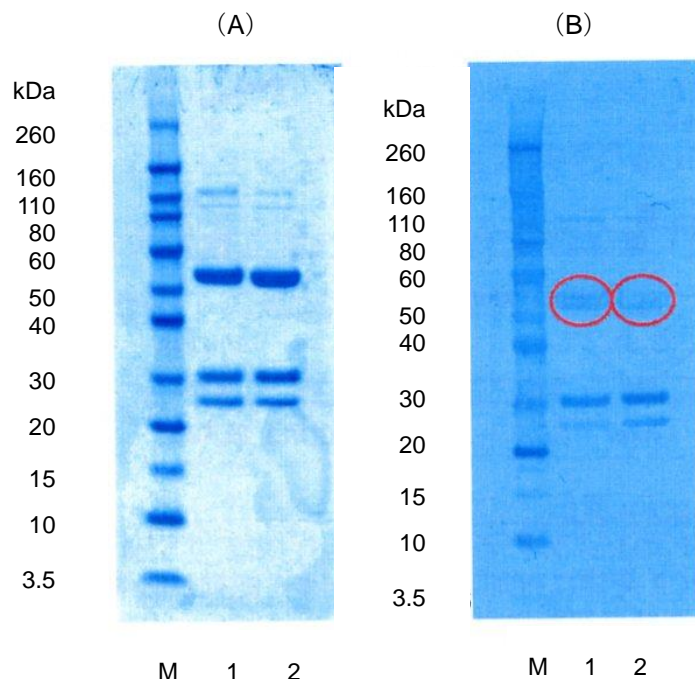


図 29. 抗 CT 抗体の SDS-PAGE

M : 分子量マーカー 1 : Ab-CT#24 2 : Ab-CT#45

(A) クマシーブリリアントブルーによる染色。

(B) 泳動したバンドを PVDF 膜に転写後、クマシーブリリアントブルーにて染色。  
目的のバンド（赤い丸印）をエドマン分解に付して N 末端のアミノ酸配列を分析した。

### 3-3 項 野生型 *scFv* 遺伝子の作製

前項でクローニングした  $V_H$  遺伝子と  $V_L$  遺伝子を第 2 節と同様に overlap extension PCR によりリンカーペプチド (GGGGS)<sub>3</sub> をコードする塩基配列を介して連結し、*CT-scFv-wt* 遺伝子を構築した。このとき、3'末端に FLAG タグ (DYKDDDDK)<sup>80)</sup> をコードする塩基配列を付加した。得られた *CT-scFv-wt* 遺伝子を pEXmide 5 にサブクローニングし、大腸菌 XL1-Blue 細胞へ導入した。得られた形質転換菌を IPTG とスクロースの存在下で培養し、浸透圧ショック法に付すことで、野生型 CT の可溶型 *scFv* (*CT-scFv-wt*) をペリプラズム抽出物として得た。本 *scFv* の性状については、3-5 項に記す。

### 3-4 項 scFv の試験管内親和性成熟

抗体の試験管内親和性成熟を図るために、前節と同様に error-prone PCR を用いて、抗体可変部にランダム変異を導入し、変異 scFv ライブラリーを構築した。

まず、添加する  $\text{Mn}^{2+}$  イオンを 0 または 0.50 mmol/L として（変異の導入頻度をコントロールするため）、先に得られた CT-scFv-wt 遺伝子を鋳型とする error-prone PCR を行い、変異  $V_H$ 、 $V_L$  各 DNA 断片のライブラリーを調製した。ただし、dNTP 混合物の濃度の偏りについては、dATP を dCTP、dGTP、dTTP の 1/5 に減じた条件のみとした。同じ条件で得られた変異  $V_H$ 、 $V_L$  遺伝子を 5'- $V_H$ -linker- $V_L$ -FLAG-3' となるように overlap extension PCR に付し、得られた変異 scFv 遺伝子を pEXmide 5 ベクターにサブクローニングし、電気穿孔法により大腸菌 XL1-Blue 細胞へ導入した。得られた変異 scFv ライブラリーをファージ提示したのち、パンニングに付し、CT に対する結合能を保持するファージを選択した。すなわち、ファージを CT-BSA を固定化したチューブに加えて、提示された scFv と CT の抗原抗体反応を 4°C、24~72 時間の条件で行ったのち、非特異的に結合したファージおよび結合力の弱いファージを洗浄除去した。チューブに CT 標準品を添加し、固相に強く結合したファージを競合的に捕捉することで回収した。得られたファージを対数増殖期まで培養した XL1-Blue 細胞に感染させ、その感染菌に VCSM13 ヘルパーファージを感染させてファージを複製し、次のパンニングに用いた。これを 1 サイクルとして、計 3 サイクルのパンニングを、回収の条件を徐々に厳しくしつつ繰り返した。3 サイクル目のパンニングののちに回収されたファージの感染菌をクローン化して 176 種のモノクローナルファージを調製し、CT-BSA 固定化マイクロプレートを用いる競合 ELISA によりその CT 結合能を評価したところ、3 種の強い陽性シグナルを示すモノクローナルファージ（#m1-17、#m1-54、#m1-106）を得た。これらファージが提示している scFv の性質について、野生型の CT-scFv-wt のそれとともに、次項で詳述する。

### 3-5 項 野生型および変異 scFv の諸性質

#### ① ELISA におけるアッセイ感度

まず、これら scFv を用いて CT の競合 ELISA を行い、その感度を Ab-CT#45 に由来する CT-scFv-wt を用いた場合のそれと比較した。一般に、用いる抗体（あるいは抗体フラグメント）の標的抗原に対する親和力が大きいほど、アッセイ感度は高くなる。ELISA には、CT-BSA を固定化した 96 ウェルマイクロプレートを用い、競合反応は、37℃（60 分）、もしくは 4℃（240 分）の条件で行った（図 30）。scFv の添加量は、CT の添加量が 0 の場合（B<sub>0</sub> 反応）に、30 分の酵素反応で吸光度が 1.0～1.5 を示すように調整した。また、非特異的吸着は B<sub>0</sub> のシグナルが 5% 以下になるように調整した。

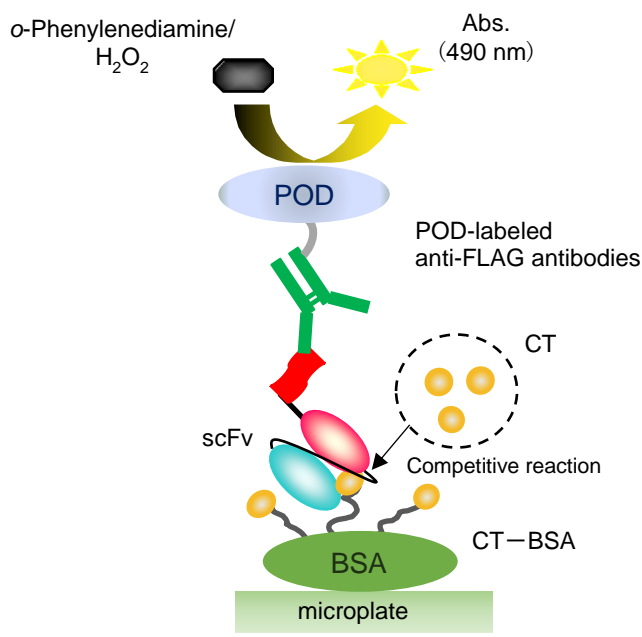


図 30. 抗 CT 抗体 scFv を用いた ELISA

CT-scFv-wt の用量作用曲線を図 31 に示す。アッセイ感度の指標になる midpoint は、37℃の条件では 114 ng/assay であったが、4℃では 33 ng/assay と、大幅に低い値が得られた。3 種の変異 scFv を用いた場合、midpoint は CT-scFv-wt の ELISA に比べて 37℃では 21～38 倍小さく、4℃ではさらにその 7.5～11 倍小さい値であった。このなかで、CT-scFv#m1-54 は最も高感度な用量作用曲

線を与えた。4℃における midpoint は 0.32 ng/assay であり、同条件における CT-scFv-wt による ELISA (33 ng/assay) よりも 100 倍高感度であった。

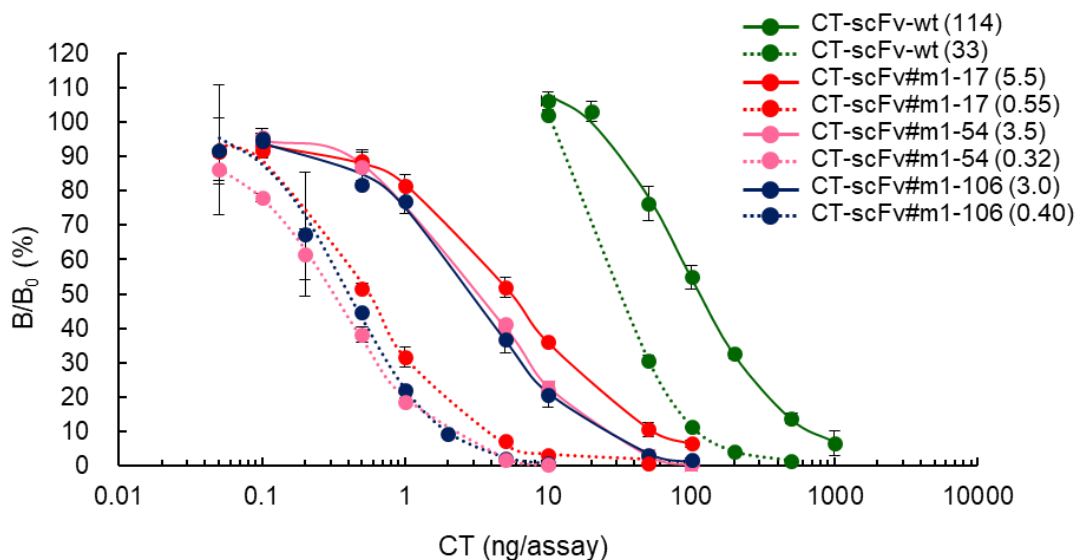


図 31. 抗 CT 抗体 scFv を用いた ELISA における CT の用量作用曲線

実線はそれぞれ 37℃ (60 分) での ELISA、破線は 4℃ (240 分) の ELISA により求めた用量作用曲線。カッコ内は midpoint (ng/assay) を示す。エラーバーは、4 重測定における標準偏差 SD を示す。

## ② ELISA における特異性

野生型および変異 scFv の CT 類縁化合物 9 種 (図 19) との交差反応性を第 1 章第 4 節 4-4 項に記した由来するマウス抗体 Ab-CT#45 の値とともに表 6 に示す。CT-scFv-wt は、全般に、Ab-CT#45 とほぼ同様の交差反応性パターンを示し、scFv 化に伴う大幅な特異性の変化は認められなかった。例えば、3'-OH-CT に対して無視できない交差反応性 (7.7%; マウス抗体では 8.4%) が認められた。しかし、(R)-CT との交差反応性 (2.6%) は Ab-CT#45 (5.0%) に比べてほぼ半減し、注目される。3 種の変異 scFv の交差反応性パターンは、いずれも CT-scFv-wt と似ていたが、3'-OH-CT との交差反応性 (20~35%) は明らかに増大していた。なかでも scFv#m1-54 は、CT-scFv-wt に比べて 4.5 倍大きな値 (35%) を示

し、試料中に共存する 3'-OH-CT による overestimation (Ab-CT#45 の場合は問題とならなかった;第 1 章第 4 節 4-5 項)に留意する必要があるかと思われた。代謝物である 3'-OH-CT は、尿中において総ニコチン代謝物の約 30%を占め、CT の約 3 倍量含まれているとされている。<sup>87)</sup> それゆえ、CT とこの代謝物を同時に測定することで、タバコ煙曝露量をより高感度に評価することができると期待される。先述のように (第 1 章第 4 節 4-5 項)、「免疫反応性 CT (CT、3'-OH-CT、3'-OH-CT *O*-glucuronide を含む) を測定する」ELISA キットも市場に流通していることから、受動喫煙レベルを評価するうえで障害にはならないものと考えられる。

表 6. 野生型および変異抗 CT-scFv の ELISA における交差反応性

Compound	Cross-reactivity (%)				
	Ab-CT#45	CT-scFv-wt	CT-scFv #m1-17	CT-scFv #m1-54	CT-scFv #m1-106
CT	100	100	100	100	100
Nicotine	0.2	0.3	<0.4	0.8	0.5
3'-OH-CT	8.4	7.7	20	35	34
3'-OH-CT <i>O</i> -glucuronide	0.6	1.2	0.4	<0.8	1.0
CT <i>N</i> -glucuronide	<0.1	0.08	0.4	0.06	0.03
CT <i>N</i> -oxide	0.05	0.1	0.1	0.02	0.02
( <i>R,S</i> )-Norcotinine	1.5	1.1	1.3	0.6	0.5
( <i>R</i> )-CT	5.0	2.6	4.0	1.7	5.9
Nicotinic acid	<0.001	<0.006	<0.001	<0.001	<0.001
Nicotinamide	0.007	0.006	0.002	<0.001	<0.001

### ③ scFv の分子構造

得られた 3 種の変異 scFv の一次構造の模式図を図 32 に示す。変異 scFv、#m1-17、#m1-54、#m1-106 は、野生型の scFv-wt に対して、それぞれ 4 カ所、5 カ所、5 カ所のアミノ酸が置換された産物と推定される。すべての変異体について、V<sub>H</sub>-CDR2 の N 末端である V<sub>H</sub>50 番目のアミノ酸が、チロシン (Y) から

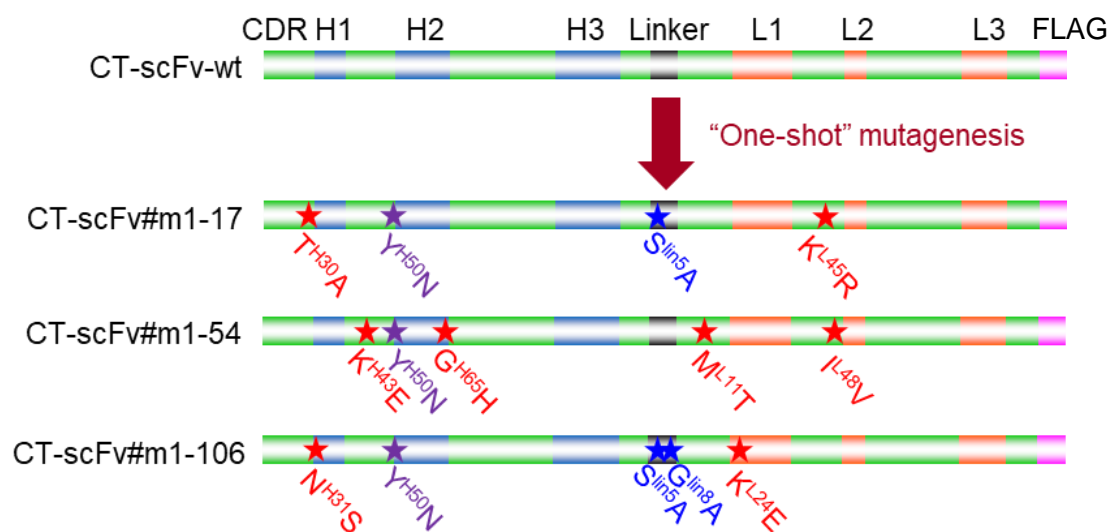


図 32. CT-scFv-wt と変異 CT-scFv の一次構造

★は野生型 scFv (CT-scFv-wt) からのアミノ酸置換を示す。

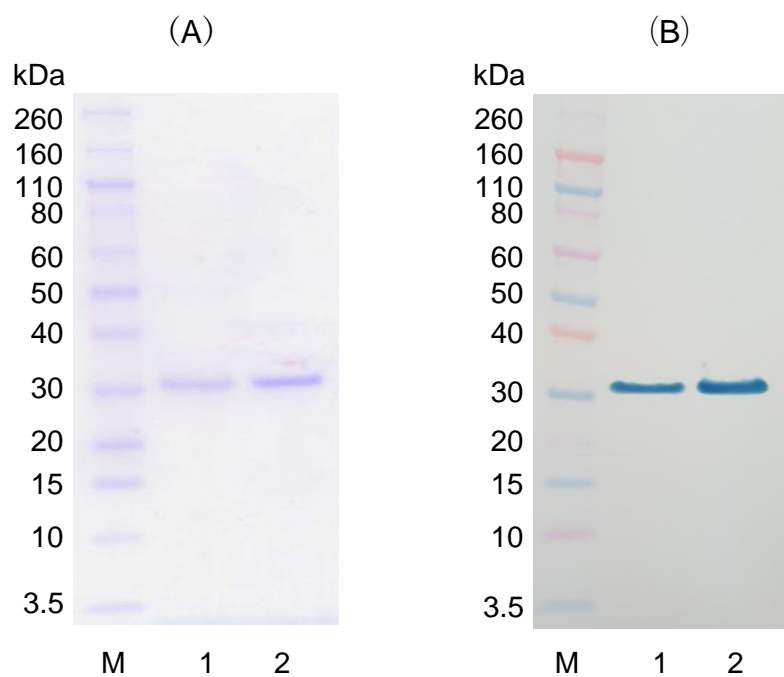


図 33. 可溶性 scFv の SDS-PAGE とウェスタンブロッティング

M : 分子量マーカー 1 : CT-scFv-wt 2 : CT-scFv#m1-54

(A) クマシーブリリアントブルーによる染色。

(B) イムノブロッティングによる検出。

アスパラギン (N) に置換されていたことは興味深く、これが親和力の向上に必須の置換である可能性が示唆される。

3 種の変異 scFv のうち ELISA において最も高感度な用量作用曲線を与えた CT-scFv#m1-54 について、CT-scFv-wt とともに SDS-PAGE に付したところ、それぞれの理論上の分子量 27,255 と 27,208 に近い位置に単一のバンドが認められた (図 33)。また、そのアミノ酸配列に基づき、SWISS MODEL Protein Modeling Server<sup>84)</sup> を活用して立体構造のモデリングを行い、さらに SWISSDOCK<sup>85)</sup> により CT とのドッキングモデルを作成したところ (図 34)、CT に直接接触している scFv#m1-54 のアミノ酸は 10 以下であることが示唆された。抗ハプテン抗体では、V<sub>H</sub> では平均 10 残基、V<sub>L</sub> では平均 7 残基のアミノ酸が抗原と接触しているとの報告があるが、<sup>88)</sup> これに比べると非常に少なく、CT の分子サイズの小ささを反映した、そして親和力の高い抗 CT 抗体を作製することが難しいことと符合する観察結果と言えよう。導入された 5 つのアミノ酸のうち、CT 分子と直接接触しているのは、前述の V<sub>H</sub>50 番目のアスパラギンだけであった。さら

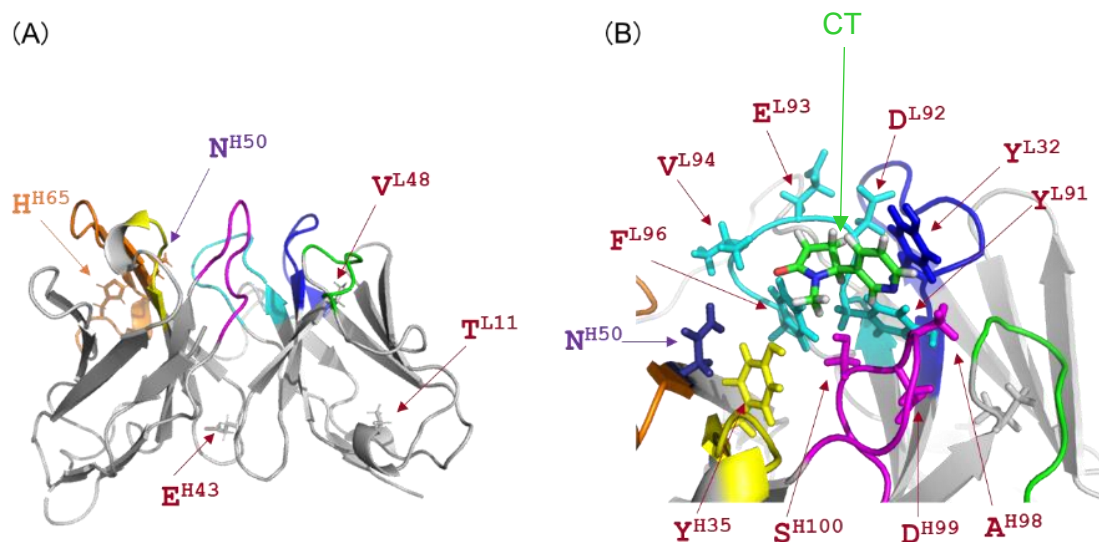


図 34. CT-scFv#m1-54 の立体構造モデリング (A) および CT とのドッキングモデル (B)

V<sub>H</sub>-CDR1 は黄色、V<sub>H</sub>-CDR2 はオレンジ、V<sub>H</sub>-CDR3 はマゼンタ、V<sub>L</sub>-CDR1 は青、V<sub>L</sub>-CDR2 は緑、V<sub>L</sub>-CDR3 は水色で示す。主に FR から構成される β-シート構造を太い矢印で示す。

(A) 親和性成熟により導入されたアミノ酸。

(B) 捕捉された CT の周囲に存在する可能性が高いアミノ酸。

にこの置換は、V<sub>H</sub>-CDR2 の C 末端（65 番目）におけるグリシン（G）からヒスチジン（H）への置換とともに、V<sub>H</sub>-CDR2 の空間配置を変化させる可能性があるものと考えられる。ハプテンに対する抗体において、パラトープを形成するうえで、V<sub>H</sub>-CDR2 が V<sub>L</sub>-CDR1 とともに特に重要な役割を担うことが報告されている<sup>89)</sup> ことを考慮すると、つじつまの合う考察と言えよう。

#### ④ 抗原結合能パラメータ

CT-scFv-wt と CT-scFv#m1-54 について表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance ; SPR）分析を行い、CT に対する親和力のパラメータ（CT-BSA 固定化センサーチップ上の CT 基に対する各 scFv の  $k_a$  および  $k_d$ ）を測定した（表 7）。どちらの scFv も 4℃においてより大きな  $K_a$  値を示し、特に CT-scFv#m1-54 では、50 倍以上も高い値となった。これは、 $k_a$  値の変化よりも、 $k_d$  値の変化による影響が大きい。例えば、CT-scFv#m1-54 では、4℃において、 $k_a$  値の減少が 30 倍にとどまっているのに比して  $k_d$  値は 1,700 倍以上も小さくなっていた。これは、本研究のパンニング条件（低温で長時間の抗原抗体反応を行っている）では、解離が遅い（ $k_d$  値が小さい）scFv 提示ファージが優先的に回収されると考えられることと符合する結果である。

より  $K_a$  値の高い抗体は、競合 ELISA において、より高感度な測定を可能にする。CT-scFv#m1-54 では、4℃において  $K_a$  値が CT-scFv-wt に比べて 40 倍以上

表 7. CT-scFv-wt および CT-scFv#m1-54 の抗原結合能パラメータ

scFv	Parameter	Temperature (°C)		Enhancement magnitude (4°C/37°C)
		37	4	
CT-scFv-wt	$K_a$ (L/mol)	$1.1 \times 10^7$	$2.7 \times 10^7$	2.5
	$k_a$ [L/(mol·s)]	$1.4 \times 10^4$	$1.6 \times 10^3$	$1.1 \times 10^{-1}$
	$k_d$ (1/s)	$1.2 \times 10^{-3}$	$6.0 \times 10^{-5}$	$5.0 \times 10^{-2}$
CT-scFv #m1-54	$K_a$ (L/mol)	$2.1 \times 10^7$	$1.2 \times 10^9$	57
	$k_a$ [L/(mol·s)]	$3.6 \times 10^4$	$1.2 \times 10^3$	$3.3 \times 10^{-2}$
	$k_d$ (1/s)	$1.7 \times 10^{-3}$	$9.6 \times 10^{-7}$	$5.6 \times 10^{-4}$

向上しているが、本 scFv を用いた ELISA は、前述のように 37℃より 4℃のインキュベーションでより高感度であり、この条件下で受動喫煙レベルの尿中 CT の測定が可能となった（次項で述べる）。一方、オンサイト分析では、より早い結果判定を実現するために、 $k_a$  値の大きな抗体を用いるのが有利である。こうした変異 scFv を作製するためには、高温で短時間の抗原抗体反応に基づくパンニングを採用する必要があるだろう。

### 3-6 項 改良型変異 scFv のヒト尿試料測定への応用

得られた 3 種の変異 scFv のうち、ELISA において最も感度のよい用量作用曲線を与え、3'-OH-CT と最も大きな交差反応性を示したことから（受動喫煙の評価にむしろ有用と考えられる）、CT-scFv#m1-54 を最も実用的な抗体フラグメントと評価した。そこで、この scFv を用いる ELISA について、尿試料測定条件の最適化を行った。

先にマウスモノクローナル抗体 Ab-CT#45 を用いて行った ELISA では、尿試料中の妨害物質の影響を抑えるためにブランク尿を添加することが必要であった（第 1 章第 4 節 4-5 項）。それゆえ、はじめに、ブランク尿存在下で用量作用

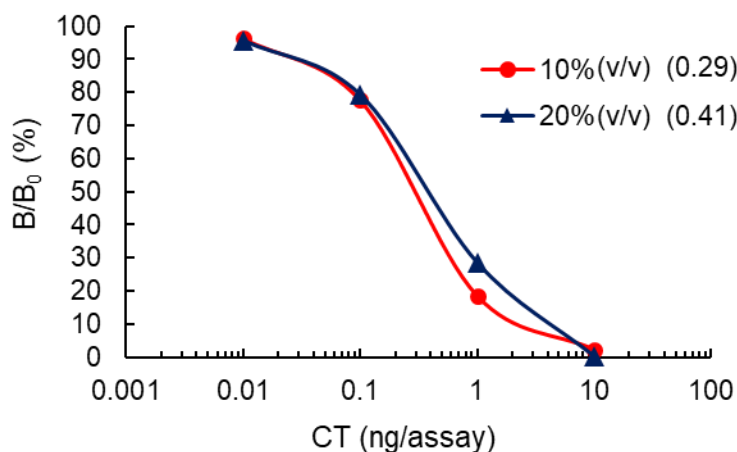


図 35. 異なるブランク尿添加濃度における CT-scFv#m1-54 を用いた ELISA における CT の用量作用曲線

カッコ内は midpoint (ng/assay) を示す。  
用量作用曲線の各点は、2 重測定の平均値である。

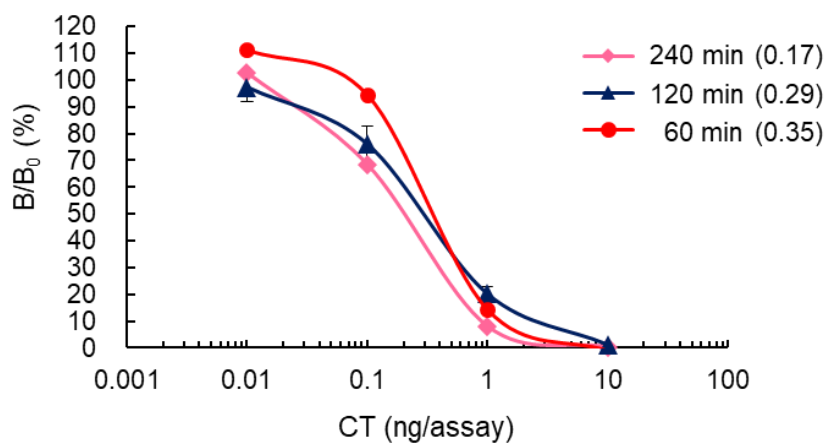


図 36. 異なるインキュベーション時間で得られた CT-scFv#m1-54 を用いた ELISA における CT の用量作用曲線

カッコ内は midpoint (ng/assay) を示す。  
用量作用曲線の各点は、2 重測定の前平均値である。

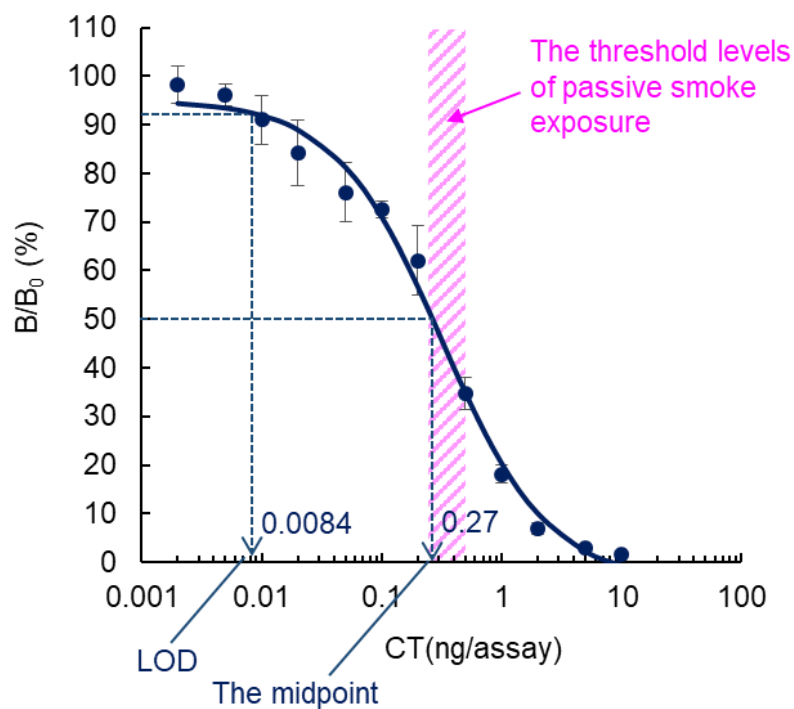


図 37. CT-scFv#m1-54 を用いた最適化条件下での ELISA における CT の用量作用曲線

エラーバーは、4 重測定における標準偏差 SD を示す。

曲線を作製した。競合反応を 10% もしくは 20% のブランク尿を添加した緩衝液中で行い、そのインキュベーション温度はより感度のよい 4℃ とした。ブランク尿の濃度の影響については、わずかながら 10% 添加の条件でより高感度な用量作用曲線が得られた (図 35)。インキュベーション時間については、120 分で十分な感度が得られることが示され (図 36)、この測定条件により、0.010~2.0 ng/assay の範囲で CT の測定が可能な用量作用曲線が得られた (図 37)。その midpoint は 0.27 ng/assay であり、由来するマウス抗体 Ab-CT#45 を用いた ELISA (midpoint 5.3 ng/assay) より、感度が著しく向上した。さらに、LOD は 8.4 pg/assay となり、受動喫煙における尿中 CT の下限濃度<sup>50)</sup> (5~10 ng/mL ; 尿試料を 5 倍希釈し、その 50 µL を ELISA に付すと、図 37 の斜線部分のゾーンに相当する) を測定することが十分に可能であった。

以上のように最適化した ELISA を用いて、ヒト尿試料中 CT を測定し、その実用性を評価した。試料には、同意を得た日本の健康な小学生 (男性 14 名、女性 24 名、9~10 歳) の随意尿を用いた。測定結果は、尿中 CT 測定用として市販されている ELISA キット (Cosmic Corporation) を用いて測定した値との比較

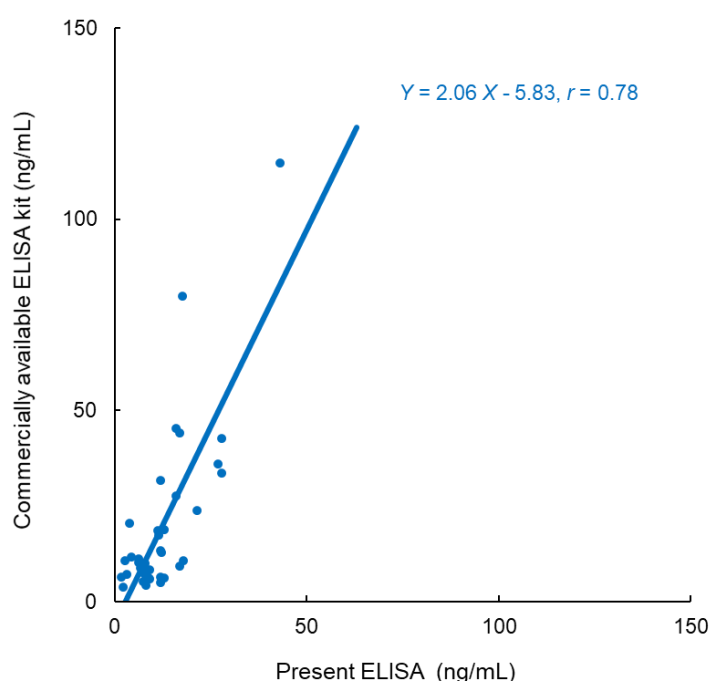


図 38. 最適化した ELISA と市販の ELISA キットによる尿試料中 CT 測定の比較

において相関 ( $r=0.78$ ) が認められた (図 38)。ここで用いた対照 ELISA は、先述の「免疫反応性 CT (CT、3'-OH-CT、3'-OH-CT *O*-glucuronide を含む) を測定する」(第 1 章第 4 節 4-5 項) ものである。著者らの ELISA は、対照法に比べ低い値を示す傾向が見られたが、これは、3'-OH-CT *O*-glucuronide の交差反応性が 0.8 % と低い (本抱合体による overestimation の程度が小さい) ことが主な理由であろう。

### 3-7 項 小括

本節では、新規に調製した CT に対するマウス抗体の  $V_H$  と  $V_L$  遺伝子をハイブリドーマ株からクローニングし、CT-scFv-wt ( $K_a$  値  $2.7 \times 10^7$  L/mol) を調製した。この野生型 scFv をもとに、試験管内親和性成熟により親和力が 40 倍以上も向上した変異 CT-scFv#m1-54 ( $K_a$  値  $1.2 \times 10^9$  L/mol) を創製することができた。この変異 CT-scFv#m1-54 を用いる ELISA は、CT-scFv-wt を用いた場合に比べ 100 倍以上も高感度な (midpoint の比較による) 用量作用曲線を与えた。また、ヒト尿試料中 CT を測定した結果は、尿中 CT 測定用として市販されている ELISA キットを用いて測定した値との比較において相関が認められ、十分に実用が可能と期待された。

## 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。まず、各抗体の  $V_H$  および  $V_L$  ドメインを連結して、遺伝子操作に適する野生型一本鎖 Fv フラグメント、scFv-wt を作製した。次いで scFv 遺伝子に error-prone PCR によりランダム点変異を導入し、試験管内親和性成熟（アフィニティマチュレーション）に取り組んだ。

抗 THC 抗体については、1段階の変異導入とファージ提示に基づく変異体の選択ののちに、THC-scFv-wt に比べて  $K_a$  値が 10 倍大きく ( $1.1 \times 10^8$  L/mol)、競合 ELISA において、midpoint の比較で約 3 倍高感度な用量作用曲線を与える変異体 THC-scFv#m1-36 を得た。この変異体を用いる ELISA は、被疑物質における THC のみならず、大麻使用者の尿中 THC 極性代謝物のモニタリングにも有用と期待された。

抗 CT 抗体についても、同様に 1段階の変異導入と変異体の選択により、野生型の CT-scFv-wt に比べて  $K_a$  値が 40 倍以上も大きく ( $1.2 \times 10^9$  L/mol)、競合 ELISA において midpoint の比較で 100 倍以上も高い感度を示す変異体 CT-scFv#m1-54 が得られた。本変異体による ELISA の検出限界値は 8.4 pg/assay であり、受動喫煙下限レベルの尿中 CT 量を十分に測定することが可能であった。遺伝子操作によるアプローチゆえに従来その作製が極めて困難であったモノクローナル抗 CT 抗体フラグメントが得られたことになり、特筆に値する成果と言えよう。

これまでに報告された試験管内親和性成熟の研究成果のうち、100 倍以上の  $K_a$  値の向上を達成しつつ、実用的な親和力 (pmol~fmol レベルの測定に求められる親和力、すなわち  $K_a > 10^9$  L/mol が目安と言えよう<sup>90)</sup>) を持つ変異抗体フラグメントを創出したものは 2 例に過ぎない。そのひとつは著者の研究室が発表したエストラジオール-17 $\beta$  に対する scFv に関する研究 (変異体の  $K_a$  値が  $1.3 \times 10^{10}$  L/mol で、野生型 scFv から 150 倍以上向上<sup>75)</sup>)、もうひとつは Boder らが発表したフルオレセイン誘導体に対する scFv に関する研究 (変異体の  $K_a$  値が

$2.1 \times 10^{13}$  L/mol で、野生型 scFv から約 2,600 倍  $K_a$  が向上<sup>91)</sup> で、後者はこの分野におけるチャンピオンデータとして知られる。しかし、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。本研究のように、わずか 1 段階の変異導入と選択で、しかも CT に対する scFv では、5 つのアミノ酸の変異のみで 40 倍以上もの  $K_a$  値向上が達成されており、価値ある成果と考えられる。

免疫測定法の感度が用いる抗体の標的抗原に対する親和力に支配されることは、理論的に示されている。<sup>90)</sup> しかし、抗原の分子量が小さくなるほど、高親和力抗体の調製は一般に困難になる。<sup>66)</sup> 実際、第 1 章で得られたマウス由来の天然型抗体は、抗 THC ( $M_r$  314.45)、抗 CT ( $M_r$  176.22) のいずれの抗体についてもその  $K_a$  値は  $10^9$  レベルに到達していない。しかし、動物を免疫する従来の抗体産生法では、より親和力の大きな抗体を意図的に作製することは難しい。こうした事情から、アッセイ感度を改善するために、標識抗原の検出方法の工夫<sup>7)</sup> や抗体と標識抗原のヘテロログスな組み合わせ<sup>92~94)</sup> などが試行錯誤的に試みられてきたが、必ずしも期待するような効果は得られない。

以上の状況を考慮すれば、本章の研究成果は、遺伝子操作によるアプローチが免疫測定法の高感度化を図るうえで抜本的な方策であることを実証したものと言える。今後の課題は、scFv 分子における親和力向上に有効な変異の導入位置や変異パターンの予測性の向上であろう。ランダム変異 scFv ライブラリーから改良型変異体を最速で探索するシステムの構築も切望されるところである。

## 結 論

抗原抗体反応に基づく分析法は、一般に高感度で特異性が高く、試料の測定に際して前処理を必要としないことが多い。このため、簡便性、迅速性にも優れ、多数の検体を扱うマススクリーニングや、現場での作業と結果判定が求められるオンサイト分析に、とりわけ適している。本研究では、規制薬物および診断あるいは環境バイオマーカーとなる低分子化合物について、簡便・迅速で高感度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の「分析試薬」である高性能抗体の作製を企てた。

タンパク質などの高分子抗原の場合、そのまま異種動物に非経口投与することで、その体内に抗体の産生を誘導することができる。これに対して本研究で分析対象とする低分子生理活性物質（その多くは、 $M_r < 1,000$ ）は、それ自体で免疫原性を持たない「ハプテン」であり、適切な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ことではじめて抗体が得られる。しかも、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。また、その分子サイズが小さいほど、得られる抗体の親和力は低下する傾向があり、その分子内に抗体との相互作用に有効な極性官能基が乏しい場合も高親和力抗体の作製は困難になる。このような事情で、ハプテンに対する抗体産生は高分子抗原の場合と比べて一般により困難で、配慮すべき点が多い。

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、現在、分析・診断用抗体作製の標準法といえる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。THC については、その化学修飾と必要量の入手が困難なため、市販の THC-BSA を免疫原として用いた。CT については著者らによる自作の CT-BSA 結合体を用い、KT については市販品と自作品の KT-BSA 結合体を併用した。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、実用性の観点から最も望ましい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 と KT については感度、特異性のいずれについても満

足のいくものであったが、CTについては、測定感度について改善すべき課題が残された。また、抗 THC 抗体は、実用的には十分とは言え、その  $K_a$  値が  $10^7$  L/mol レベルにとどまり、更なる改善が可能か、興味が持たれるところであった。

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（試験管内親和性成熟）を試みた。各抗体を野生型 scFv に変換したのち、その可変部に遺伝子レベルで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クローンを探索した。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（midpoint の比較による）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、midpoint 比較で約 100 倍と大幅な高感度化に成功し、受動喫煙レベルの尿中 CT の測定が可能となった。著者の所属する研究室では、エストラジオール- $17\beta$ <sup>74,75)</sup> とコルチゾール<sup>95)</sup> についても試験管内親和性成熟により親和力の向上した変異 scFv を作製し、ELISA の高感度化に成功している。これらの成果も考慮すると、遺伝子操作による抗体の親和力の改善は、免疫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が示された、と言えよう。同様の手法による抗体の特異性の改変も報告されており、この方面での今後の進展も期待されるところである。<sup>96)</sup>

本研究では、変異抗体を作製するうえで、プロトタイプとなるマウス抗体が存在することが前提条件となっている。バイオインフォマティクスの進歩にも後押しされて、分析試薬として実用的な抗体を生体の産物に依存せずに *de novo* デザインできる日もやがて訪れることだろう。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（フラグメント）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。

## 謝 辞

本研究の機会を与えていただき、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました本学生命分析化学研究室教授 小林典裕先生に心より感謝申し上げます。

本研究に際し、有益な御助言と御協力を賜りました本学生命分析化学研究室講師 大山浩之先生に深謝いたします。

本研究の論文作成に際し、貴重な御助言、御指導を賜りました本学医薬細胞生物学的研究室教授 土反伸和先生、同中央分析室准教授 竹内敦子先生、同薬理学的研究室准教授 八巻耕也先生に厚くお礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、多大な御協力を賜りました生命分析化学研究室 木口裕貴学士、番園恵理佳修士をはじめとする同研究室で研究生活を共にした大学院修了生および卒業生の皆様に感謝いたします。

本研究での合成化合物の分析につきまして、本学中央分析室准教授 竹内敦子先生、同講師 都出千里先生に多大のお力添えをいただき、感謝いたします。

第1章 第2節および第2章 第2節の研究において THC 関連化合物を御恵与くださいました九州大学薬学研究院教授 森元聡先生、同准教授 田中宏幸先生に感謝いたします。

第1章 第3節の研究において KT 関連化合物を御恵与くださいました九州大学歯学研究院教授 横山武志先生、同講師 林良憲先生に感謝いたします。また、有益な御助言を賜りました大阪府立大学大学院理学系研究科教授 豊田真弘先生に感謝いたします。

第1章 第5節および第2章 第3節の研究において、温かいご支援を賜りました本学病態生化学研究室前教授 太田光熙先生、同下駄祐子修士、國廣俊臣修士に感謝いたします。

私を研究の道に導き、温かく御指導くださいました小山淳子先生に感謝いたします。

最後に、長きにわたり様々な面で研究生活を支えてくれた家族と両親に深く感謝いたします。

## 実験の部

### 研究全般に関する項目

本研究に用いた主要な装置、ソフトウェア、器材・試薬など各種実験材料の形式、性状、購入先などについて、以下に一括する。動物実験は、神戸薬科大学動物実験実施規程を遵守し、動物に不必要な苦痛を与えぬよう十分に配慮して行った。また、組換え DNA 実験は神戸薬科大学組換え DNA 実験安全委員会の承認を得たのち、神戸薬科大学組換え DNA 実験安全管理規程および「遺伝子組換え生物等の使用の規制による生物多様性の確保に関する法律」を遵守して行った。

#### 1. 装置

- ・紫外可視部の吸光度測定（ハプテン/BSA 結合モル比の算出、タンパク質の定量、大腸菌密度の測定など）には、Ultrospec 2100 分光光度計（Amersham Bioscience）を用いた。
- ・PCR による DNA の増幅には、T100 Thermal Cycler（Bio-Rad）を用いた。
- ・DNA のアガロースゲル電気泳動には、i-Mupid-J 電気泳動ユニット（Advance）を用いた。
- ・抗体フラグメントの SDS-PAGE には、X cell SuperLock（Invitrogen）を用いた。またブロッティング分析におけるタンパク質の転写には、i Blot Gel Transfer System（Invitrogen）を用いた。
- ・大腸菌への電気穿孔法によるプラスミドの導入には、ECM630（BTX）を用いた。
- ・ELISA における POD または GAL 活性の測定（比色測定）には、iMARK マイクロプレートリーダー（Bio-Rad ; 490 または 405 nm で測定）を用いた。
- ・蛍光消光法による  $K_a$  の算出には、RF-5300PC 分光蛍光光度計（島津製作所）を用いた。

- ・ バイオレイヤー干渉法（BLI 法）による抗原抗体反応の速度定数と結合定数の測定には、タンパク質パーソナルアッセイシステム BLItz（Fortebio）を用いた。
- ・ 表面プラズモン共鳴法（SPR 法）による抗原抗体反応の速度定数と結合定数の測定には、Biacore T-200 SPR sensor（GE Healthcare）を用いた。
- ・ 抗体の精製には、タンパク質精製用液体クロマトグラフィーシステム ÄKTA（GE Healthcare）を用いた。

## 2. 器材

- ・ ELISA に用いた Costar 96 ウェルマイクロプレート（No.3590）は、Corning から購入した。
- ・ 抗体ライブラリーのパンニングに用いた Nunc イムノチューブ（70 mm×11 mm “Maxisorp” ポリスチレン試験管）は、Thermo Fisher Scientific から購入した。
- ・ 細胞培養に用いた滅菌済みディスポーザブルフラスコ、シャーレ、クラスターディッシュ、ピペット類は、Corning または Falcon から購入した。

## 3. ソフトウェア

- ・ PCR 用プライマーおよび化学合成 *scFv* 遺伝子の構築に用いた一本鎖オリゴ DNA の設計には、Oligo™ program version 4.0（National Bioscience）を用いた。
- ・ 抗体フラグメントの立体構造モデリングには、SWISS MODEL サーバー（<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>）<sup>84)</sup> を利用した。
- ・ *scFv* と複合体の構造を予測には、SWISSDOCK サーバー（<http://www.swissdock.ch>）<sup>85)</sup> を利用した。

## 4. 緩衝液

以下の略号で表記する各緩衝液の組成を示す。

- ・ PB : 50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>－Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.3)。

- PBS : 9.0 g/L NaCl を含む PB。
- PBS-2 : NaCl (137 mmol/L)、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10.0 mmol/L)、KCl (2.68 mmol/L)、および KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.76 mmol/L) の水溶液を 3 mol/L HCl で pH 7.4 に調整したもの。
- G-PBS : 1.0 g/L ゼラチンを含む PBS。
- G-PBS-2 : 1.0 g/L ゼラチンを含む PBS-2。
- PVG-PBS : 1.0 g/L ポリビニルアルコール (平均重合度 500) を含む G-PBS。
- T-PBS : 0.050% (v/v) の Tween 20 を含む PBS。
- T-PBS-2 : 0.010% (v/v) Tween 20 を含む PBS-2。
- M-PBS : 20 g/L スキムミルク (DIFCO) を含む PBS。
- M-PBS-2 : 20 g/L スキムミルク (DIFCO) を含む PBS-2。
- TAE [トリス-酢酸-エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid ; EDTA)] 緩衝液 : 22% tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)、5.5% 酢酸、1.7% EDTA 二ナトリウム二水和物を含む緩衝液 (50 倍濃縮 ; pH 8.3) (ナカライテスクから購入)。
- 浸透圧ショック用緩衝液 : スクロース (584 mmol/L) および EDTA (1 mmol/L) を含む Tris-HCl 緩衝液 (50 mmol/L ; pH 8.0)。
- PEG/NaCl : 200 g/L ポリエチレングリコールおよび 146 g/L NaCl を含む水溶液。
- PCI : フェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール = 25 : 24 : 1 溶液 (ナカライテスクから購入)。

## 5. 抗原とその類縁化合物

- THC、THCA、九州大学大学院薬学研究院から譲渡された。
- (R)-(-)-KT・HCl、(S)-(+)-KT・HCl は、九州大学大学院歯学研究院から譲渡された。
- THC-BSA、KT-BSA(a) は、GenWay Biotech から購入した。
- カンナビノール (CBN)、(±)-KT・HCl は、関税中央分析所から譲渡された。

- THC-COOH (1 mg/mL メタノール溶液)、THC-COOGlu (100 µg/mL メタノール溶液)、(±)-NKT•HCl (1 mg/mL メタノール溶液)、(±)-DNKT•HCl (100 µg/mL アセトニトリル溶液)、CT ラベル用誘導体 (*trans*-4'-cotininecarboxylic acid) は、Sigma-Aldrich から購入した。
- CT は和光純薬から購入した。
- (*R,S*)-norcotinine、ニコチン、CT *N*-glucuronide、CT *N*-oxide、3'-OH-CT *O*-glucuronide、(*R,S*)-norcotinine、3'-OH-CT、(*R*)-CT はいずれも Toronto Research Chemicals から購入した。
- ニコチンアミド、ニコチン酸は、ナカライテスクから購入した。

## 6. 抗体類および抗体関連試薬

- ヤギ抗マウス IgG 抗体（アフィニティー精製品）およびウサギ抗マウス IgG+IgM 抗体（アフィニティー精製品）は、Jackson ImmunoResearch から購入した。
- 抗 FLAG-M2 抗体および POD 標識抗 FLAG-M2 抗体は、Sigma-Aldrich から購入した。
- 抗 FLAG-M2 抗体結合アガロースゲルは、Sigma-Aldrich から購入した。
- POD 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体（Fc 特異的）および POD 標識ストレプトアビジンは、Jackson ImmunoResearch から購入した。
- POD 標識抗 M13 ファージ抗体は、GE Healthcare から購入した。

## 7. 抗体以外の免疫化学関連試薬

- フロイントの完全アジュバント (Freund's complete adjuvant ; FCA) および不完全アジュバント (Freund's incomplete adjuvant ; FIA) は、DIFCO から購入した。
- EZ-Link NHS-LC-Biotin、Amine-PEO<sub>3</sub>-biotin、1-step Ultra TMB Blotting solution は、Thermo Fisher Scientific から購入した。

## 8. 酵素類

- ・制限酵素類 : *Xma* I、*Sal* I、*Nco* I、*Sfi* I (各 10 U/mL) は、Roche Diagnostics または New England Biolabs から購入した。
- ・DNA ポリメラーゼ類 : *Ampli Taq* ポリメラーゼ (5 U/μL) は Roche Diagnostics から、*Ex Taq* ポリメラーゼ (5 U/μL) は TaKaRa Shuzo から、*KOD* ポリメラーゼ (2.5 U/μL) は TOYOBO からそれぞれ購入した。
- ・組換え DNA 実験に用いたその他の酵素 : Superscript II reverse transcriptase (200 U/μL) は Invitrogen から、T4 DNA ligase (400 U/μL) は New England Biolabs からそれぞれ購入した。
- ・GAL(for EIA) は、Roche Diagnostics から購入した。

## 9. 基質溶液

- ・POD 基質溶液 : 25 mmol/L クエン酸および 50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> の各水溶液を混合して pH 5.0 に調整した溶液 (25 mL) に *o*-phenylenediamine 塩酸塩 (10 mg) および 30% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 μL) を混合したものを用了。

## 10. その他の試薬・器材

- ・ゼラチン、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム (SDS)、アンピシリンナトリウム、硫酸カナマイシン、*o*-phenylenediamine 塩酸塩、*o*-nitrophenyl β-D-galactopyranoside、Tween 20、ポリビニルアルコール (重合度約 500)、IPTG、D-グルコースは、ナカライテスク社から購入した。
  - ・Block Ace およびブライクローンは、DS Pharma Biomedical から購入した。
  - ・ウシ血清アルブミン (BSA)、卵白アルブミン (OVA)、およびポリエチレングリコール8,000は、Sigma-Aldrich から購入した。
  - ・Supelpak2 は SUPELCO から購入した。
  - ・プロテイン G カラムおよび PD-10 カラムは、GE Healthcare から購入した。
- その他の生化学用試薬、分子生物学用試薬ならびに有機合成用試薬は、試薬特級を用了。

## 11. 細胞、大腸菌およびファージ用培地

### A) マウス細胞用培地

- ・基本培地：1% (v/v) 1 mol/L 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)-NaOH 緩衝液 (pH 7.3) および 100 mmol/L カナマイシン硫酸塩を含む RPMI-1640。
- ・ハイブリドーマ用培地：10% (v/v) ウシ胎児血清、50 mmol/L 2-メルカプトエタノール、2.0 mmol/L L-グルタミン、および 1.0 mmol/L ピルビン酸ナトリウムを含む基本培地。
- ・Hypoxanthine-thymidine (HT) 培地：0.10 mmol/L ヒポキサンチンおよび 16  $\mu$ mol/L チミジンを含むハイブリドーマ用培地。
- ・HAT 培地：0.40  $\mu$ mol/L アミノプリテンを含む HT 培地。

なお、RPMI-1640 液体培地およびウシ胎児血清は GIBCO から、HAT 培地サプリメントおよび HT 培地サプリメントは Sigma-Aldrich から、それぞれ購入した。

### B) 大腸菌用培地

- ・2×YT 培地：16 g/L Bacto tryptone、10 g/L Bacto yeast extract、および 5.0 g/L NaCl の水溶液を 5 mol/L NaOH で pH 7.0 に調整したもの。
- ・2×YT-AG(1%) 培地：100 mg/L アンピシリンナトリウムおよび 10 g/L D-グルコースを含む 2×YT 培地。
- ・2×YT-AK 培地：100 mg/L アンピシリンナトリウムおよび 50 mg/L カナマイシン硫酸塩を含む 2×YT 培地。
- ・2×YT-ATG(1%) 培地：100 mg/L アンピシリンナトリウム、10 mg/L テトラサイクリン塩酸塩、および 10 g/L D-グルコースを含む 2×YT 培地。
- ・2×YT-ATG(2%) 培地：100 mg/L アンピシリンナトリウム、10 mg/L テトラサイクリン塩酸塩、および 20 g/L D-グルコースを含む 2×YT 培地。
- ・SOB(-) 培地：20 g/L Bacto tryptone、5.0 g/L Bacto yeast extract、0.5 g/L NaCl、および 0.186 g/L KCl の水溶液を 5 mol/L NaOH で pH 7.0 に調整したもの。
- ・SOC 培地：5.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、5.0 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、および 20 mmol/L D-グルコースを SOB(-) 培地に混合したもの。

- ・タンパク質発現誘導用培地：0.40 mol/L スクロース、0.10 mmol/L IPTG、および 100 mg/L アンピシリンナトリウムを含む 2×YT 培地。

## 12. 細胞とファージ

- ・P3/NS1/1-Ag4-1 (NS1) ミエローマ細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手した。
- ・大腸菌 XL1-Blue 細胞および VCSM13 ヘルパーファージは、Stratagene から購入した。
- ・大腸菌 XL1-Blue エレクトロコンピテント細胞は、Stratagene から購入、または常法<sup>97)</sup>に従って調製した。

## 13. ベクターDNA

- ・pBluescript II は、Invitrogen から購入した。
- ・pEXmide 5 は、Eskil Söderlind 博士（スウェーデン Avena Partners AB）、Carl A. K. Borrebaeck 博士（スウェーデン Lund 大学）から供与されたものを用いた。

## 14. プライマー

PCR および DNA の塩基配列の決定に用いたプライマーは、つくばオリゴサービスで化学合成され、逆相カートリッジ精製品または HPLC 精製品として供与されたものを用いた。本研究で用いたプライマーの略号と塩基配列を以下に示す。アンダーラインは増幅産物のクローニングに用いた制限酵素認識配列を、( ) 内は対応する制限酵素を示す。

- ・oligo dT : 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
- ・MHV-4 : 5'-ACTAGTCGACATGRAC<sup>(Sal I)</sup>TTTGGGYTCCAGCTTGRTTT-3'
- ・my1-GSP : 5'-GCTGGCCCGGGTGGGCAAC-3' (*Xma I*)
- ・AAP : 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3'
- ・MKC : 5'-GGATCCCGGGTGGATGGTGGGAAGATG-3' (*Xma I*)

- AUAP : 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (*Sal* I)
- mk-GSP : 5'-ATTTTGTCTGTTCACTGCC-3'
- KS-reverse : 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'
- KS-forward : 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
- THC#33V<sub>H</sub>-Rev : 5'-ATTGTTATTACTCGCGGCCCAACCGGCCATGGCCGAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGG-3' (*Nco* I)
- THC#33V<sub>H</sub>-For : 5'-CCGCCGGATCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACC TGAAGAGACTGTGAGAGTGGTG-3'
- THC#33V<sub>L</sub>-Rev : 5'-CAGGCGGAGGTGGATCCGGCGGTGGCGGATCGGA CATCCAGATGACTCAGTCTC-3'
- THC#33V<sub>L</sub>-For : 5'-GATTTGGGCTCAACTTTCTTGTCGACTTTATCATCA TCATCTTTATAATCAGCCCGTTTCAGCTCCAGCTTG-3' (*Sal* I)
- THC#33V<sub>L</sub>-For-2 : 5'-GATTTGGGCTCAACTTTCTTGTCGACTTATTATTTA TCATCATCTTTATAATC-3' (*Sal* I)
- VHH-cPCR back : 5'-ATTGTTATTACTCGCGGCCCA-3'
- VHH-cPCR forward : 5'-GATTTGGGCTCAACTTTCTTGT-3'
- CT-5 (dg) -Sfi I : 5'-ATTGTTATTACTCGCGGCCCAACCGGCCATGGCCGA-3' (*Sfi* I)
- Gamma1-Sal I : 5'-GATTTGGGCTCAACTTTCTTGTCGACTTTCCAGTGGA -3' (*Sal* I)
- MKV-4 : 5'-ACTAGTCGACATGAGGGCCCCTGCTCAGTTTTTTGGCTTG- (*Sal* I)
- CT-k-CL-Sal I : 5'-GATTTGGGCTCAACTTTCTTGTCGACTTGGATGGTGGG AAGATG-3' (*Sal* I)
- CT-V<sub>L</sub>-Nco I : 5'-ATTGTTATTACTCGCGGCCCAACCGGCCATGGCCGAC GTCAAGTTGACCCAGTCTCCAT-3' (*Nco* I)
- CT#45V<sub>H</sub>-Rev : 5'- ATTGTTATTACTCGCGGCCCAACCGGCCATGGCCGA AATTCAATTGCAGCAGTCTGGAC-3' (*Sfi* I)
- CT#45V<sub>H</sub>-For : 5'-CCGCCGGATCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTG

AGGAGACGGTGACTGAGGTTCC-3'

- CT#45V<sub>L</sub>-Rev : 5'-GCGGAGGTGGATCCGGCGGTGGCGGATCGGACGTC  
AAGTTGACCCAGTCTCC-3'
- CT#45V<sub>L</sub>-For : 5'-GATTTGGGCTCAACTTTCTTGTCGACTTTTATCATCATC  
ATCTTTATAATCAGCCCGTTTTATTTCACCTTGG-3' (*Sal* I)
- CT#45V<sub>L</sub>-For-stop : 5'-GATTTGGGCTCAACTTTCTTGTCGACTTATTATTTA  
TCATCATCATCTTTATAATCAGCCCGTTTTATTTCACCTTGG-3' (*Sal* I)

## 15. キット類

- アイソタイピングキット (ImmunoPure Monoclonal Antibody Isotyping Kit II) は、Thermo Scientific から購入した。
- Fab フラグメント調製キット (Pierce Fab Preparation Kit II) は、Thermo Scientific から購入した。
- RNA 抽出キット (RNeasy mini kit) は、Qiagen から購入した。
- 5'-RACE キット (5'-RACE system for rapid amplification of cDNA ends, version2.0) は、Invitrogen から購入した。
- DNA 精製カートリッジ (S.N.A.P Gel Purification Kit) は Invitrogen から購入した。
- プラスミド DNA 抽出キット (QIAGEN plasmid mini kit) は、Qiagen から購入した。
- DNA 精製キット (A) (Wizard PCR preps DNA purification system) および DNA 精製キット (B) (Wizard SV gel and PCR clean-up system) は、Promega から購入した。
- タンパク定量用キット (プロテインアッセイ Lowry キット) は、ナカライテスクから購入した。

## 16. 電気泳動用ゲルと泳動条件

- 目的 DNA の確認や鎖長の分析を目的とする通常の電気泳動には、Invitrogen 製のアガロースゲルを用い、TAE 緩衝液中、100 V で泳動を行った。

- ・DNA 断片およびプラスミドの精製を目的とする電気泳動には Lonza 製の低融点アガロースゲル (Sea plaque) を用い、TAE 緩衝液中、50 V で泳動を行った。

## 17. 実験動物

- ・抗 THC 抗体、抗 KT 抗体、抗 CT 抗体の作製に際して免疫動物として用いた BALB/c マウス、A/J マウスは日本 SLC から入手した。

## 18. 依頼分析

- ・ $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ - NMR スペクトル分析 (500 および 600 MHz) ならびに質量 (MS) 分析は、神戸薬科大学中央分析室に依頼した。
- ・DNA 塩基配列の解析は、Takara Bio に依頼した。

# 第 1 章 付属実験

## 第 2 節 付属実験

### 2-1 項 抗 THC 抗体産生ハイブリドーマ株の樹立

THC-BSA の生理食塩水溶液 (0.25 mg/mL) を等体積の FCA もしくは FIA と混合してエマルジョンとしたのち、BALB/c マウス (雌、8 週齢、5 匹) の背中と足蹠に皮下投与 (1 個体あたり計 0.2 mL) した。2 週間間隔で 3 回の追加免疫を行い、その 7 日後に、各マウスから試験採血 (眼静脈採血) を行い、血清中の THC に対する抗体価を下記の ELISA で調べた。その結果、良好な結果を示した 2 匹に最終免疫 [免疫原約 25  $\mu\text{g}$  を含む生理食塩水溶液 (約 0.5 mL) を脾臓内と腹腔内に分けて投与] を行った。その 3 日後、脾臓を摘出して脾細胞 (約  $4 \times 10^8$  個) を調製し、ポリ-L-アルギニン塩酸塩 (10 mg/L) および 10% (v/v) ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide ; DMSO) を含むポリエチレングリコール 4,000 (400 g/L) を融合剤として、NS1 ミエローマ細胞 (約  $8 \times 10^7$  個)

と融合させた。融合後の細胞を 10% (v/v) ブライクローンを含む HAT 培地に懸濁して 96 ウェルクラスターディッシュで約 2 週間培養 (37°C、5% CO<sub>2</sub>-95% 空気) し、融合細胞 (ハイブリドーマ) を選択した。ハイブリドーマの増殖が確認されたマイクロウェルの上清を、下記の ELISA に付して、抗体分泌陽性の細胞の 1 次スクリーニングを行った。陽性の細胞を 24 ウェルクラスターディッシュで拡大培養し、7 日後に同じ ELISA 法で 2 次スクリーニングを行い、安定な抗体産生細胞を選択した。これらを HT 培地でさらに拡大培養したのち、限界希釈法によるクローニングに付して、<sup>98)</sup> 抗体産生ハイブリドーマ株を樹立した。

## 2-2 項 モノクローナル抗 THC 抗体の調製

上記のハイブリドーマをハイブリドーマ用培地中で飽和細胞密度 (コンフルエント) まで培養し、遠心 (500 rpm、5 分、室温) したのち、その上清をモノクローナル抗体溶液として ELISA に用いた。

## 2-3 項 THC-BSA 免疫マウス血清および培養上清中抗 THC 抗体の ELISA による検出

96 ウェル ELISA 用プレートに、THC-BSA の 0.10 mol/L 炭酸緩衝溶液 (pH 8.6、0.50 µg/mL) を分注 (100 µL/ウェル) して、室温で一夜放置した。溶液を吸引除去してプレートを PBS で 3 回洗浄し、M-PBS を分注 (300 µL/ウェル) して、37°C で 1 時間放置した。溶液を吸引除去してプレートを T-PBS で 3 回洗浄し、抗原固定化プレートを得た。このプレートに G-PBS で希釈した免疫マウスの血清もしくはハイブリドーマ培養上清を添加 (100 µL/ウェル) し、37°C で 1 時間反応させた。溶液を吸引除去してプレートを T-PBS で 3 回洗浄し、G-PBS で希釈調製した POD 標識ヤギ抗マウス IgG (Fc 特異的) 抗体 (16 ng/100 µL/ウェル) を添加し、37°C で 30 分間反応させた。再びプレートを同条件で洗浄し、POD 基質溶液を分注 (100 µL/ウェル) し、室温で 30 分間反応させた。酵素反応停止液 (1.0 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、100 µL/ウェル) を加えて混和したのち、490 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

#### 2-4 項 モノクローナル抗 THC 抗体のアイソタイプ決定

上記のアイソタイピングキットを用い、添付の説明書に従い操作を行った。

#### 2-5 項 モノクローナル抗 THC 抗体 Fab フラグメントの調製

2-2 項で得られたハイブリドーマ上清を上記のプロテイン G カラムに付した。得られた IgG 画分を上記の Fab フラグメント調製キットを用いて処理し、目的の Fab フラグメント (Fab-THC#33) を調製した。

#### 2-6 項 BLI 法による抗原抗体反応の速度定数と結合定数の測定

ストレプトアビジン固定化バイオセンサーチップ (forteBIO より購入) に自作したビオチン標識 THC-BSA を飽和させたのち、PVG-PBS で希釈した Fab 溶液 (Fab-THC#33 ; 10、20、50、100 nmol/L ; 4.0  $\mu$ L) を反応させ、25°C におけるセンサーチップ上の THC 基に対する  $k_a$ 、 $k_d$ 、および  $K_a (=k_a/k_d)$  を、BLItz を用いて算出した。なお、ビオチン標識 THC-BSA は、PBS 1 mL に溶かした THC-BSA (100  $\mu$ g) に EZ-Link NHS-LC-Biotin (34  $\mu$ g) を加え、室温で 1 時間攪拌したのち 1 夜透析して調製した。

#### 2-7 項 モノクローナル抗 THC 抗体の ELISA における諸性質の検討

##### ① 用量作用曲線の作成

THC-BSA の 0.10 mol/L 炭酸緩衝溶液 (pH8.6 ; 0.50  $\mu$ g/mL) を ELISA 用 96 ウェルマイクロプレートに分注 (100  $\mu$ L/ウェル) し、室温で一夜放置した。その溶液を吸引除去したのち、2-3 項に準じてプレートのブロッキングを行い、抗原固定化プレートを得た。このプレートに G-PBS で希釈したハイブリドーマ培養上清 (100  $\mu$ L/ウェル) および各種濃度の THC 標準品を含む 50%エタノール溶液 (25.0  $\mu$ L/ウェル) を添加して混和し、37°C で 1 時間放置した。溶液を吸引除去してプレートを T-PBS で 3 回洗浄したのち、G-PBS で希釈調製した POD 標識ヤギ抗マウス IgG (Fc 特異的) 抗体 (16 ng/100  $\mu$ L/ウェル) を添加し、37°C で 30 分間反応させた。再びプレートを同条件で洗浄し、ウェル上の POD 活性を 2-3 項に準じて測定した。なお、THC 標準品の各濃度における反応は 2 ウェ

ル（2重測定）で行い、その平均値を用いてデータ処理を行った。

## ② 交差反応試験

前項の実験において、THC 標準品の代わりに各種 THC 類縁化合物の標準品を添加して用量作用曲線を作成し、THC 標準品を添加しない場合の酵素活性に対して 50%の酵素活性を示す（すなわち 50%阻害を示す）THC 類縁化合物の質量（X）を求めた。各 THC 類縁化合物の交差反応性は、これら質量（X）の、50%阻害に要する THC の質量（Y）に対する百分率  $[(Y/X) \times 100 (\%)]$  として算出した。なお、THC 標準品および類縁化合物の各濃度における反応は 2 ウェル（2重測定）で行い、その平均値を用いてデータ処理を行った。

## 第 3 節 付属実験

### 3-1 項 ハプテン誘導体の合成

(±)-KT·HCl (80 mg) を 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> に溶解して CHCl<sub>3</sub> 抽出し、溶媒を留去して (±)-KT 遊離塩基を得た。これを *N,N*-ジメチルホルムアミド (1.5 mL) に溶解し、水素化ナトリウム (55 mg) および 3-bromopropionic acid ethyl ester (150 μL) を加えて約 60°C で 40 分撹拌した。反応液を酢酸エチルで抽出し、水洗後、溶媒を留去した。得られる残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（溶出溶媒：クロロホルム-メタノール）に付して、エステル **1** を無色オイル (40 mg) として得た。[α]<sub>D</sub>-0.1 (*c* = 0.40, MeOH)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.71 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, 3'-H)、7.46 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, 4'-H)、7.43 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, 6'-H)、7.36 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, 5'-H)、4.04 (2H, dd, *J* = 14.4, 7.2 Hz, 10-H)、3.14 (1H, dd, *J* = 14.4, 3.0 Hz, 3α-H)、2.44 (1H, ddt, *J* = 12.8, 7.8, 5.3 Hz, 6-H)、2.26-2.39 (2H, m, 8-H)、2.07-2.11 (1H, m, 5-H)、1.96-2.03 (1H, m, 7-H)、1.97 (3H, s, 2-CH<sub>3</sub>)、1.75-1.78 (2H, m, 4α, β-H)、1.53-1.60 (2H, m, 3β-H, 7-H)、1.35-1.43 (1H, m, 5-H)、1.18 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, 11-H)。<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 213.6, 175.2, 136.8, 135.2, 132.5, 132.1, 130.8, 128.3, 72.7, 61.4, 48.4, 40.4, 38.7, 32.4, 28.8, 26.2, 23.0, 14.6。High resolution (HR)-MS [electrospray ionization (ESI)-

Orbitrap]  $m/z$  : (M+H)<sup>+</sup> Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>ClNO<sub>3</sub> 338.1517 ; Found 338.1514。

化合物 **1** (40 mg) のメタノール (1 mL) 溶液に 5% KOH (200  $\mu$ L) を加えて約 60°C で 30 分撹拌した。反応液を水で希釈し、クロロホルムで抽出した。有機層を水洗、溶媒を留去して、残渣を Superpak-2 (溶出溶媒:メタノール) に付してカルボン酸 **2** を無色オイル (14.3 mg) として得た。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)  $\delta$ : 7.60 (1H, t,  $J$  = 8.0 Hz, 6'-H)、7.42 (1H, t,  $J$  = 8.0 Hz, 3'-H)、7.37 (1H, t,  $J$  = 8.0 Hz, 5'-H)、7.26 (1H, t,  $J$  = 8.0 Hz, 4'-H)、3.06 (1H, d,  $J$  = 10.5 Hz, 3-H)、2.55-2.58 (1H, m, 6-H)、2.47-2.51 (1H, m, 7-H)、2.06 (3H, s, 2-CH<sub>3</sub>)、1.88-1.99 (2H, m, 5-H, 7-H)、1.52-1.63 (3H, m, 3-H, 4-H)、1.33-1.41 (1H, m, 5-H)。<sup>13</sup>C-NMR (125.5 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)  $\delta$ : 212.5、138.1、136.2、132.0、131.1、129.6、127.5、72.0、48.2、40.2、37.9、29.1、26.7、22.4。HR-MS (ESI-Orbitrap)  $m/z$  : (M+H)<sup>+</sup> Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>ClNO<sub>3</sub> 310.1201; Found 310.1203。

### 3-2 項 KT-BSA(b) の調製

化合物 **2** (6.8 mg) の 1,4-ジオキサン (400  $\mu$ L) 溶液に、EDC 塩酸塩 (12.6 mg) と *N*-ヒドロキシコハク酸イミド (7.5 mg) を加えて、室温で 1 時間撹拌した。反応液を酢酸エチルで希釈して水洗し、溶媒を留去して活性エステル **3** の粗生成物を無色オイル (8.3 mg) として得た。

化合物 **3** (6.6 mg) をピリジン (1 mL) に溶解し、BSA (15 mg) の PB 溶液 (pH 7.3, 1.5 mL)、1,4-ジオキサン (1.5 mL) を加えて、室温で 3 時間撹拌、引き続き、4°C で 1 夜撹拌した。反応液を水-エタノール (4:1) で 2 夜透析したのち、PB で半日透析した。本結合体溶液における BSA 濃度を、タンパク定量用キットを用いて算出し、KT-BSA(b) 結合体の生理食塩水溶液 (1.0 mg/mL) を調製した。この溶液は、使用まで -20°C で凍結保存した。

KT/BSA 結合モル比は、次のように求めた。すなわち、まず、KT-BSA(b) 水溶液 (0.83 g/L; 1.0 mL) または水 (対照用 ; 1.0 mL) に 4.0% NaHCO<sub>3</sub> (1.0 mL) および 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム水溶液 (1.0 g/L ; 1.0 mL) を加えて 40°C で 2 時間インキュベートした。次いで、SDS 水溶液 (100 g/L ; 1.0 mL) を添加したのち、1.0 mol/L HCl (0.50 mL) を加えて反応を停止し、335 nm

における吸光度 (X) を測定した。また、算出したアルブミン濃度に基づいて、この反応液 (溶液は計 4.5 mL となる) 中の BSA の物質量 [Y (mol)] を求めた。KT-BSA 結合体中の遊離アミノ基数の平均値は、 $\epsilon$ -(2,4,6-トリニトロフェニル) リシンのモル吸光係数=9950 として、次式で与えられる。

$$1000X \div (9950 \times 4.5 \times Y)$$

これで得られた値と、BSA が有する総アミノ基数 (60 個/分子) の差から、BSA1 分子あたりの KT の結合数を求めた。

### 3-3 項 GAL 標識 KT の調製

前項で得た活性エステル **3** (46  $\mu$ g) を 1,4-ジオキサン (200  $\mu$ L) に溶解し、GAL (2.0 mg) の PB 溶液 (200  $\mu$ L) を加えて、室温で 1 時間攪拌、さらに 4°C で 4 時間攪拌した。PD-10 カラムに付したのち、3-2 項の KT-BSA (b) に準じて透析し、GAL 標識 KT (KT-GAL) を得た。適量のゼラチンを添加した PBS 溶液 (45.7  $\mu$ g/mL) とし、使用まで 4°C で保存した。

### 3-4 項 抗 KT 抗体産生ハイブリドーマ株の樹立

KT-BSA (a) あるいは KT-BSA (b) の生理食塩水溶液 (0.25 mg/mL) を等体積の FCA と混合してエマルジョンとしたのち、BALB/c マウスおよび A/J マウス (雌、8 週齢、各 5 匹) の背中と足蹠に皮下投与 (1 個体あたり計 0.2 mL) した。2 週間間隔で 3 回もしくは 4 回の追加免疫 (FIA を使用) を行い、その 7 日後に、各マウスから試験採血 (眼静脈採血) を行い、血清中の KT に対する抗体価を下記の ELISA で調べた。その結果、良好な結果を示した 1~2 匹に最終免疫 [免疫原約 (25  $\mu$ g) を含む生理食塩水 (約 0.5 mL) を脾臓内と腹腔内に分けて投与] を行った。最終免疫から 3 日後に脾臓を摘出し、得られた脾細胞 (約  $1.3 \sim 3.5 \times 10^8$  個) を 2-1 項と同様に NS1 細胞と融合し、融合細胞 (ハイブリドーマ) を選択培養した。ハイブリドーマの増殖が確認されたマイクロウェルの上清を、下記の ELISA に付して、抗体分泌陽性細胞のスクリーニングを行った。安定な抗体産生細胞を HT 培地でさらに拡大培養したのち、限界希釈法によるクローニングに付して、抗 KT 抗体産生株を樹立した。

### 3-5 項 モノクローナル抗 KT 抗体の調製

上記のハイブリドーマをハイブリドーマ用培地中で飽和細胞密度（コンフルエント）まで培養し、遠心（500 rpm、5 分、室温）したのち、その上清をモノクローナル抗体溶液として ELISA に用いた。

### 3-6 項 モノクローナル抗 KT 抗体のアイソタイプの決定

上記のアイソタイピングキットを用い、添付の説明書に従い操作を行った。

### 3-7 項 KT-BSA(a) 免疫マウス血清および培養上清中抗 KT 抗体の ELISA による検出

96 ウェル ELISA 用プレートに、KT-BSA(a) の 0.10 mol/L 炭酸緩衝溶液 (pH 8.6、1.0 µg/mL) を分注 (100 µL/ウェル) して、室温で一夜放置したのち、2-3 項と同様にブロッキングを行い、抗原固定化プレートを得た。このプレートに 50%エタノールで希釈した各種濃度の (±)-KT・HCl 標準品 (25 µL/ウェル) を加え、5.0% BSA を含む G-PBS で希釈した免疫マウスの血清もしくはハイブリドーマ培養上清を添加 (100 µL/ウェル) し、37°C で 1 時間反応させた。以下、2-3 項と同様の操作を行い、490 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

### 3-8 項 KT-BSA(b) 免疫マウス血清および培養上清中抗 KT 抗体の ELISA による検出

96 ウェル ELISA 用プレートに、5.0 µg/mL ヤギ抗マウス IgG 抗体の PBS 溶液を分注 (100 µL/ウェル) して、4°C で一夜放置したのち、2-3 項と同様にブロッキングを行い、第 2 抗体固定化プレートを得た。このプレートに G-PBS で希釈した免疫マウスの血清もしくはハイブリドーマ培養上清を添加 (100 µL/ウェル) し、37°C で 1 時間反応させた。溶液を吸引除去してプレートを T-PBS で 3 回洗浄し、G-PBS で希釈調製した 0.50 µg/mL KT-GAL 溶液 (100 µL/ウェル) および G-PBS で希釈した各種濃度の (±)-KT・HCl 標準品 (50 µL/ウェル) を添加し、37°C で 1 時間反応させた。再びプレートを同条件で洗浄し、基質溶液

[0.060% *o*-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside、0.20%  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、および 0.7% (v/v) 2-メルカプトエタノールを含む G-PBS 溶液] (100  $\mu\text{L}$ /ウェル) を加えて 37°C で 1 時間インキュベートした。酵素反応停止液 (1.0 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (100  $\mu\text{L}$ /ウェル) を加えて混和したのち、405 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

### 3-9 項 モノクローナル抗 KT 抗体 Fab フラグメントの調製

3-5 項で得られたハイブリドーマ上清を上記のプロテイン G カラムに付した。得られた IgG 画分を、上記の Fab フラグメント調製キットを用いて処理し、目的の Fab フラグメント (Fab-KT(a)#2、Fab-KT(b)#45) を調製した。

### 3-10 項 BLI 法による抗原抗体反応の速度定数と結合定数の測定

ストレプトアビジン固定化バイオセンサーチップに自作したビオチン標識 KT-BSA を飽和させたのち、G-PBS で希釈した Fab 溶液 (Fab-KT(a)#2 ; 10、20、50、または 100 nmol/L、Fab-KT(b)#45 ; 50、100、200、または 500 nmol/L) (各 4.0  $\mu\text{L}$ ) を反応させ、25°C におけるセンサーチップ上の ( $\pm$ )-KT 基に対する  $k_a$ 、 $k_d$ 、および  $K_a (=k_a/k_d)$  を BLItz を用いて算出した。なお、ビオチン標識 KT-BSA は、PBS 1.0 mL に溶かした KT-BSA (100  $\mu\text{g}$ ) に EZ-Link NHS-LC-Biotin (30  $\mu\text{g}$ ) を加えて室温で 1 時間攪拌し、反応液を PBS で 1 夜透析して調製した。

## 第 4 節 付属実験

### 4-1 項 ハプテン誘導体の合成

*trans*-4'-Cotininecarboxylic acid **1** (1.0 g) を 95% 1,4-ジオキサン (9.0 mL) に溶解したのち、EDC 塩酸塩 (2.6 g) を加え、室温で 15 分間攪拌した。この反応液に  $\beta$ -アラニンエチルエステル塩酸塩 (3.2 g) と 1,4-ジオキサン (3.0 mL) を加え、さらに室温で 2 時間反応させた。反応液を水で希釈し、Supelpak2 カラム

に付した。フラッシュカラムクロマトグラフィー（固定相：ワコーゲル FC-40、溶出溶媒：CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 15 : 1）で精製し、エステル **2**（700 mg）を得た。<sup>1</sup>H-NMR（300 MHz, CD<sub>3</sub>OD） $\delta$  : 8.56（1H, dd,  $J$  = 2.1, 4.8 Hz, 6-H）、8.50（1H, d,  $J$  = 2.1 Hz, 2-H）、7.78（1H, td,  $J$  = 2.1, 8.0 Hz, 4-H）、7.51（1H, dd,  $J$  = 4.8, 8.0 Hz, 5-H）、4.80（1H, d,  $J$  = 6.6 Hz, 5'-H）、4.10（2H, q,  $J$  = 7.2 Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>）、2.64（3H, s, -NCH<sub>3</sub>）、1.22（3H, t,  $J$  = 7.2 Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>）。MS（EI） $m/z$  : ( $M^+$ ) 319。

化合物 **2**（300 mg）を 95%エタノール 30 mL に溶解し、KOH（930 mg）の 95%エタノール溶液（15 mL）を加えて 2 時間還流した。5% HCl で反応液を弱酸性に調整したのち溶媒を留去し、残渣を Superpack-2 に付して精製し、コチニンカルボン酸 **3**（258 mg）を得た。<sup>1</sup>H-NMR（CD<sub>3</sub>OD） $\delta$  : 8.49、8.55（each 1H, brs, 2, 6-H）、7.78（1H, d,  $J$  = 7.8 Hz, 4-H）、7.52（1H, m, 5-H）、4.80（1H, d,  $J$  = 6.6 Hz, 5'-H）、2.65（3H, s, -NCH<sub>3</sub>）。

#### 4-2 項 CT-アルブミン結合体の調製

化合物 **3**（38 mg）を 1,4-ジオキサン 1.6 mL に溶かし、EDC 塩酸塩（108 mg）を加えて室温で 10 分間攪拌したのち、*p*-ニトロフェノール（81 mg）を加えて 2 時間攪拌した。溶媒を留去したのち、残渣を分取薄層クロマトグラフィー（展開溶媒：CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 20 : 1）に付し、*p*-ニトロフェニルエステル **4**（30 mg）を得た。

*p*-ニトロフェニルエステル **4** をピリジン（500  $\mu$ L）に溶かし、BSA または OVA の PB 溶液（それぞれ 0.45  $\mu$ mol/L、0.89  $\mu$ mol/L）（500  $\mu$ L）と混和して、4°C で 1 夜攪拌した。これを精製水で透析したのち、反応液に氷冷したアセトン（10～20 mL）および少量の NaCl を加え、氷上で 30 分間放置した。遠心分離（3,000 rpm、20 分、4°C）後、沈殿を PB 約 10 mL で懸濁し、氷冷したアセトン（10～20 mL）を添加して、上記と同様に処理した。得られた沈殿を 20% ピリジンに溶解したのち、精製水に対して 4°C で 1 夜透析した。さらに 0.90% NaCl に対して 4°C で 1 夜透析し、目的の CT-BSA および CT-OVA を 0.90% NaCl 溶液として得た。本結合体溶液におけるアルブミン濃度をタンパク定量用キットを用いて算出し、CT/アルブミン結合モル比を 3-2 項の方法を用いて求めた。これら

の結合体は、使用まで $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

#### 4-3 項 抗 CT 抗体産生ハイブリドーマ株の樹立

CT-BSA の生理食塩水溶液 ( $0.5\text{ mg/mL}$ ) を等体積の FCA と混合してエマルジョンとしたのち、BALB/c マウス (雌、6~8 週齢、6 匹) の背部と足蹠に皮下投与 (1 個体あたり計  $0.2\text{ mL}$ ) した。2 週間隔で 4 回の追加免疫 (FIA を使用) を行い、その 7 日後に、各マウスから試験採血 (眼静脈採血) を行い、血清中の CT に対する抗体価を下記の ELISA で調べた。その結果、良好な結果を示した 2 匹に最終免疫 [CT-BSA ( $50\text{ }\mu\text{g}$ ) を含む生理食塩水 (約  $0.2\text{ mL}$ ) を脾臓内と腹腔内に分けて投与] を行った。最終免疫から 3 日後に、脾臓を摘出した。得られる脾細胞 (約  $1\times 10^8$  個) を 2-1 項と同様に NS1 細胞と融合し、96 ウェルクラスターディッシュ中、HAT 培地で約 2 週間培養することにより融合細胞 (ハイブリドーマ) を選択した。ハイブリドーマの増殖が確認されたマイクロウェルの培養上清を、後述する ELISA によるスクリーニングに付して、抗 CT 抗体の分泌の有無を調べた。陽性を示したハイブリドーマ細胞を HT 培地で拡大培養したのち、限界希釈法によりクローン化し、抗 CT 抗体産生株を樹立した。

#### 4-4 項 モノクローナル抗 CT 抗体の調製

上記のハイブリドーマをハイブリドーマ用培地中で飽和細胞密度 (コンフルエント) まで培養し、遠心 ( $500\text{ rpm}$ 、5 分、室温) したのち、その上清をモノクローナル抗体溶液として ELISA に用いた。

#### 4-5 項 モノクローナル抗 CT 抗体のアイソタイプの決定

上記のアイソタイピングキットを用い、添付の説明書に従い操作を行った。

#### 4-6 項 CT-BSA 免疫マウス血清および培養上清中抗 CT 抗体の ELISA による検出

CT-OVA の  $0.10\text{ mol/L}$  炭酸緩衝溶液 ( $\text{pH } 8.6$ 、 $10\text{ ng/mL}$  または  $100\text{ ng/mL}$ ) を ELISA 用 96 ウェルマイクロプレートに分注 ( $100\text{ }\mu\text{L}$ /ウェル) して、室温で

一夜放置したのち、2-3 項と同様にブロッキングを行い、抗原固定化プレートを得た。このプレートに G-PBS で希釈した免疫マウスの血清もしくはハイブリドーマ培養上清を添加 (100  $\mu$ L/ウェル) し、37°C で 2 時間反応させた。溶液を吸引除去してプレートを T-PBS で 3 回洗浄し、G-PBS で希釈調製した POD 標識ヤギ抗マウス IgG (Fc 特異的) 抗体 (16 ng/100  $\mu$ L/ウェル) を添加し、37°C で 1 時間反応させた。再びプレートを同条件で洗浄し、以下、2-3 項と同様の操作を行い、490 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

#### 4-7 項 ビオチン標識 CT の調製

*p*-ニトロフェニルエステル **4** (28 mg) をピリジン (500  $\mu$ L) に溶かし、Amine-PEO<sub>3</sub>-biotin (15 mg) を加え、室温で 5 時間攪拌した。溶媒を留去したのち、残渣を分取薄層クロマトグラフィー (展開溶媒: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 4:1) に付し、ビオチン標識 CT (CT-bio) (23 mg) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N+D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 8.66 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, 2-H)、8.57 (1H, brd, *J* = 5.0 Hz, 6-H)、7.49 (1H, td, *J* = 2.0, 8.0 Hz, 4-H)、7.22 (1H, dd, *J* = 5.0, 8.0 Hz, 5-H)、4.96 (1H, d, *J* = 6.5 Hz, 5'-H)、2.49 (3H, s, -NCH<sub>3</sub>)、4.45 [1H, dd, *J* = 4.5, 7.5 Hz, angular-H (biotin)]、4.24 [1H, dd, *J* = 4.5, 8.0 Hz, angular-H (biotin)]。HR-MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: (M+H)<sup>+</sup> Calcd for C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>O<sub>8</sub>N<sub>7</sub>S 692.3436; Found 692.3430。本生成物を 1.00 mg/mL となるようにエタノールに溶解し、4°C で保存した。

#### 4-8 項 モノクローナル抗 CT 抗体の ELISA における諸性質の検討

##### ① 用量作用曲線の作成

ウサギ抗マウス IgG+IgM 抗体の PBS 溶液 (5.0  $\mu$ g/mL) を ELISA 用 96 ウェルマイクロプレートに分注 (100  $\mu$ L/ウェル) して、4°C で一夜放置したのち、2-3 項と同様にブロッキングを行い、抗原固定化プレートを得た。このプレートに PVG-PBS で希釈した抗 CT 抗体を添加 (100  $\mu$ L/ウェル) し、37°C で 1 時間反応させた。溶液を吸引除去してプレートを T-PBS で 3 回洗浄し、PVG-PBS で希釈調製した 0.50 ng/mL CT-bio (100  $\mu$ L/ウェル) を添加し、さらに各種濃度の CT 標準品 (過塩素酸塩として添加<sup>30)</sup>) (50  $\mu$ L/ウェル) を添加し、混和した

のち 37℃で 2 時間反応させた。POD 標識ストレプトアビジンの PVG-PBS 溶液 (100 ng/100  $\mu$ L/ウェル) を添加し、37℃で 30 分間反応させた。再びプレートと同条件で洗浄し、以下、2-3 項と同様の操作を行い、490 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。なお、CT 標準品の各濃度における反応は 4 ウェル (4 重測定) で行い、その平均値を用いてデータ処理を行った。

## ② 交差反応試験

前項の実験において、CT 標準品の代わりに各種 CT 類縁化合物の標準品を添加して用量作用曲線を作成し、2-7 項と同様に各 CT 類縁化合物の交差反応性を算出した。

### 4-9 項 蛍光消光法による抗原抗体反応の結合定数の算出

4-4 項で得られたハイブリドーマ上清を上記のプロテイン G カラムに付した。得られた IgG 画分を、PBS-2 で希釈してガラス試験管に分注 (20  $\mu$ g/900  $\mu$ L) した。PBS で希釈した各種濃度のハプテン (CT もしくは CT-bio) を添加 (100  $\mu$ L) し、37℃で 2 時間反応させたのち、励起波長 279 nm、蛍光波長 347 nm にて反応液の蛍光強度を測定した。得られた蛍光強度を縦軸に、各測定点における CT あるいは CT-bio の総濃度  $[Ag_T]$  を横軸にプロットし、ハプテン未添加時の蛍光強度を  $F_0$ 、大過剰のハプテンを添加した際の蛍光強度を  $F_{\text{excess}}$  としたとき、 $(F_0 + F_{\text{excess}})/2$  の蛍光強度を与えるハプテンの総濃度、すなわち、添加した抗体の結合部位の 50% がハプテンと結合する際の遊離ハプテン濃度として  $K_d$  値を求め、その逆数として  $K_a$  値を算出した。

### 4-10 項 測定値補正用ブランク尿の調製

ボランティア (非喫煙者の両親と住む小学生) 3 名から採取した随時尿を各々遠心 (3,000 rpm、4℃、5 分) したのち、その上清を等体積ずつ混合した。

### 4-11 項 抗 CT 抗体を用いる ELISA によるヒト尿試料の測定

#### A) ブランク尿を用いない測定

4-8 項と同様に操作を行い、CT-bio 加えたのち、各種濃度の CT 標準品 (過

塩素酸塩として添加<sup>30)</sup>)または PVG-PBS で 10 倍希釈したヒト尿試料 (50  $\mu$ L/ウェル) を添加し、37°C で 2 時間反応させた。4-8 項に準じて処理し、固相上の POD 活性を測定した。

#### B) ブランク尿補正を加えた測定

A) と同様に操作し、CT 標準品を添加するウェルには、4-10 項で調製したブランク尿 (10%) を含む PVG-PBS (50  $\mu$ L/ウェル) を、尿試料を添加するウェルには PVG-PBS のみ (50  $\mu$ L/ウェル) を添加した。そののち、A) に準じて処理し、固相上の POD 活性を測定した。

## 第 2 章付属実験

### 第 2 節付属実験

#### 2-1 項 抗 THC 抗体可変部遺伝子のクローニング

第 1 章 2-1 項で樹立した Ab-THC#33 分泌ハイブリドーマ細胞 (約  $1 \times 10^7$  個) から、RNA 抽出キットを用いて、総 RNA を抽出した。得られた RNA (4  $\mu$ g) に、oligo dT プライマー (50 pmol)、dNTP (10 nmol)、dithiothreitol (DTT) (0.10 mol)、MgCl<sub>2</sub> (25 mmol)、Superscript II reverse transcriptase (200 U) を加え、専用緩衝液中 (25  $\mu$ L) で 42°C、50 分間インキュベートし、cDNA を合成した。この反応溶液を、5'-RACE キットに含まれる DNA 精製カートリッジに付して、cDNA を含む水溶液を得た。

V<sub>H</sub> 遺伝子は、この cDNA 溶液 (8  $\mu$ L) を用い、MHV-4 と my1-GSP をプライマーとする PCR により増幅した。この PCR は *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (1 U)、dNTP 混合物 (各 10 nmol)、上記プライマー (各 20 pmol) を含む専用緩衝液 (50  $\mu$ L) 中に行い、熱変性 95°C (1 分)、アニーリング 50°C (1 分)、伸長 72°C (1 分) のサイクルを 35 回繰り返したのち、72°C (10 分) の伸長反応を加えた。V<sub>L</sub> 遺伝子は、5'-RACE により増幅した。前述の cDNA (8  $\mu$ L) に TdT と dCTP を働かせて 5'末端にポリ C 配列を付加したのち、AAP と m $\kappa$ -GSP をプラ

イマーとする PCR に付した。この PCR は *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (1 U)、dNTP 混合物 (各 10 nmol)、上記プライマー (各 20 pmol) を含む専用緩衝液 (20  $\mu$ L) 中に行い、熱変性 95°C (1 分)、アニーリング 64°C (1 分)、伸長 72°C (2 分) のサイクルを 35 回繰り返したのち、72°C (10 分) の伸長反応を加えた。さらに、この PCR 反応液を AUAP および MKC をプライマーとする PCR に付した。本 PCR は *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (1 U)、dNTP 混合物 (各 10 nmol)、上記プライマー (各 20 pmol) を含む専用緩衝液 (100  $\mu$ L) 中に行い、熱変性 95°C (1 分)、アニーリング 64°C (1 分)、伸長 72°C (2 分) のサイクルを 35 回繰り返したのち、72°C (10 分) の伸長反応を加えた。得られた  $V_H$  および  $V_L$  遺伝子断片をそれぞれ DNA 精製キット (B) で PCR 反応液から抽出した。さらに低融点アガロースゲル (2.0%) を用いる電気泳動に付し、目的 DNA のバンドを含むゲルを切り出し、DNA 精製キット (A) を用いて DNA を抽出し、 $V_H$  および  $V_L$  遺伝子を含む水溶液を得た。

## 2-2 項 Ab-THC#33 抗体の $V_H$ または $V_L$ 遺伝子を含む DNA 断片のサブクローニング

前項で得た  $V_H$  または  $V_L$  遺伝子を含む DNA 断片 (各 25  $\mu$ g) に *Xma* I (50 U) を加え、反应用緩衝液中 (全量 100  $\mu$ L) で 37°C、1 夜インキュベートした。生成物を DNA 精製キット (B) で精製したのち、*Sal* I (50 U) を加え、反应用緩衝液中 (全量 100  $\mu$ L)、37°C で 1 夜インキュベートした。再び生成物を DNA 精製キット (B) で精製し、制限酵素処理済み DNA 断片を得た。その一部 (125 ng) と、同様に *Xma* I、*Sal* I で処理した pBluescript II ベクター (250 ng) を滅菌水 (16  $\mu$ L) に溶解し、42°C、5 分間インキュベートしたのち直ちに氷冷した。この反応液に 10 倍濃度の反应用緩衝液 (2  $\mu$ L) と T4 DNA リガーゼ (800 U、2  $\mu$ L) を加えて 16°C で 1 夜インキュベートした。この反応液を PCI 溶液で抽出し、沈殿キャリアーとしてグリコーゲン (40  $\mu$ g) を添加したのち EtOH 沈殿を行い、得られる沈殿を滅菌精製水 (10  $\mu$ L) で溶解した。

この水溶液に XL1-Blue エレクトロコンピテント細胞の懸濁液 (100  $\mu$ L) を加えて混合し、その全量を電極キュベットに移して氷中で 20 分間静置した。こ

れを遺伝子導入装置に装着し、50  $\mu$ F、印加電圧 1,800 V、内部抵抗 125  $\Omega$  の条件で電気パルスを加えた。その直後に、SOC 培地 (900  $\mu$ L) を添加し、37°C で 1 時間振とう培養 (～200 rpm) した。菌液の一部を段階希釈したのち、2×YT-ATG (1%) アガープレートに塗布し、37°C で 1 夜培養した。

このプレート上から、コロニーをランダムに選択し、2×YT 培地 (5  $\mu$ L) に懸濁させた。この懸濁液 (1  $\mu$ L) に KS-reverse および KS-forward プライマー (各 2.5 pmol)、dNTP 混合物 (各 4 nmol)、および *AmpliTaq* DNA ポリメラーゼ (1 U) を加え、専用緩衝液 (全量 20  $\mu$ L) 中で PCR (コロニーPCR) を行った。PCR 条件は、熱変性 95°C (1 分)、アニーリング 64°C (1 分)、伸長 72°C (2 分) のサイクルを 35 回繰り返したのち、72°C (10 分) の伸長反応を加えた。反応液をアガロースゲル (2%) 電気泳動に付して目的遺伝子の存否を調べ、 $V_H$  遺伝子または  $V_L$  遺伝子を持つ形質転換菌のクローンを同定した。これらクローンについて、対応する上記の懸濁液を 2×YT-AG (1%) 培地 (10 mL) に接種して 37°C で 1 夜振とう培養 (～200 rpm) したのち、その終濃度が 15% となるようにグリセロールを添加し、-80°C で凍結保存した。

### 2-3 項 Ab-THC#33 抗体の $V_H$ および $V_L$ 遺伝子の DNA 塩基配列の決定

前項で Ab-THC#33 抗体の  $V_H$  遺伝子または  $V_L$  遺伝子が認められた形質転換菌について、そのグリセロール保存液を少量取り、2×YT-AG (1%) 培地 (10 mL) に接種し、37°C で 1 夜振とう培養 (～200 rpm) した。これを遠心分離 (3,000 rpm、20 分、室温) して集菌したのち、プラスミド DNA 抽出キットを用いて組換えプラスミドを調製した。この組換えプラスミド DNA を依頼測定に付し、得られたデータを DNASIS version 3.0.1 プログラムにより解析して  $V_H$  および  $V_L$  の DNA 塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定した。

### 2-4 項 *THC-scFv-wt* 遺伝子構築のための $V_H$ -DNA および $V_L$ -DNA 断片の調製

2-2 項で調製した  $V_H$  遺伝子を含む水溶液 (10 ng/ $\mu$ L、5  $\mu$ L) に THC#33 $V_H$ -Rev および THC#33 $V_H$ -For プライマー (各 50 pmol)、dNTP 混合物 (各 20 nmol)、および *KOD* DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を加え、専用緩衝液 (全量 100  $\mu$ L) 中で

PCR を行い、 $V_H$ -DNA 断片 ( $V_H$  の直後にリンカー配列の一部をコードする塩基配列を付加したもの) を増幅した。また、2-2 項で調製した  $V_L$  遺伝子を含む水溶液 (10 ng/ $\mu$ L、5  $\mu$ L) と THC#33 $V_L$ -Rev および THC#33 $V_L$ -For プライマーを用い、同様の条件で、 $V_L$ -DNA 断片 ( $V_L$  の直前にリンカー配列の一部をコードする塩基配列を、直後に FLAG タグをコードする塩基配列を付加したもの) を増幅した。これらの PCR では、熱変性 94°C (2 分)、98°C (10 秒)、アニーリング 55°C (30 秒)、伸長 68°C (1 分) のサイクルを 35 回繰り返したのち、68°C (10 分) の伸長反応を加えた。反応液を DNA 精製キット(B) に付し、目的の DNA 断片 ( $V_H$ -DNA、 $V_L$ -DNA) を含む水溶液を得た。

#### 2-5 項 Overlap extension PCR による *THC-scFv-wt* 遺伝子の構築とサブクローニング

前項で調製した  $V_H$ -DNA および  $V_L$ -DNA 断片 (各 200 ng) に dNTP 混合物 (各 5 nmol) ならびに *KOD* DNA ポリメラーゼ (1 U) を加え、専用緩衝液 (全量 60  $\mu$ L) 中で PCR を行った。この PCR では、熱変性 94°C (2 分)、98°C (10 秒)、アニーリング 55°C (30 秒)、伸長 68°C (1 分) のサイクルを 10 回繰り返したのち、68°C (10 分) の伸長反応を行った。引き続き、反応液の一部 (10  $\mu$ L) に THC#33 $V_H$ -For および THC#33 $V_L$ -For-2 プライマー (各 100 pmol)、dNTP 混合物 (各 20 pmol)、および *KOD* DNA ポリメラーゼ (1 U) を加え、専用緩衝液中 (全量 100  $\mu$ L)、同条件で 15 サイクルの PCR を行った。反応液を DNA 精製キット(B) に付して、*THC-scFv-wt*-DNA 断片 (10  $\mu$ g) を得た。その一部 (5  $\mu$ g) に *Nco*I と *Sal*I (各 50 U) を加え、反応用緩衝液中 (100  $\mu$ L)、37°C で 1 夜インキュベートした。反応液を DNA 精製キット(B) に付して、制限酵素処理済み DNA 断片を得た。

この断片 (100 ng) を、pEXmide 5 ベクター [同様に *Nco*I と *Sal*I で消化し、低融点アガロースゲル(1%) 電気泳動により精製したもの ; 200 ng] を混和し、2-2 項と同様に T4 DNA リガーゼ (800 U) を添加し、16°C で 1 夜インキュベートした。反応液を PCI 抽出、EtOH 沈殿に付し、得られた DNA を滅菌精製水 (10  $\mu$ L) に溶解した。これらを XL1-Blue エレクトロコンピテント細胞と混和し

て、2-2 項と同条件で電気パルスを与え、直ちに SOC 培地中で培養した。この菌液を 2×YT-ATG(1%) アガープレート上に塗布し、37℃で 1 夜培養した。このプレートからランダムに選択したコロニーを 2-2 項に準じて VHH-cPCR back および VHH-cPCR forward プライマーを用いてコロニーPCR に付し、*scFv* 遺伝子が導入された組換え菌クローンを同定した。これら *scFv* 遺伝子保持菌を、それぞれ 2×YT-ATG(1%) 培地 (5 mL) に接種して 37℃で 1 夜振とう培養(～200 rpm) したのち、その終濃度が 15%となるようにグリセロールを添加し、-80℃で凍結保存した。

#### 2-6 項 *THC-scFv-wt* 遺伝子の DNA 塩基配列の決定

前項で得た *scFv* 遺伝子保持菌を大量に培養し、2-3 項に記した手順に従って組換えプラスミドを調製して DNA 塩基配列を決定し、発現される *scFv* タンパク質のアミノ酸配列を推定した。

#### 2-7 項 可溶型 *THC-scFv-wt* の調製と精製

前項の実験によりその塩基配列が確認された *THC-scFv-wt* 遺伝子保持菌を、2×YT-AG(1%) 培地 (5 mL) に接種し、37℃で 1 夜振とう培養した。この菌液の一部 (0.2 mL) を 2×YT-AG(1%) 培地 (20 mL) に加え、600 nm における吸光度が約 0.8 に達するまで 37℃で振とう培養 (～200 rpm) した。培養液を遠心分離 (3,000 rpm、20 分、室温) し、沈殿をタンパク質発現誘導用培地 (20 mL) に懸濁したのち、25℃で 1 夜振とう培養 (～120 rpm) した。培養液を遠心分離 (3,000 rpm、20 分、室温) 後、沈殿に浸透圧ショック用緩衝液 (1.0 mL) を加えて懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。この混合液を遠心分離 (12,000 rpm、30 分、4℃) し、得られた上清をペリプラズム抽出液とした。この一部を TBS に対して 4℃で 1 夜透析したのち、抗 FLAG-M2 抗体結合アガロースゲル (約 1.0 mL) を充填したアフィニティーカラムに付した。カラムを TBS で洗浄し、0.10 mol/L グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) で溶出した。この画分を PBS に対して 4℃で 1 夜透析し、目的の可溶型 *THC-scFv-wt* を得た。

## 2-8 項 Error-prone PCR による変異 $V_H$ -DNA および $V_L$ -DNA 断片の調製

*THC-scFv-wt* 遺伝子保持菌 (2-5 項参照) から抽出した組換えプラスミド (1 ng) に、THC#33 $V_H$ -Rev および THC#33 $V_H$ -For プライマー (または THC#33 $V_L$ -Rev および THC#33 $V_L$ -For プライマー) (各 0.10 nmol)、濃度が不均等な dNTP 混合物 (GTP、CTP および TTP 各 0.10  $\mu$ mol と ATP 0.020  $\mu$ mol を含む。もしくは、ATP、CTP および TTP 各 0.10  $\mu$ mol と GTP 0.020  $\mu$ mol を含む)、MnCl<sub>2</sub> (0 または 0.10 mmol/L)、*AmpliTaq* DNA ポリメラーゼ (5 U) を加え、error-prone PCR 用緩衝液 [16.6 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、6.1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、6.7  $\mu$ mol/L EDTA、10 mmol/L 2-メルカプトエタノール、10% (v/v) DMSO、および 0.17 g/L BSA を含む 67 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8)] (全量 100  $\mu$ L) 中で PCR を行った。この PCR では、熱変性 95°C (1 分)、アニーリング 50°C (1 分)、伸長 72°C (3 分) のサイクルを 35 回繰り返したのち、72°C (10 分) の伸長反応を行った。反応液を DNA 精製キット (B) に付して、変異導入率の異なる (調製時の dNTP の組成および MnCl<sub>2</sub> 濃度が異なる) 各 4 種の変異  $V_H$ -DNA および  $V_L$ -DNA 断片を得た。

## 2-9 項 Overlap extension PCR による変異 *THC-scFv* 遺伝子ライブラリーの構築とサブクローニング

前項に準じて、同条件の MnCl<sub>2</sub> 濃度で増幅した変異  $V_H$ -DNA および変異  $V_L$ -DNA 同士を混合して overlap extension PCR を行った。反応液を DNA 精製キット (B) に付して、変異導入条件の異なる 4 種 [dATP を減じ、MnCl<sub>2</sub> を添加せず error-prone PCR を行って得たライブラリー (A<sub>0</sub> ライブラリー)、dATP を減じ、MnCl<sub>2</sub> を添加し error-prone PCR を行って得たライブラリー (A<sub>0.1</sub> ライブラリー)、同様に dGTP を減じ、MnCl<sub>2</sub> を添加せず error-prone PCR を行って得たライブラリー (G<sub>0</sub> ライブラリー)、dGTP を減じ、MnCl<sub>2</sub> を添加し error-prone PCR を行って得たライブラリー (G<sub>0.1</sub> ライブラリー)] の変異 *scFv* 遺伝子を構築した。その一部 (各 5  $\mu$ g) を 2-2 項に準じて *Nco*I と *Sal*I で順次消化し、精製したのち、pEXmide 5 ベクター (同様に *Nco*I と *Sal*I で消化し、精製したもの) と連結し、大腸菌 XL1-Blue 細胞へ導入した。SOC 培地中で 37°C、1 時間振とう培養 (～

200 rpm) したのち、2×YT-ATG(1%) アガープレート上に塗布し、37℃で1夜培養した。翌日、15%グリセロールを含む2×YT培地(1.5 mL)をプレートへ添加し、生成したコロニーをスクレイパーを用いて懸濁させ、変異 *THC-scFv* 遺伝子ライブラリー4種を得た。これら懸濁液は、凍結保存用チューブに移し、−80℃で凍結保存した。

## 2-10 項 変異 *THC-scFv* 提示ファージライブラリーの調製とファージ力価の算定

変異 *THC-scFv* 遺伝子を保持する大腸菌のグリセロール凍結保存液(50 µL)を、2×YT-ATG(2%)培地(50 mL)へ接種して、対数増殖期に達するまで(本論文では“600 nmにおける吸光度が約0.4に達するまで”の意味)37℃で振とう培養(〜200 rpm)した。この培養液に VCSM13 ヘルパーファージを添加し、37℃で30分間インキュベートした。このとき、VCSM13 ヘルパーファージの MOI (multiplicity of infection ; ファージ pfu/大腸菌細胞数)は、20とした。培養液を遠心分離(1,000 g、20分、室温)し、沈殿を2×YT-AK培地(50 mL)に懸濁したのち、25℃で1夜振とう培養(〜120 rpm)した。培養液を各20 mL、2本に分注し、遠心分離(3,000 rpm、30分、室温)後、上清にPEG/NaCl液5 mLを加えて混合し、氷上で1時間インキュベートした。この混合液を遠心分離(10,000 g、30分、4℃)して上清を除去し、沈殿した scFv 提示ファージを PBS-2 (0.2 mL)に再び溶解した。遠心分離(10,000 g、5分、4℃)したのち、この上清を4℃で保存した。

一方で、この上清の一部を PBS-2 で段階希釈( $1 \times 10^7 \sim 10^9$  倍希釈)し、各希釈液(10 µL)を対数増殖期の XL1-Blue 培養液(90 µL)と混合して、37℃で30分間インキュベートした。この培養液の一部(10 µL)を2×YT-ATG(1%)アガープレートに塗布して37℃で1夜培養した。出現したコロニー数を計数してファージ液1 mLあたりのコロニー数(cfu)に換算し、scFv 提示ファージの力価を示す指標として用いた。

## 2-11 項 抗 THC 活性を持つ変異 scFv 提示ファージのパンニングによる選択

イムノチューブに THC-BSA (5.0 µg/mL) の 0.10 mol/L 炭酸緩衝溶液 (pH 8.6 ; 2.0 mL) を添加し、室温で 1 夜放置した。溶液を吸引除去し、PBS-2 で 3 回洗浄したのち、M-PBS-2 (4 mL) を添加し、37°C で 2 時間インキュベートした。溶液を吸引除去し、T-PBS-2 で 3 回洗浄し、THC-BSA 固定化チューブを作製した。また、BSA に結合する scFv 提示ファージを除去するために、BSA (10 µg/mL) の炭酸緩衝溶液を用いて同様に BSA 固定化チューブを作製した。

まず、A<sub>0</sub> ライブラリー、A<sub>0.1</sub> ライブラリーをそれぞれ M-PBS-2 で希釈、調製し (各々約 5×10<sup>11</sup> cfu/mL)、各 1.0 mL を混和して BSA 固定化チューブに添加した。同様に G<sub>0</sub> ライブラリー、G<sub>0.1</sub> ライブラリーも M-PBS-2 で希釈し (各々約 5×10<sup>11</sup> cfu/mL)、各 1.0 mL を混和して別の BSA 固定化チューブに添加し、37°C で 1 時間攪拌した。このファージ溶液をそれぞれ THC-BSA 固定化チューブに移し、さらに 37°C で 1 時間攪拌した。溶液を吸引除去後、T-PBS-2 で 3 回洗浄し、PVG-PBS で希釈した 10 µg/mL THC 標準品を 1.0 mL 添加して、37°C で 1 時間攪拌し、チューブから解離するファージを回収した。このファージ溶液に対数増殖期の XL1-Blue 培養液 (9 mL) を添加して、37°C で 30 分間インキュベートした。この培養液の一部を 2×YT 培地で段階希釈 (1×10<sup>1</sup>~1×10<sup>3</sup> 倍希釈) したのち、各希釈液 (10 µL) を 2×YT-ATG (1%) アガープレートに塗布して、37°C で 1 夜培養し、力価 (cfu) を算出して、ファージの回収率を求めた。

一方、残りの感染菌を遠心分離 (3,000 rpm、20 分、室温) し、沈殿を 2×YT 培地で懸濁したのち、2×YT-ATG (1%) アガープレートに塗布して 37°C で 1 夜培養した。翌日、15% グリセロールを含む 2×YT 培地 (1.5 mL) をプレートへ添加し、スクレイパーを用いて生成したコロニーを懸濁させたのち、懸濁液を凍結保存用チューブに移して -80°C で凍結保存した。引き続き、この感染菌懸濁液の一部を用いて、2-10 項と同様に scFv 提示ファージライブラリーの調製を行い、その一部を次のパンニングに付した。

これら一連の操作を 3 サイクル繰り返したのち、次項のようにモノクローナルファージを調製した。なお、THC-scFv 提示ファージライブラリーを添加したのちのチューブからのファージの回収は、2 サイクル目は 1.0 µg/mL THC 標準

品を 1.0 mL 添加、3 サイクル目は 0.10 µg/mL THC 標準品を 1.0 mL 添加とし、条件を順次厳しくした。

#### 2-12 項 変異 THC-scFv 提示ファージクローンの調製

前項に記した 3 サイクル目のパンニングで回収したファージの感染菌を塗布して培養したアガープレートからコロニーをランダムに選択し、2-2 項に準じてコロニーPCRを行い、変異 *THC-scFv* 遺伝子を保持するクローンを同定した。この菌を 2×YT-ATG(1%) 培地 (5 mL) に接種して 37°C で 1 夜振とう培養 (～200 rpm) したのち、その終濃度が 15% となるようにグリセロールを添加し、－80°C で凍結保存した。次に、各クローンを 2×YT-ATG(2%) 培地に懸濁して培養し、2-10 項に準じて VCSM13 ヘルパーファージを感染させて、モノクローナル変異 THC-scFv 提示ファージを調製した。

#### 2-13 項 ELISA による THC-scFv 提示ファージの抗 THC 活性の評価

第 1 章 2-3 項に準じて ELISA 用 96 ウェルマイクロプレートに THC-BSA 結合体を固定化し、M-PBS でブロッキングを行った。このプレートに、前項で調製した scFv 提示ファージ (100 µL/ウェル) および各種濃度の THC 標準品を含む PVG-PBS 溶液 (25 µL/ウェル) を加えて混和し、37°C で 1 時間インキュベートした。溶液を吸引除去し、T-PBS-2 で 3 回洗浄したのち、M-PBS で 2,000 倍希釈した POD 標識抗 M13 ファージ抗体 (100 µL/ウェル) を加え、37°C で 30 分インキュベートした。T-PBS-2 で 3 回洗浄し、ウェル上の POD 活性を第 1 章 2-3 項と同様に比色測定した。

#### 2-14 項 *THC-scFv#m1-36* 遺伝子の DNA 塩基配列の決定

2-12 項で得た *THC-scFv#m1-36* 遺伝子保持菌を大量に培養し、2-3 項に記した手順に従って組換えプラスミドを調製して DNA 塩基配列を決定し、発現される scFv タンパク質のアミノ酸配列を推定した。

## 2-15 項 THC-scFv-wt および THC-scFv#m1-36 の分子モデリング

2-6 項および 2-14 項で推定した THC-scFv-wt および THC-scFv#m1-36 のアミノ酸配列を SWISS-MODEL サーバー (<https://swissmodel.expasy.org/>)<sup>84)</sup> に送信し、タンパク質立体構造のモデリングデータを得たのち、SWISSDOCK サーバー (<http://www.swissdock.ch>)<sup>85)</sup> に送信し、THC との複合体の構造を予測した。

## 2-16 項 可溶型変異 THC-scFv#m1-36 の調製

2-12 項で得られたファージ感染菌から、2-3 項に従って *THC-scFv* 遺伝子が組み込まれたプラスミドを抽出した。3'末端に終止コドンが付加するため、このプラスミドを鋳型に、THC#33V<sub>H</sub>-Rev および THC#33V<sub>L</sub>-For-2 プライマー（各 100 pmol）を用いて、2-5 項と同条件で 35 サイクルの PCR を行った。増幅された DNA を 2-5 項と同様に処理し、変異 *THC-scFv#m1-36* 遺伝子を保持する組換え菌クローンを選択した。

## 2-17 項 可溶型変異 THC-scFv#m1-36 の精製

得られたクローンについて 2-7 項に従ってタンパク質発現を行い、scFv タンパク質をペリプラズム抽出液として回収した。この抽出液を 2-7 項に従って、抗 FLAG-M2 抗体結合アガロースを用いたアフィニティーカラムに付して、可溶型変異 THC-scFv#m1-36 を得た。

## 2-18 項 可溶型 THC-scFv の THC 結合能の評価

第 1 章 2-3 項に準じて ELISA 用 96 ウェルマイクロプレートに THC-BSA を固定化し、ブロッキングを行った。このプレートに、PVG-PBS で希釈した可溶型 THC-scFv を含有するペリプラズム抽出液 (100  $\mu$ L/ウェル) と各種濃度の THC 標準品を含む PVG-PBS 溶液 (25  $\mu$ L/ウェル) を加えて混和し、37°C で 1 時間インキュベートした。溶液を吸引除去し、T-PBS で 3 回洗浄したのち、POD 標識抗 FLAG-M2 抗体 (160 ng/mL、100  $\mu$ L/ウェル) を添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。同様にウェルを洗浄したのち、第 1 章 2-3 項と同様にウェル上の POD 活性を測定した。なお、THC 標準品の各濃度における反応は 2 ウェ

ル（2重測定）で行い、その平均値を用いてデータ処理を行った。

#### 2-19 項 可溶型 THC-scFv の SDS-PAGE とウェスタンブロッティング

2-7 項および 2-17 項 で精製し得られた THC-scFv-wt および THC-scFv#m1-36 を SDS-PAGE に付したのち、ブロッティングを行い、分離されたバンドを PVDF 膜に転写した。これらに、POD 標識抗 FLAG 抗体を室温で 1 時間反応させたのち、1-step Ultra TMB Blotting solution を用いて酵素反応を行い、バンドを染色した。

#### 2-20 項 BLI 法による抗原抗体反応の速度定数と結合定数の測定

ストレプトアビジン固定化バイオセンサーチップを、自作したビオチン標識 THC-BSA で飽和させたのち、PVG-PBS で希釈した可溶型 THC-scFv (10、20、50、または 100 nmol/L) 溶液（各 4.0  $\mu$ L）を反応させ、25°Cにおけるセンサーチップ上の THC 基に対する  $k_a$ 、 $k_d$ 、および  $K_a$  ( $=k_a/k_d$ ) を BLItz を用いて算出した。なお、ビオチン標識 THC-BSA は、第 1 章 2-6 項で調製したものをを用いた。

### 第 3 節 付属実験

#### 3-1 項 抗 CT 抗体可変部遺伝子のクローニング

第 1 章 4-3 項で樹立した Ab-CT#45 を分泌するハイブリドーマ細胞（約  $1 \times 10^7$  個）から、RNA 抽出キットを用いて、総 RNA を抽出した。得られた RNA (16  $\mu$ g) に、oligo dT プライマー (50 pmol)、dNTP 混合物（各 10 nmol）、DTT (0.1 mol)、MgCl<sub>2</sub> (25 mmol)、Superscript II reverse transcriptase (200 U) を加え、専用緩衝液中 (25  $\mu$ L) で 42°C、50 分インキュベートし、 $V_H$  および  $V_L$  遺伝子を含む cDNA を合成した。これら反応溶液を、DNA 精製カートリッジに付して、cDNA を含む水溶液（ $\sim 50 \mu$ L）を得た。

$V_H$  遺伝子のクローニングは、以下の手順で行った。精製した Ab-CT#45 を

SDS-PAGE に付したのち、ブロッティングを行い、分離されたバンドを PVDF 膜に転写した。これらに POD 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を反応させたのち、1-step Ultra TMB Blotting solution を用いて酵素反応を行い、バンドを染色した。約 55 kDa の位置に認められた単一のバンドについて、エドマン分解法により N 末端アミノ酸配列を決定した。この配列に相補的な縮重プライマー [CT-5(dg)-Sfi I] を作製し、上記の cDNA に Gamma1-Sal I プライマー（各 100 pmol）とともに加え、dNTP 混合物（各 20 nmol）および *Ex Taq* ポリメラーゼ（2.5 U）を添加し、専用緩衝液中（全量 100  $\mu$ L）で PCR に付した。PCR 条件は、熱変性 95°C（1 分）、アニーリング 50°C（1 分）、伸長 72°C（2 分）とし、これを 35 サイクル繰り返したのち、72°C（10 分）の伸長反応を加えた。得られた DNA 断片を DNA 精製キット(B) によって精製し、 $V_H$  遺伝子を含む DNA 断片を得た。

$V_L$  遺伝子のクローニングについては、上記で得た cDNA に、ユニバーサルプライマー（MKV1~11 の 11 種のうちいずれか 1 種）と MKC プライマーを用いた PCR を行った。増幅が認められた MKV-4 プライマーを用いて、 $V_H$  と同様の条件〔伸長反応のみ 72°C（1 分）に変更〕で PCR を行った。得られた DNA 断片を DNA 精製キット(B) によって精製し、 $V_L$  遺伝子を含む DNA 断片を得た。

### 3-2 項 Ab-CT#45 抗体の $V_H$ または $V_L$ 遺伝子を含む DNA 断片のサブクローニング

$V_H$  遺伝子を含む DNA 断片（5  $\mu$ g）に、*Sfi* I（25 U）を加え、反应用緩衝液中（全量 100  $\mu$ L）、50°C で 1 夜インキュベートした。反応液を DNA 精製キット(B) で精製し、*Sal* I（25 U）を加え、反应用緩衝液中（全量 100  $\mu$ L）で 37°C、1 夜インキュベートした。反応液を DNA 精製キット(B) により精製し、*Sfi* I、*Sal* I 処理済み  $V_H$  DNA 断片を得た。 $V_L$  遺伝子については、同様に *Xma* I、*Sal* I で順次消化し、*Xma* I、*Sal* I 処理済み  $V_L$  DNA 断片を得た。

$V_H$  DNA 断片（100 ng）は、*Sfi* I、*Sal* I で同様に処理した pBluescript II ベクター（200 ng）へ、 $V_L$  DNA 断片（100 ng）は、*Xma* I、*Sal* I で同様に処理した pBluescript II ベクター（200 ng）へそれぞれ組み込み、大腸菌 XL1-Blue 細胞に導入した。この形質転換菌を塗布したプレート上から、コロニーをランダムに選択し、2-2

項に準じて、 $V_H$ については、VHH-cPCR-back、VHH-cPCR-forward プライマーを、 $V_L$ については、KS-reverse プライマーおよび KS-forward プライマーを用いて増幅した。目的 DNA 断片の保持が確認された組換え菌について、グリセロール保存液を調製し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

### 3-3 項 Ab-CT#45 抗体の $V_H$ および $V_L$ 遺伝子の DNA 塩基配列の決定

前項で Ab-CT#45 抗体の  $V_H$  遺伝子または  $V_L$  遺伝子が認められた形質転換菌について、2-3 項に準じて組換えプラスミドを調製し、 $V_H$ および  $V_L$ の DNA 塩基配列を決定した。得られたデータを DNASIS version3.0.1 プログラムにより解析して  $V_H$ および  $V_L$ の DNA 塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定した。

### 3-4 項 CT-scFv-wt 遺伝子構築のための $V_H$ -DNA および $V_L$ -DNA 断片の調製

3-2 項で調製した  $V_H$  遺伝子を含む水溶液 ( $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $2\text{ }\mu\text{L}$ ) に CT#45 $V_H$ -Rev および CT#45 $V_H$ -For プライマー (各  $100\text{ pmol}$ )、dNTP 混合物 (各  $20\text{ nmol}$ )、および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ ( $2.5\text{ U}$ ) を加え、専用緩衝液 (全量  $100\text{ }\mu\text{L}$ ) 中で PCR を行い、 $V_H$ -DNA 断片 ( $V_H$ の直後にリンカー配列の一部をコードする塩基配列を付加したもの) を増幅した。また、3-2 項で調製した  $V_L$  遺伝子を含む水溶液 ( $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $2\text{ }\mu\text{L}$ ) と CT#45 $V_L$ -Rev および CT#45 $V_L$ -For プライマーを用い、同様の条件で、 $V_L$ -DNA 断片 ( $V_L$ の直前にリンカー配列の一部をコードする塩基配列を、直後に FLAG タグをコードする塩基配列を付加したもの) を増幅した。これら PCR では、熱変性  $95^{\circ}\text{C}$  (1 分)、アニーリング  $50^{\circ}\text{C}$  (1 分)、伸長  $72^{\circ}\text{C}$  (1 分) のサイクルを 35 回繰り返したのち、 $72^{\circ}\text{C}$  (10 分) の伸長反応を加えた。反応液を DNA 精製キット (B) に付し、目的の DNA 断片 ( $V_H$ -DNA、 $V_L$ -DNA) を含む水溶液を得た。

### 3-5 項 Overlap extension PCR による CT-scFv-wt 遺伝子の構築とサブクローニング

前項で調製した  $V_H$ -DNA および  $V_L$ -DNA 断片 (各  $200\text{ ng}$ ) に dNTP 混合物 (各  $5\text{ nmol}$ ) ならびに *KOD* DNA ポリメラーゼ ( $1.4\text{ U}$ ) を加え、専用緩衝液 (全量

26  $\mu$ L) 中で PCR を行った。この PCR では、熱変性 98°C (30 秒)、アニーリング 55°C (30 秒)、伸長 74°C (1 分) のサイクルを 10 回繰り返したのち、74°C (10 分) の伸長反応を行った。引き続き、反応液の一部 (10  $\mu$ L) に CT#45V<sub>H</sub>-Rev および CT#45V<sub>L</sub>-For-stop プライマー (各 100 pmol)、dNTP 混合物 (各 20 nmol)、および *KOD* DNA ポリメラーゼ (5 U) を加え、専用緩衝液中 (全量 100  $\mu$ L)、同条件で 15 サイクルの PCR を行った。反応液を DNA 精製キット (B) で精製し、*CT-scFv-wt* DNA 断片 (10  $\mu$ g) を得た。その一部 (5  $\mu$ g) に *Sfi* I (25 U) を加え、反応緩衝液中 (100  $\mu$ L) で 50°C、1 夜インキュベートし、反応液を DNA 精製キット (B) で精製した。次いで、*Sal* I (25 U) を添加して 37°C、1 夜インキュベートし、反応液を再び DNA 精製キット (B) により精製し、制限酵素処理済み DNA 断片を得た。

この断片 (100 ng) に、pEXmide 5 ベクター (同様に *Sfi* I と *Sal* I で消化し、精製したもの ; 200 ng) を混和し、2-5 項と同様に T4 DNA リガーゼ (800 U) を添加し、16°C で 1 夜インキュベートした。反応液を PCI 抽出、EtOH 沈殿に付し、得られた DNA を滅菌精製水 (10  $\mu$ L) に溶解し、大腸菌 XL1-Blue 細胞に導入した。

この菌液を塗布し、37°C で 1 夜培養したプレートからランダムに選択したコロニーを 2-2 項に準じてコロニー PCR に付し、*CT-scFv-wt* 遺伝子が導入されたクローンを同定した。これらのクローンについて、2-5 項に準じて、その終濃度が 15% となるようにグリセロールを添加し、-80°C で凍結保存した。

### 3-6 項 *CT-scFv-wt* 遺伝子の DNA 塩基配列の決定

前項で得た *CT-scFv-wt* 遺伝子保持菌を培養し、2-3 項に記した手順に従って組換えプラスミドを調製し、DNA 塩基配列を決定して、発現される scFv タンパク質のアミノ酸配列を推定した。

### 3-7 項 可溶型 *CT-scFv-wt* の調製と精製

前項の実験によりその塩基配列が確認された *CT-scFv-wt* 遺伝子保持菌を、2-7 項と同様に培養して、ペリプラズム抽出液を調製し、2-7 項に従って抗 FLAG-

M2 抗体結合アガロースを用いたアフィニティーカラムに付し、目的の可溶型 CT-scFv-wt を得た。

### 3-8 項 Error-prone PCR による変異 $V_H$ -DNA および $V_L$ -DNA 断片の調製

3-5 項で得た CT-scFv-wt 遺伝子保持菌から抽出した組換えプラスミド (1 ng) に、CT#45V<sub>H</sub>-Rev および CT#45V<sub>H</sub>-For プライマー (または CT#45V<sub>L</sub>-Rev および CT#45V<sub>L</sub>-For プライマー) (各 0.10 nmol)、dNTP 混合物 (CTP、GTP および TTP 各 0.10 μmol と ATP 0.020 μmol を含む)、MnCl<sub>2</sub> (0 または 0.50 mmol/L)、および *AmpliTaq* DNA ポリメラーゼ (5 U) を加え、error-prone PCR 用緩衝液 (全量 100 μL) 中で PCR を行った。この PCR では、熱変性 94°C (1 分)、アニーリング 50°C (1 分)、伸長 70°C (3 分) のサイクルを 25 回繰り返したのち、70°C (10 分) の伸長反応を行った。反応液を DNA 精製キット (B) に付し、変異導入率の異なる (調製時の MnCl<sub>2</sub> 濃度が異なる) 変異  $V_H$ -DNA および  $V_L$ -DNA 断片各 2 種を得た。

### 3-9 項 Overlap extension PCR による変異 CT-scFv 遺伝子ライブラリーの構築とサブクローニング

2-5 項に準じて、前項で同じ条件で得られた変異  $V_H$ -DNA 断片と変異  $V_L$ -DNA 断片を混合して overlap extension PCR を行った。反応液を DNA 精製キット (B) に付し、2 種の変異 CT-scFv 遺伝子断片を得た。その一部 (各 5 μg) を 2-2 項に準じて *Sfi* I と *Sal* I で消化し、精製したのち pEXmide 5 ベクター (同様に *Sfi* I と *Sal* I で消化し、精製したもの) と連結し、大腸菌 XL1-Blue 細胞へ導入した。2-2 項に準じて、SOC 培地中で振とう培養したのち、同様に処理し、アガープレート上に生成したコロニーを培養して、懸濁液を凍結保存用チューブに移し、変異 CT-scFv 遺伝子保持菌のライブラリー 2 種 (MnCl<sub>2</sub> を添加せず error-prone PCR を行った Mn<sub>0</sub> ライブラリーと MnCl<sub>2</sub> を添加し error-prone PCR を行った Mn<sub>0.5</sub> ライブラリー) を得た。これらについて、2-5 項に準じてグリセロール凍結保存液を調製し、-80°C で凍結保存した。

### 3-10 項 変異 CT-scFv 提示ファージライブラリーの調製とファージ力価の算定

前項の  $Mn_0$  ライブラリーと  $Mn_{0.5}$  ライブラリーのグリセロール凍結保存液 (50  $\mu$ L) を、2-10 項に準じてファージ提示を行い、得られた変異 CT-scFv 提示ファージ ( $Mn_0$  ファージライブラリーと  $Mn_{0.5}$  ファージライブラリー) を 4°C で保存した。一方で、ファージを含む大腸菌培養液上清の一部を PBS-2 で段階希釈 ( $1 \times 10^7 \sim 10^9$  倍希釈) したのち、2-10 項に準じて処理し、出現したコロニー数を計数して、CT-scFv 提示ファージの力価を求めた。

### 3-11 項 抗 CT 活性を持つ変異 scFv 提示ファージのパニングによる選択

イムノチューブに CT-BSA (100  $\mu$ g/mL) の 0.10 mol/L 炭酸緩衝溶液 (pH 8.6) (1.0 mL) を添加し、室温で 1 夜放置した。2-11 項に準じてブロッキングを行い、CT-BSA 固定化チューブを作製した。 $Mn_0$  ファージライブラリー、 $Mn_{0.5}$  ファージライブラリーをそれぞれ M-PBS-2 で希釈し (各々約  $1 \times 10^{12}$  cfu/mL)、各 1 mL を混和して CT-BSA 固定化チューブに添加し、37°C で 1 時間攪拌した。溶液を吸引除去後、T-PBS-2 で 3 回洗浄し、G-PBS-2 で希釈した CT (10 mol/mL) を 1.0 mL 添加して 4°C で 24 時間攪拌したのち、チューブに結合したファージを下記の条件で回収した。得られたファージ溶液の力価 (cfu) を 2-11 項に準じて算出し、ファージの回収率を求めた。一方、残りの感染菌を 2-11 項に準じて処理し、生成したコロニーを懸濁させたのち、懸濁液を凍結保存用チューブに移して -80°C で凍結保存した。引き続き、この感染菌懸濁液の一部を用いて、2-10 項と同様に scFv 提示ファージライブラリーの調製を行い、その一部を次のパニングに付した。これら一連の操作を 3 サイクル繰り返した。なお、CT-scFv 提示ファージライブラリーを添加したのちのチューブからのファージの溶出には、1 および 2 サイクル目は CT (10 mol/mL) を 1.0 mL 添加して 4°C で 24 時間インキュベート、3 サイクル目は CT (100 mol/mL) を 1.0 mL 添加して 4°C で 72 時間インキュベートとし、条件を順次厳しくした。

### 3-12 項 変異 CT-scFv 提示ファージクローンの調製

前項に記した 3 サイクル目のパニングで回収したファージの感染菌を塗布

して培養したアガープレートからコロニーをランダムに選択し、2-12 項に準じて処理し、変異 CT-scFv 提示ファージクローンを調製した。

### 3-13 項 ELISA による CT-scFv 提示ファージの抗 CT 活性の評価

第 1 章 2-3 項に準じて ELISA 用 96 ウェルマイクロプレートに CT-BSA 結合体 (0.10 µg/100 µL/ウェル) を固定化し、M-PBS でブロッキングを行った。このプレートに、前項で調製した CT-scFv 提示ファージを M-PBS で希釈して加え (約  $1 \times 10^{12}$  cfu/mL; 100 µL/ウェル)、PVG-PBS で希釈した CT 標準品をさらに加えて、37°C で 1 時間インキュベートした。溶液を吸引除去し、T-PBS-2 で 3 回洗浄したのち、M-PBS で 2,000 倍希釈した POD 標識抗 M13 ファージ抗体 (100 µL/ウェル) を加え、37°C で 30 分インキュベートした。T-PBS-2 で 3 回洗浄し、ウェル上の POD 活性を第 1 章 2-3 項と同様に比色測定した。

### 3-14 項 可溶型変異 CT-scFv#m1-17、54、106 の調製

前項で得られたファージ感染菌から、2-3 項に従って CT-scFv#m1-17、54、106 遺伝子が組み込まれたプラスミドを抽出した。これらを 2-16 項に記載した PCR を行って 3' 末端に終止コドンを持つ scFv 遺伝子断片に変換し、再び pEXmide 5 ベクターにサブクローニングし、大腸菌 XL1-Blue に導入した。目的遺伝子を持つことが確認されたクローンについて、2-5 項に準じて、その終濃度が 15% となるようにグリセロールを添加し、-80°C で凍結保存した。

### 3-15 項 可溶型変異 CT-scFv#m1-17、54、106 の精製

前項で得られた 3 種の大腸菌クローンについて 2-7 項に従って scFv タンパク質をペリプラズム抽出液として回収した。この抽出液を 2-7 項に従って抗 FLAG-M2 抗体結合アガロースを用いたアフィニティーカラムに付し、可溶型変異 CT-scFv#m1-17、54、106 を得た。

### 3-16 項 CT-scFv#m1-17、54、106 遺伝子の DNA 塩基配列の決定

3-14 項で得た CT-scFv#m1-17、54、106 遺伝子保持菌を培養し、2-3 項に記し

た手順に従って組換えプラスミドを調製して、DNA 塩基配列を決定し、発現される scFv タンパク質のアミノ酸配列を推定した。

### 3-17 項 可溶型 CT-scFv の SDS-PAGE とウェスタンブロッティング

3-7 項および 3-15 項で精製した CT-scFv-wt および CT-scFv#m1-54 を SDS-PAGE に付したのちブロッティングを行い、アガロース上に分離されたバンドを PVDF 膜に転写した。これらに POD 標識抗 FLAG 抗体を反応させ、1-step Ultra TMB Blotting solution を用いて酵素反応を行い、バンドを染色した。

### 3-18 項 CT-scFv#m1-54 の分子モデリング

3-16 項で推定した CT-scFv#m1-54 のアミノ酸配列を SWISS-MODEL サーバー (<https://swissmodel.expasy.org/>)<sup>84)</sup> に送信し、タンパク質立体構造のモデリングデータを得たのち、SWISSDOCK サーバー (<http://www.swissdock.ch>)<sup>85)</sup> に送信し、CT との複合体の立体構造を予測した。

### 3-19 項 可溶型 CT-scFv の CT 結合能の評価

第 1 章 2-3 項に準じて、ELISA 用 96 ウェルマイクロプレートに CT-BSA 複合体を固定化し、溶液を吸引除去してプレートを PBS で 3 回洗浄し、1% Block Ace を分注 (300  $\mu$ L/ウェル) して、37°C で 1 時間放置した。溶液を吸引除去してプレートを T-PBS で 3 回洗浄し、抗原固定化プレートを得た。このプレートに、PVG-PBS で希釈して調製した CT-scFv (100  $\mu$ L/ウェル) と CT 標準品 (過塩素酸塩として添加<sup>30)</sup>) もしくは類縁化合物 (50  $\mu$ L/ウェル) を加え、37°C もしくは 4°C で、1、2 もしくは 4 時間反応させた。溶液を吸引除去し、T-PBS で 3 回洗浄したのち、POD 標識抗 FLAG M2 抗体 (0.50  $\mu$ g/100  $\mu$ L/ウェル) を加え、37°C で 30 分反応させた。T-PBS で 3 回洗浄したのち、ウェル上の POD 活性を第 1 章 2-3 項と同様に比色測定した。なお、CT 標準品および類縁化合物の各濃度における反応は 2 ウェル (2 重測定) または 4 ウェル (4 重測定) で行い、その平均値を用いてデータ処理を行った。

### 3-20 項 最適化した ELISA によるヒト尿中 CT の測定

ブランク尿 (CT 含量が LC-MS 測定により 1 ng/mL 以下と判明しているもの) として非喫煙の両親と住む子供 3 人の混合尿を用いた。前項同様に CT-BSA 結合体を固定化したマイクロプレートに、PVG-PBS で希釈した CT-scFv (100  $\mu$ L/ウェル) と 10% ブランク尿を含む PVG-PBS で希釈した CT 標準品 (過塩素酸塩として添加<sup>30)</sup>) (50  $\mu$ L/ウェル) を加えて混合し、4°C で 2 時間反応させた。溶液を吸引除去し、T-PBS で 3 回洗浄したのち、POD 標識抗 FLAG M2 抗体 (0.50  $\mu$ g/100  $\mu$ L/ウェル) を加え、37°C で 30 分反応させた。T-PBS で 3 回洗浄したのち、ウェル上の POD 活性を第 1 章 2-3 項と同様に比色測定した。なお、CT 標準品の各濃度における反応は 2 ウェル (2 重測定) で行い、その平均値を用いてデータ処理を行った。

## 引用文献

- 1) 平成 29 年警察白書、[https://www.npa.go.jp/hakusyo/h29/pdf/pdf/08\\_dai4syo.pdf](https://www.npa.go.jp/hakusyo/h29/pdf/pdf/08_dai4syo.pdf)
- 2) 平成 27 年における薬物・銃器情勢 [http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/iyakuhin/yakubutsuranyou\\_taisaku/toukei\\_chousa/dl/h27\\_yakubutsu\\_jousei.pdf](http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/iyakuhin/yakubutsuranyou_taisaku/toukei_chousa/dl/h27_yakubutsu_jousei.pdf)
- 3) Hukkanen J., Jacob III P., Benowitz N. L., *Pharmacol. Rev.*, **57**, 79-115 (2005).
- 4) Watts R. R., Langone J. J., Knight G. J., Lewtas J., *Environ. Health Perspect.*, **84**, 173-182 (1990).
- 5) Haufroid V., Lison D., *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **71**, 162-168 (1998).
- 6) Bjerkke R. J., Hammond D. K., Strobel H. W., Langone J. J., *Drug Metab. Dispos.*, **18**, 759-764 (1990).
- 7) 「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).
- 8) Wong R. C., Tse H. Y., "Lateral Flow Immunoassay", Humana Press, New York, (2009).
- 9) Nakashima K., *J. Health Sci.*, **51**, 272-277 (2005).
- 10) Hoogenboom H. R., *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1105-1116 (2005).
- 11) 小林典裕、臨床化学、**38**、457-458 (2009).
- 12) Kobayashi N., Oyama H., *Analyst*, **136**, 642-651 (2011).
- 13) 「薬毒物試験法と注解 2017」、日本薬学会編、東京化学同人 (2017).
- 14) 「乱用薬物の化学」、井上堯子、東京化学同人 (2003).
- 15) Erlanger B. F., *Methods Enzymol.*, **70**, 85-104 (1980).
- 16) Hurn B. A. L., Chanter S. M., *Methods Enzymol.*, **70**, 104-142 (1980).
- 17) Protein Data Bank, 4F5S.
- 18) Köhler G., Milstein C., *Nature*, **256**, 495-497 (1975).
- 19) 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).
- 20) Wohlfarth A., Mahler H., Auwärter V., *J. Chromatogr. B*, **879**, 3059-3064 (2011).
  - 21) Sharma P., Murthy P., Bharath M. M. S., *Iran J. Psychiatry*, **7**, 149-156 (2012).
  - 22) Ujváry I., Grotenhermen F., *Cannabinoids*, **9**, 1-8 (2014).
  - 23) Abe R., Ohashi H., Iijima I., Ihara M., Takagi H., Hohsaka T., Ueda H., *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 17386-17394 (2011).
  - 24) Abe R., Jeong H. J., Arakawa D., Dong J., Ohashi H., Kaigome R., Saiki F., Yamane K., Takagi H., Ueda H., *Sci. Rep.*, **4**, 4640 (2014).
  - 25) Ullman E. F., Milburn G., Jelesko J., Radika K., Pirio M., Kempe T., Skold C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 1184-1189 (1993).
  - 26) Qi L., Yamamoto N., Meijler M. M., Altobelli L. J. III, Koob G. F., Wirsching P., Janda K. D., *J. Med. Chem.*, **48**, 7389-7399 (2005).
  - 27) Köhler G., Howe S.C., Milstein C., *Eur. J. Immunol.*, **6**, 292-295 (1976).
  - 28) Kobayashi N., Sun P., Fujimaki Y., Niwa T., Nishio T., Goto J., Hosoda H., *Anal. Sci.*, **18**, 1309-1314 (2002).
  - 29) Oyama H., Morita I., Kiguchi Y., Miyake S., Moriuchi A., Akisada T., Niwa T., Kobayashi N., *Anal. Chem.*, **87**, 12387-12395 (2015).
  - 30) Kobayashi N., Banzono E., Shimoda Y., Oyama H., Kunihiro T., Morita I., Ohta M., *Anal. Methods*, **3**, 1995-2002 (2011).
  - 31) Liu Y., Lin D., Wu B., Zhou W., *Brain Res. Bull.*, **126**, 68-73 (2016).
  - 32) Han E., Kwon N. J., Feng L.-Y., Li J.-H., Chung H., *Forensic Sci. Int.*, **268**, 25-34 (2016).
  - 33) Mion G., Villevieille T., *CNS Neurosci. Ther.*, **19**, 370-380 (2013).
  - 34) White P. F., Ham J., Way W. L., Trevor A. J., *Anesthesiology*, **52**, 231-239 (1980).
  - 35) WHO. Critical review of Ketamine. *Expert Comm. Drug Depend.*, 1-30 (2002).
  - 36) Huang M.-H., Wu M.-Y., Wu C.-H., Tsai J.-L., Lee H.-H., Liu R. H., *Clin. Chim. Acta*, **379**, 59-65 (2007).
  - 37) <http://toxicology.neogen.com/en/ketamine-forensic>

- 38) <http://www.rapidtest.com/index.php?i=Drug-Tests&id=643&cat=24>
- 39) [http://immunalysis.com/wp-content/uploads/2014/10/Ketamine\\_HEIA\\_MKT-1075A\\_3.pdf](http://immunalysis.com/wp-content/uploads/2014/10/Ketamine_HEIA_MKT-1075A_3.pdf)
- 40) McConnell R. I., Benchikh E., Fitzgerald S. P., Lamont J. V., U.S. Patent 20030224447 (2003).
- 41) Habeeb A. F. S. A., *Anal. Biochem.*, **14**, 328-336 (1966).
- 42) Foote J., Eisen H. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 10679-10681 (2000).
- 43) Fukumoto K., Toki H., Iijima M., Hashihayata T., Yamaguchi J., Hashimoto K., Chaki S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **361**, 9-16 (2017).
- 44) Yang C., Shirayama Y., Zhang J.-C., Ren Q., Yao W., Ma M., Dong C., Hashimoto K., *Transl. Psychiatry*, **5**, e632 (2015).
- 45) Zanos P., Moaddel R., Morris P. J., Georgiou P., Fischell J., Elmer G. I., Alkondon M., Yuan P., Pribut H. J., Singh N. S., Dossou K. S. S., Fang Y., Huang X. -P., Mayo C. L., Wainer I. W., Albuquerque E. X., Thompson S. M., Thomas C. J., Zarate Jr C. A., Gould T. D., *Nature*, **533**, 481-486 (2016).
- 46) Hecht S. S., *J. Natl. Cancer Inst.*, **91**, 1194-1210 (1999).
- 47) Hecht S. S., *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 733-744 (2003).
- 48) Law M. R., Morris J. K., Wald N. J., *BMJ [Br. Med. J.]*, **315**, 973-980 (1997).
- 49) Tong E. K., Glantz S. A., *Circulation*, **116**, 1845-1854 (2007).
- 50) Mearns B. M., *Nat. Rev. Cardiol.*, **7**, 413 (2010).
- 51) Strachan D. P., Jarvis M. J., Feyerabend C., *Am. Rev. Respir. Dis.*, **142**, 147-151 (1990).
- 52) Environmental Protection Agency for Research on Cancer (IARC), IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, in *Tabacco Smoke and Involuntary Smoking*, WHO/IARC, Lyon, vol. 83, pp. 1-1452 (2004).
- 53) Yildiz D., *Toxicon*, **43**, 619-632 (2004).
- 54) 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).
- 55) Hayafuji C., Isogai S., Watanabe Y., Kuboyama I., Maruyama K., Yano K.,

- Yoshida Y., *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Inst. P. H.*, **55**, 235-239 (2004).
- 56) Benowitz N. L., Dains K. M., Dempsey D., Herrera B., Yu L., Jacob III P., *Nicotine Tab. Res.*, **11**, 954-960 (2009).
  - 57) Dhar P., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **35**, 155-168 (2004).
  - 58) Llaquet H., Pichini S., Joya X., Papaseit E., Vall O., Klein J., Garcia-Algar O., *Anal. Bioanal. Chem.*, **396**, 379-399 (2010).
  - 59) Bjercke R. J., Cook G., Langone J. J., *J. Immunol. Methods*, **96**, 239-246 (1987).
  - 60) Langone J. J., Cook G., Bjercke R. J., Lifschitz M. H., *J. Immunol. Methods*, **114**, 73-78 (1988).
  - 61) Langone J. J., Bjercke R. J., *Anal. Biochem.*, **182**, 187-192 (1989).
  - 62) Yoshioka N., Dohi Y., Yonemasu K., *Environ. Health Prev. Med.*, **3**, 12-16 (1998).
  - 63) Galanti L. M., Dell'O. J., Vanbeckbergen D., Dubois P., Masson P. L., Cambiaso C. L., *Clin. Chem. Lab. Med.*, **37**, 729-734 (1999).
  - 64) Wielkoszyński T., Tyrpień K., Szumska M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **49**, 1256-1260 (2009).
  - 65) Park S., Lee D.-H., Park J.-G., Lee Y. T., Chung J., *Clin. Chim. Acta*, **411**, 1238-1242 (2010).
  - 66) Matsumoto A., Ino T., Ohta M., Otani T., Hanada S., Sakuraoka A., Matsumoto A., Ichiba M., Hara M., *Environ. Health Prev. Med.*, **15**, 211-216 (2010).
  - 67) Chappey O. N., Sandouk P., Scherrmann J.-M. G., *Pharm. Res.*, **9**, 1375-1379 (1992).
  - 68) Chappey O., Debray M., Niel E., Scherrmann J. M., *J. Immunol. Methods*, **172**, 219-225 (1994).
  - 69) Bjercke R. J., Cook G., Rychlik N., Gjika H. B., Van Vunakis H., Langone J. J., *J. Immunol. Methods*, **90**, 203-213 (1986).
  - 70) Renard M., Belkad L., Hugo N., England P., Altschuh D., Bedouelle H., *J. Mol. Biol.*, **318**, 429-442 (2002).
  - 71) Renard M., Belkadi L., Bedouelle H., *J. Mol. Biol.*, **326**, 167-175 (2003).

- 72) Kobayashi N., Iwakami K., Kotoshiba S., Niwa T., Kato Y., Mano N., Goto J., *Anal. Chem.*, **78**, 2244-2253 (2006).
- 73) Oyama H., Tanaka E., Kawanaka T., Morita I., Niwa T., Kobayashi N., *Anal. Chem.*, **85**, 11553-11559 (2013).
- 74) Kobayashi N., Oyama H., Kato Y., Goto, J., Söderlind E., Borrebaeck C. A. K., *Anal. Chem.*, **82**, 1027-1038 (2010).
- 75) Oyama H., Yamaguchi S., Nakata S., Niwa T., Kobayashi N., *Anal. Chem.*, **85**, 4930-4937 (2013).
- 76) Nicholls P. J., Johnson V. G., Blanford M. D., Andrew S. M., *J. Immunol. Methods*, **165**, 81-91(1993).
- 77) Jones S. T., Bendig M. M., *Biotechnology*, **9**, 88-89 (1991).
- 78) Frohman M. A., Dush M. K., Martin G. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 8998-9002 (1988).
- 79) 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).
- 80) Knappik A., Plückthun A., *Biotechniques*, **17**, 754-761(1994).
- 81) Jirholt P., Ohlin M., Borrebaeck C. A. K., Söderlind E., *Gene*, **215**, 471-476 (1998).
- 82) Kobayashi N., Shibahara K., Ikegashira K., Shibusawa K., Goto J., *Steroids*, **67**, 733-742 (2002).
- 83) Leung D. W., Chen E., Goeddel D. V., *Technique*, **1**, 11-15 (1989).
- 84) Guex N., Diemand A., Peitsch M. C., *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 364-367 (1999).
- 85) Grosdidier A., Zoete V., Michielin O., *Nucleic Acids Res.*, **39** (Suppl.), W270-W277 (2011).
- 86) Fitzpatrick J., Lenda R., World Intellectual Property Organization Publication No. WO99/13907 (1999).
- 87) Schepers G., Walk R.-A., *Arch. Toxicol.*, **62**, 395-397 (1988).

- 88) Finlay W. J. J., Almagro J. C., *Front. Immunol.*, **3**, No.342 (2012).
- 89) Lara-Ochoa F., Almagro J. C., Vargas-Madrado E., Conrad M., *J. Mol. Evol.*, **43**, 678-684 (1996).
- 90) 若林克己, 生化学実験講座 16 ホルモン (上), 東京化学同人, 158-171 (1997).
- 91) Boder E.T., Midelfort K. S., Wittrup K. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 10701-10705 (2000).
- 92) 石川栄治, 河合忠、宮井潔編, 酵素免疫測定法(第2版), 医学書院, 143-151 (1978).
- 93) Goodrow M. H., Sanborn J. R., Stoutamire D. W., Gee S. J., Hammock B. D., *Immunoanalysis of Agrochemicals*, **586**, 119-139 (1995).
- 94) Carlson R. E., *Immunoanalysis of Agrochemicals*, **586**, 140-152 (1995).
- 95) Oyama H., Morita I., Kiguchi Y., Morishita T., Fukushima S., Nishimori Y., Niwa T., Kobayashi N., *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 2191-2198 (2017).
- 96) Miyazaki C., Iba Y., Yamada Y., Takahashi H., Sawada J., Kurosawa Y., *Protein Eng. Des. Sel.*, **12**, 407-415 (1999).
- 97) Sambrook J., Russell D. W., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual Third Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. (2001).
- 98) Kobayashi N., Oiwa H., Goto J., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **64**, 171-177 (1998).