



# Molecular and immunochemical studies on monoclonal antibodies specific to environmental chemicals

西, 甲介

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Date of Publication)

2010-06-30

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2867

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002867>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 3 1 5 】

氏 名 ・(本 籍)            西   甲 介                            ( 兵 庫 県 )

博士の専攻分野の名称    博士 ( 農 学 )

学 位 記 番 号            博い第74号

学位授与の 要 件        学位規則第 4 条第 1 項該当

学位授与の 日 付        平成 1 5 年 3 月 3 1 日

【 学位論文題目 】

Molecular and Immunochemical Studies on  
Monoclonal Antibodies Specific to Environmental Chemicals  
(環境負荷化学物質に特異的なモノクローナル抗体の  
分子及び免疫化学的研究)

審 査 委 員

主 査 教 授 大川 秀郎  
          教 授 深見 泰夫  
          教 授 佐々木 満

## &lt;第1章 緒論&gt;

環境負荷化学物質、即ち、環境において安定で長期に残留して生態系を通じて汚染が拡大し、しかも、生態系や人の健康に影響を与えることが心配されている化学物質には、ダイオキシン類、内分泌攪乱化学物質、ある種の残留農薬などがある。これら化学物質の環境及び農水畜産物の汚染の拡大は深刻な問題であり、これらの分布や動態、農水畜産物での残留を把握することは生態系への影響及び人の健康に関するリスク評価を行う上で極めて重要である。ダイオキシン類、内分泌攪乱化学物質などは環境において ppt~ppb レベルあるいはそれ以下の極低濃度で検出され、また、残留農薬は ppb~ppm またはそれ以下で環境試料・農水畜産物などにおいて測定される。現在、環境負荷化学物質のモニタリングは広範囲にわたる多数の試料採取とそれら試料の機器分析によって実施されている。機器分析は感度・精度が優れており、環境負荷化学物質のように極低濃度で、しかも土壌、水系、大気、生物種、農水畜産物などの広範囲に分布している化学物質の測定には最も適した方法である。しかしながら、設備と熟練を必要とし、試料の前処理に時間がかかり、しかも分析機関が限られており、経費が高い。そこで、従来の機器分析とは別に、簡便、迅速、高感度で、しかも経済的なモニタリング方法が求められている。ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)法は抗原と抗体の反応の特異性に基づき、極めて高感度であり、また、目的の化学物質を試料から分離・精製することなく、あるいは最小限の前処理によって迅速かつ簡便に測定することができ、有機溶媒の使用量を抑えられる。また、高価な機器を必要としないため経済的であり、本手法の用途開発が期待されている。しかしながら、環境負荷化学物質などの低分子化合物の測定においては試料に存在するマトリックス、ミセルなどの効果を受け易く、精度や感度の低下の原因となっている。また、ハプテン抗体の使用においては関連化合物との交叉反応性が問題となる。本研究では、環境負荷化学物質に特異的なモノクローナル抗体及びそれらに対する遺伝子組換え抗体を調製して、高感度 ELISA 法を確立するとともに、抗体の構造と反応特性、特に、抗体分子間及び抗原と抗体の相互作用を明らかにした。

## &lt;第2章 有機リン系殺虫剤マラチオンに対する抗体&gt;

有機リン系殺虫剤マラチオンは収穫後の小麦等に処理されるポストハーベスト農薬として最も多く使用されていることから輸入農産物に残留している可能性は高く、それをモニタリングすることは食糧の安全性を確保する上で重要である。しかしながら、その構造に芳香環などが含まれないことから抗体調製が困難であった。そこで、各種ハプテンを免疫することによって2種の抗マラチオンモノクローナル抗体を取得し、それらを用いた ELISA 法を確立した。本研究では、この2種のモノクローナル抗体の一本鎖可変領域抗体(single-chain variable fragment; scFv)遺伝子を構築してそれらを大腸菌に発現させ、産生した scFv 抗体の反応性を ELISA 法により測定した。

抗マラチオンモノクローナル抗体 MLT2-23 および MLT40-4 を産生する2種のハイブリドーマ細胞株からそれぞれ mRNA を抽出し、cDNA ライブラリーを構築してそれから2種の抗マラチオンモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする cDNA クローンを各々単離し、塩基配列を決定した。重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)に相当する cDNA をリンカー(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> で連結し、アミノ末端側から VH、リンカー、VL の順につないだ HL 型と VL、リンカー、VH の順につないだ LH 型の2種の scFv 遺伝子を構築した。それらを大腸菌に導入し、生成した scFv 抗体を用いた ELISA において、MLT2-23scFv は HL 型と LH 型が共にマラチオンに対して親モノクローナル抗体と同等の反応性を示した。一方、MLT40-4scFv の HL 型はマラチオンに対する反応性が低かったが、LH 型は親モノクローナル抗体と同等の反応性を示し、VH と VL の結合の順序の入れ替えによって抗原抗体反応に著しい変化が生じることを明らかにした。

## &lt;第3章 ビスフェノール A(BPA)に対する抗体&gt;

BPA はポリカーボネート及びエポキシ樹脂の原材料であり、内分泌攪乱作用を示すことから水資源における BPA をモニタリングしたところ、日本の多くの河川において ppt から ppb レベルで検出された。そこで、BPA の ELISA 法を開発する目的でこれまでに6種の抗 BPA モノクローナル抗体を調製し、これらを用いた ELISA 法を確立した。本研究では、それらのうち4種の抗 BPA モノクローナル抗体について組換え抗体を調製し、それらの反応性を ELISA 法で評価した。

抗 BPA モノクローナル抗体 BBA-2187、BBA-2617、BKE-3430 及び BTE-3456 とそれらに対する組換え抗体を調製し、高感度 ELISA 法を確立した。次いで、各々産生する4種のハイブリドーマ細胞株から 5'-RACE 法により、各抗体の可変領域に相当する cDNA を各々クローニングし、塩基配列を決定した。HL 型の scFv 抗体遺伝子を各抗体について構築し、発現ベクター pET-27b に挿入して大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株に発現させ、ELISA に供した。その結果、4種の scFv 抗体の ELISA における BPA の測定感度は、相当する親モノクローナル抗体と同等であった。4種のうち BBA-2187scFv が BPA に対して最も高感度であり、その IC<sub>50</sub> 値は 0.32ng/mL であった。それに比べて、BBA-2187 の IC<sub>50</sub> 値は 0.59ng/mL であった。BBA-2187scFv は BBA-2187 と同等の交叉反応性を示した。BBA-2187 の VH と VL の両ドメインを別個に調製し、両者を ELISA に供すると互いに結合し、BPA と反応した。また、BBA-2187 の VH は BBA-2617 の VL 及び BTE-3456 の VL と会合して BPA と反応したが、BBA-2187 の VL は他の VH と会合しなかった。4種の抗体の一次構造の比較により、BBA-2187 の VL の2番目のフレームワーク領域の長さが通常の IgG の VL に比べて1アミノ酸残基短い特徴的な構造であることが判明し、この構造が BBA-2187 の抗原との高い親和性並びに BBA-2187 の VH との特異的相互作用に重要であることが示唆された。

## &lt;第4章 アルキルフェノールエトキシレート(APEO)に対する抗体&gt;

APEO は非イオン系界面活性剤で、工業用洗剤や農薬の製剤等に用いられている。APEO

(氏名: 西 甲介 No. 3)

は環境での生分解によってアルキルフェノール(AP)を生成し、AP は水生生物に対して毒性及び内分泌攪乱作用を示す。APEO の幅広い使用状況から、これら化学物質の環境モニタリングは重要である。これまでに、APEO に特異的なモノクローナル抗体 MOF3-139 及び AP と APEO に交叉反応するモノクローナル抗体 AP-14 を用いた ELISA 法が開発されている。本研究では、各モノクローナル抗体の scFv を調製し、それらの反応性を ELISA 法で測定して抗原抗体反応の特異性の解明を試みた。

AP-14 及び MOF3-139 の HL 型の scFv 抗体を調製し、ELISA 法により反応性を測定した。標準物質にはノニルフェノールデカエトキシレートを(NP10EO)を用いた。その結果、MOF3-139 の NP10EO に対する IC<sub>50</sub> 値は 27ng/mL であり、MOF3-139scFv は 33ng/mL であった。同様に、AP-14 の IC<sub>50</sub> 値は 41ng/mL で、AP-14scFv は 48ng/mL であった。交叉反応性を測定した結果、AP-14 及び AP-14scFv はノニルフェノキシ酢酸(NP1EC)とノニルフェノール(NP)に交叉反応したが、MOF3-139 及び MOF3-139scFv の交叉反応性は低かった。そこで、両抗体の VH と VL を入れ替えた組換え型 scFv 抗体を調製し交叉反応性を測定した。その結果、VH が特異性には重要であることが示唆された。MOF3-139scFv の VH の相補性決定領域(HCDR)を AP-14 の相当する領域で置換した scFv 抗体の反応性を ELISA で測定した。その結果、AP-14 の HCDR1 は NP1EC との交叉反応に、HCDR2 は NP との交叉反応に関与していると示唆された。そこで、MOF3-139 の CDR1 と CDR2 について AP-14 の相当するアミノ酸残基で一残基置換した scFv 抗体の反応性を ELISA で測定した。その結果、AP-14 の 33 番目のスレオニンと 35 番目のヒスチジンが NP1EC の反応性に、57 番目のアスパラギン酸と 59 番目グルタミン酸が NP との反応性に関与していることが示唆された。

<第5章 結論>

本研究は環境負荷化学物質としての殺虫剤マラチオン、工業化学品 BPA と APEO を対象とし、それらに特異的なモノクローナル抗体と scFv 抗体を作製し、高感度 ELISA 法を確立した。scFv 抗体は抗原に対して相当する親モノクローナル抗体と同等の反応性・特異性を示し、また、組換え体大腸菌の培養によって、従来のモノクローナル抗体に比べてはるかに迅速かつ容易に大量生産ができた。よって、大量の scFv 抗体は ELISA はもとよりイムノアフィニティークロマトグラフィーやイムノセンサーへの応用が期待できる。一方、VH と VL を組合せることによって、VH と VL の相互作用に重要な領域、さらには抗原との反応に重要なアミノ酸残基を特定することができた。以上の結果から、環境負荷化学物質に特異的なモノクローナル抗体、とりわけ scFv 抗体について抗原抗体反応の反応性や特異性をデザインする基盤技術を確立することができ、環境負荷化学物質のモニタリング技術の向上に貢献することができた。

氏名	西 甲介		
論文題目	Molecular and Immunochemical Studies on Monoclonal Antibodies Specific to Environmental Chemicals (環境負荷化学物質に特異的なモノクローナル抗体の分子及び免疫化学的研究)		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	大川 秀郎
	副査	教授	深見 泰夫
	副査	教授	佐々木 満
	副査		

要旨

要旨

環境負荷化学物質、即ち、環境において安定で長期に残留して生態系を通じて汚染が拡大し、しかも、生態系や人の健康に影響を与えることが心配されている化学物質には、ダイオキシン類、内分泌攪乱化学物質、ある種の残留農薬などがある。これら化学物質の環境及び農水畜産物の汚染の拡大は深刻な問題であり、これらの分布や動態、農水畜産物での残留を把握することは生態系への影響及び人の健康に関するリスク評価を行う上で極めて重要である。現在、環境負荷化学物質のモニタリングは広範囲にわたる多数の試料採取とそれら試料の機器分析によって実施されている。機器分析は感度・精度に優れているが、設備と熟練を必要とし、時間が掛かり、経費が高い。そこで、簡便、迅速、高感度で、しかも、経済的なモニタリング方法が求められている。ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法は抗原と抗体の反応の特異性に基づき、高感度で、また、目的の化学物質を試料から分離・精製することなく、簡便かつ迅速に測定することができ、有機溶媒の使用量を抑えられる。しかしながら、環境負荷化学物質などの低分子化合物の測定においては試料に存在するマトリックス、ミセルなどの効果を受け易く、精度や感度の低下の原因となっている。また、ハプテン抗体の使用においては関連化合物や代謝物などとの交叉反応性が問題となる。本研究では、環境負荷化学物質に特異的なモノクローナル抗体及びそれらに対する遺伝子組換え抗体を調製して、高感度 ELISA 法を確立するとともに、抗体の構造と反応特性、特に、抗体分子間及び抗原と抗体の相互作用などを分子レベルで明らかにした。

第1章では、環境負荷化学物質などのモニタリングの重要性、これまでに開発された生物機能に基づくモニタリング手法の特徴についてまとめ、特に、ELISA による様々な環境負荷化学物質などに対するモニタリング法の開発及びその利便性と問題点並びに今後の発展性について述べた。

第2章では、ポストハーベスト農薬として重要な有機リン系殺虫剤マラチオンについて特異的な2種のモノクローナル抗体(MLT2-23 及び MLT40-4)を用いた ELISA を確立した。次いで、モノクローナル抗体を産生する2種のハイブリドーマ細胞株からそれぞれ mRNA を抽出し、それから2種の抗マラチオンモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする cDNA クローンを取得し、塩基配列を決定した。次いで、重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)に相当する cDNA をリンカー(Gly,Ser)で連結し、アミノ末端側から VH、リンカー、VL の順につないだ HL 型と VL、リンカー、VH の順につないだ LH 型の2種の scFv 遺伝子を構築した。それらを大腸菌に導入し、生成した scFv 抗体を用いた ELISA において、MLT2-23scFv は HL 型と LH 型が共にマラチオンに対して親モノクローナル抗体と同等の反応性を示した。一方、MLT40-4scFv の HL 型はマラチオンに対する反応性が低かったが、LH 型は親モノクローナル抗体と同等の反応性を示し、

氏名	西 甲介
<p>抗体の種類によっては VH と VL の結合の順序の入れ替えによって抗原抗体反応に著しい変化が生じることを明らかにした。</p>	
<p>第 3 章では、環境ホルモン作用を示す工業化学品ビスフェノール A に特異的な 4 種のモノクローナル抗体 (BBA-2187、BBA-2617、BKE-3430 と BTE-3456) とそれらに対する組換え抗体を調製し、高感度 ELISA 法を確立した。BBA-2187 を用いた ELISA は市販試薬に比べて 50~100 倍の高感度であった。次いで、ハイブリドーマ細胞株から 5' -RACE 法により、各抗体の可変領域に相当する cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した。それらを基に、4 種の抗体について HL 型の scFv 抗体遺伝子を構築し、大腸菌に発現し、ELISA に供した。その結果、4 種の scFv 抗体の ELISA におけるビスフェノール A の測定感度は、相当する親モノクローナル抗体と同等であった。4 種のうち BBA-2187scFv がビスフェノール A に対して最も高感度であった。BBA-2187 の VH と VL の両ドメインを別個に調製し、両者を ELISA に供すると互いに会合し、ビスフェノール A と反応した。また、BBA-2187 の VH は BBA-2617 の VL 及び BTE-3456 の VL と会合してビスフェノール A と反応したが、BBA-2187 の VL は他の VH と会合しなかった。4 種の抗体の一次構造の比較により、BBA-2187 の VL の 2 番目のフレームワーク領域の長さは通常の IgG の VL に比べて 1 アミノ酸残基短い特徴的な構造であり、この構造が BBA-2187 の抗原との高い親和性並びに BBA-2187 の VH との特異的相互作用に重要であることが示唆された。</p>	
<p>第 4 章では、工業化学品アルキルフェノールエトキシレートとその代謝物である環境ホルモン作用を示すノニルフェノールに特異的な 2 種のモノクローナル抗体 (AP-14 と MOF3-139) 及びそれらに対する scFv を調製した。ノニルフェノールデカエトキシレートとノニルフェノールに対する ELISA の測定結果から 2 種の scFv は親モノクローナル抗体と同等の反応性と交叉反応性を示した。両抗体の一次構造の比較を基に、アミノ酸残基の置換により、様々な scFv 変異体を作製し、ELISA で反応性を測定した。その結果、AP-14 の 33 番目のスレオニンと 35 番目のヒスチジンがノニルフェノキシ酢酸との反応性に、57 番目のアスパラギン酸と 59 番目グルタミン酸がノニルフェノールとの反応性に関与していることが示唆された。</p>	
<p>本研究成果により、ポストハーベスト農薬としての殺虫剤マラチオン、環境ホルモンである工業化学品ビスフェノール A とアルキルフェノールエトキシレートを対象とし、それらに特異的なモノクローナル抗体と scFv 抗体を作製し、高感度 ELISA 法を確立し、scFv 抗体は抗原に対して相当する親モノクローナル抗体と同等の反応性・特異性を示し、また、組換え体大腸菌の培養によって、従来のモノクローナル抗体に比べてはるかに迅速かつ容易に大量生産及び精製が達成できた。また、抗体の可変領域 VH と VL の組み合わせにより、VH と VL の相互作用に重要な領域、さらには、抗原との反応に重要なアミノ酸残基を特定することができた。以上のとおり、本研究は環境負荷化学物質などに対するハプテン抗体、特に、モノクローナル抗体と scFv 抗体について ELISA 法を確立すると共に、抗体分子内の相互作用、抗原抗体反応の反応性や特異性を決定する構造を明らかにしたものであり、環境負荷化学物質などのモニタリング技術の向上に寄与する重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者西 甲介は、博士（農学）の学位を得る資格があると認める。</p>	