

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790632

研究課題名（和文） 抗体工学的アプローチによる新世代受動喫煙評価システムの開発

研究課題名（英文） Development of a "new generation" monitoring system of passive smoking based on antibody engineering approach

研究代表者

森田 いずみ（MORITA IZUMI）

神戸薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：20299085

研究成果の概要（和文）：我々は先に、モノクローナル抗コチニン抗体を産生するハイブリドーマを樹立し、その"野生型" scFvを調製している。このscFv遺伝子を鋳型として、変異scFv遺伝子ライブラリーを作製し、ELISAから判断して、より親和力が高いscFvクローンを得た。これらを用いる競合型ELISAの条件を最適化して、用量作用曲線を作成したところ、50%阻害値は0.2 ng/assayであり、マウス抗体を用いた従来のELISA と比べて大幅な高感度化に成功した。本アッセイ系は、ヒト尿中コチニンの直接測定も可能で、受動喫煙のモニタリングに有用と期待される。

研究成果の概要（英文）：We previously established a hybridoma clone which produces an anti-cotinine antibody and "wild type" scFv is prepared by combining the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains of the antibody. Using this scFv gene as a template, a variety of scFv gene library is produced, from which a scFv clones with a higher affinity were obtained. The conditions of competitive ELISA using these scFvs are optimized, and consequently, the assay sensitivity was largely improved compared with the conventional ELISA using a mouse antibody. This assay system was applicable to the determination of human urinary cotinine levels, and is expected to be useful for monitoring of passive smoking.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：抗体工学，受動喫煙，バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

周知のように、喫煙は様々な生活習慣病の原因の1つであり、喫煙者自身の能動喫煙にとどまらず、非喫煙者が環境中タバコ煙を吸入する受動喫煙が問題視されている。

ごく最近、受動喫煙が原因で死亡する人が国内で年間約 6,800 人に上る、との推計が厚生労働省から発表された。タバコ煙に暴露されることは非喫煙者にとって不快であるだけでなく、がん、心臓疾患および呼吸

器系疾患などのリスクが高まるため、受動喫煙防止への取り組みは喫煙の社会的課題である。ニコチンはタバコ煙中の代表的な有害物質として知られるが、その尿中主代謝物であるコチニンと *trans*-3'-ヒドロキシコチニンはタバコ煙曝露量を評価する客観的指標として最適であるため、両者の合計値を簡便、迅速にモニタリングする方法の開発が望まれる。免疫測定法は、試料の直接測定が可能で、簡便、迅速に多数の検体の測定が可能な利点があるため、コチニンの免疫測定法がこれまで種々開発されてきた。しかし、従来のコチニン免疫測定法には改善すべき点が少ない。まず、いずれもポリクローナル抗体（抗血清）を用いたものであり、アッセイ系の標準化に有利なモノクローナル抗体を利用することが望まれる。しかしながら、コチニンは分子量が非常に小さいため（176.21）、親和力、特異性ともに優れるモノクローナル抗体の樹立が極めて難しい。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の問題点を克服するために、抗体の遺伝子操作（抗体工学）を駆使してこれら両代謝物に群特異的で、いずれにも高い親和性を示す理想的な変異抗体を人為的に創製する。得られた抗体をキー試薬として、精度のよい定量を目的とする競合型 ELISA とイムノクロマトグラフィーのシステムを構築する。そして、尿試料に  $\beta$ -グルクロニダーゼを働かせてコチニン *N*-グルクロニドと 3'-OH-コチニン *O*-グルクロニドを定量的に脱抱合したのちに、コチニンと 3'-OH-コチニンの総量をこれらの

システムで定量する標準プロトコルを確立する。これらを用いて、タバコ煙曝露量を簡便かつ確実に評価するシステムを構築し、喫煙障害問題への取り組みに分析化学の立場から貢献する。

## 3. 研究の方法

我々は先に、低親和力 ( $K_a = 4 \times 10^6$  L/mol) ながら、マウス抗コチニン抗体を産生するハイブリドマクローンを樹立した。さらに、その遺伝子をクローニングし、“野生型” scFv を調製している。この抗コチニン野生型 scFv 遺伝子について error-prone PCR により *VH* 及び *VL* の全域を増幅し、変異 *VH* 及び *VL* を調製する。このとき、error-prone PCR 条件に工夫 (dNTPs のバランスの調整など) を加え、従来法よりも偏りの少ないランダムな変異の導入を検討する。変異 *VH* 及び *VL* を overlap extension PCR により連結して、それらをシャッフリングしつつ再結合して変異 scFv ライブラリーを構築する。これを変異 scFv 遺伝子ライブラリーを適当なファージミドベクターに組み込んだのち、大腸菌にトランスフォーメーションし、ヘルパーファージを感染させて、ファージ提示したのち、複数の選択法を組み合わせて、コチニンとその代謝物である 3'-OH-コチニンのいずれにも高い親和性を示す scFv 提示ファージクローンを単離する。引き続き scFv を可溶性タンパク質として調製し、これを用いて ELISA とイムノクロマトグラフィーのシステムを構築する。その一方で、ヒト尿試料中のグルクロン酸抱合型コチニン代謝物の酵素水解の条件を確立する。酵素処理検体を上記のシステムに付して各種の試験を行い、実試料測定に関するバリデーションを行う。

#### 4. 研究成果

上記の野生型 scFv 遺伝子を鋳型として、error-prone PCRにより変異 V<sub>H</sub>及び V<sub>L</sub>の調製を行った。これら変異 V<sub>H</sub>及び V<sub>L</sub>を overlap extension PCRにより連結して、変異 scFv 遺伝子ライブラリーを作製し、ファージ提示を行った。このライブラリーから、出発物質であるマウス抗体よりも高い親和力を示す scFv 提示ファージクローンについて、固定化コチニンに対するパンニングにより選択した。得られた "improved binder" の scFv 遺伝子を鋳型として、さらに変異の導入と選択を行い、ELISAから判断して、より親和力が高い2種の scFv クローンを得た。これら改良型 scFv を用いる競合型 ELISA の条件を最適化して、ヒト尿中 CT の測定を試みた。その感度を比較したところ、いずれも 0.2 ng/assay であり、マウス抗体を用いた ELISA (midpoint 5.3 ng/assay) と比べて大幅な高感度化に成功した。この ELISA について、受動喫煙モニタリング法としての有用性を評価すべく、ヒト尿試料の添加による感度への影響を調べたところ、midpoint はそれぞれ 0.3, 0.4 ng/assay であり、実用的な感度が十分に保たれていた。健常ヒト尿 200 検体の測定を行ったところ、ポリクローナル抗体による既存の測定キットとよく符合する結果が得られた。

改良型 scFv を用いることにより ELISA を高感度化することに成功し、受動喫煙下限レベル (5~10 ng/mL 程度) の測定が可能になった。本アッセイ系は、受動喫煙のモニタリングに有用と期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kobayashi N., Banzono E., Shimoda Y., Oyama H., Kunihiro T., Morita I., Ohta M.,

A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for human urinary cotinine to monitor tobacco smoke exposure, *Analytical Methods*, 3(9), 1995-2002, 2011. 査読有. DOI: 10.1039/c1ay05083d

- ② Koyama J., Taga S., Shimizu K., Shimizu, M., Morita I., Takeuchi A., Simultaneous determination of histamine and prostaglandin D2 using an LC-ESI-MS/MS method with positive/negative ion-switching ionization modes: application to the study of anti-allergic flavonoids on the degranulation of KU812 cells, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(4), 1385-1392, 2011. 査読有 DOI: 10.1007/s00216-011-5200-3

[学会発表] (計 4 件)

- ① 守川 耕平, 信川 真智子, 信川 真貴子, 信川 京子, 森田 いずみ, 清水 香衣, 小山 淳子, 「*Taxus yunnanensis* 含有成分の抗アレルギー活性とがん予防効果について」, 日本薬学会第132年会, 2012.03.30, 札幌.
- ② 森田 いずみ, 大山 浩之, 石井 香好, 渡部 芳郎, 太田 光熙, 小林 典裕, 「実用診断試薬を創出する試験管内分子進化 (4). 抗コチニン変異 scFv の諸性質」, 日本薬学会第132年会, 2012.03.29, 札幌.
- ③ 大山 浩之, 寺本 隆佑, 宮岡 広子, 森田 いずみ, 小林 典裕, 「部位特異的変異導入による抗コチニン scFv の試験管内親和性成熟の試み」, 日本分析化学会第60年会, 2011.09.15, 名古屋.
- ④ 森田 いずみ, 久保 智士, 大山 浩之, 小林 典裕, 「高親和力変異抗コチニン抗体の単離に用いる cleavable ビオチン標識体の合成と性質」, 日本薬学会第131年会, 2011.03.29, 静岡.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 いずみ (MORITA IZUMI)

神戸薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：20299085

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし