

# 博士論文

合成カンナビノイド誘導体に対する  
モノクローナル抗体の作製  
および、それを用いた検出法に関する研究  
**(Study on development of synthetic cannabinoid  
derivatives-specific antibodies and sensing method  
using its antibodies)**

2018年9月

鹿児島大学 大学院理工学研究科

博士後期課程 システム情報科学専攻

中山 浩

## 目 次

|   | Page  |
|---|-------|
| 要旨  | 1-3   |
| 第 1 章 危険ドラッグの特徴及び現行検出方法   | 4-17  |
| 1-1 小序論   |       |
| 1-2 危険ドラッグの特徴   |       |
| 1-3 危険ドラッグ検出技術の現状   |       |
| 1-4 小括  |       |
| 1-5 引用文献  |       |
| 第 2 章 ハイブリドーマ法を用いた3-ナフトイルインドール誘導体<br>特異的マウスモノクローナル抗体の作製及びその特性評価 | 18-37 |
| 2-1 小序論   |       |
| 2-2 材料と方法   |       |
| 2-3 結果と考察   |       |
| 2-4 小括  |       |

2-5 引用文献

第 3 章 フェージディスプレイ法を用いた3-ナフトイルインドール  
誘導体特異的VHH抗体の作製及びその特性評価

38-63

3-1 小序論

3-2 材料と方法

3-3 結果と考察

3-4 小括

3-5 引用文献

第 4 章 マウスモノクローナル抗体を用いた種々の簡易検出方法

64-91

4-1 小序論

4-2 材料と方法

4-3 結果と考察

4-4 小括

4-5 引用文献

第 5 章 総括

92-95

|         |        |
|---------|--------|
| 発表文献リスト | 96-97  |
| 謝辞      | 98-100 |

# 要 旨

本論文は、大きな社会問題となっている危険ドラッグ（以前は脱法ドラッグと呼ばれていたもの）の一つである合成カンナビノイド、特に社会的に重要視されている 3-ナフトイルインドール誘導体を容易に検出するための検出方法を開発することを目的にしたものである。この目的を達成するために、ハイブリドーマ法を用いた高感度なマウスモノクローナル抗体作製及び、ファージディスプレイ法を用いた VHH 抗体作製について検討した。さらには、作製したモノクローナル抗体及び VHH 抗体の特性を評価すると共にそれを用いて、3-ナフトイルインドール誘導体の検出方法についても検討した。上記 2 種類の抗体作製方法については、3-ナフトイルインドール誘導体単独で免疫しても抗体反応をすることが出来ないことが分かっているため、いずれも 3-ナフトイルインドール誘導体にキャリア蛋白質として keyhole limpet hemocyanin (KLH) を修飾した 3-ナフトイルインドール誘導体修飾 KLH を免疫原として使用した。マウスモノクローナル抗体作製については、免疫したマウスの脾臓細胞とミエロマ細胞との融合によるハイブリドーマ法を利用した。一方、VHH 抗体作製については免疫抗体ライブラリを作製し、3-ナフトイルインドール誘導体修飾 Bovine Serum Albumin (BSA) を用いてバイオパンニングを行い、3-ナフトイルインドール誘導体を特異的に認識する VHH 抗体の単離を試みた。その結果、3-ナフトイルインドール誘導体を認識するそれぞれ 2 種類のマウスモノクローナル抗体及び VHH 抗体の作製に成功した。

それぞれの抗体の評価については、いずれも 3-ナフトイルインドール誘導体修飾 BSA に対する ELISA (Enzyme linked Immuno Sorbent Assay) 法を用いて、3-

ナフトイルインドール誘導体のみを認識し、原料あるいはそれに類似した化合物は認識しなかったことから優れた特異性を有していることが示された。

詳細については下記に記載する。

マウスモノクローナル抗体については、固相抗原として 3-ナフトイルインドール誘導体修飾 BSA を用いた競合 ELISA 法による薬物単体に対する評価では、1-methyl-3-(1-naphthoyl) indole、1-ethyl-3-(1-naphthoyl) indole、1-octyl-3-(1-naphthoyl) indole、Naphtoyl-Indole、4-methyl-Naphtoyl-Indole、Indole、Naphtylamine、Naphtic acid に対する IC50 値は 60、80、80、120、120、10000 以上、10000 以上、10000 以上 nM であった。

一方、VHH 抗体については、固相抗原として 3-ナフトイルインドール誘導体修飾 BSA を用いた競合 ELISA による薬物単体に対する評価では、1-methyl-3-(1-naphthoyl) indole、1-ethyl-3-(1-naphthoyl) indole、1-octyl-3-(1-naphthoyl) indole、Naphtoyl-Indole、4-methyl-Naphtoyl-Indole、Indole、Naphtylamine、Naphtic acid に対するそれぞれの IC50 値は 2.6、2.8、3.8、8.1、3.0、10 以上、10 以上、10 以上  $\mu$ M であり、マウスモノクローナル抗体と比較して約 2 桁感度が劣っていた。

以上のことにより、今回作製したマウスモノクローナル抗体については、高感度測定が可能であり、検出デバイスへの適応性があるものの、VHH 抗体については低感度であり検出デバイスへの導入は困難であると考えられる。

そこで、このマウスモノクローナル抗体を用いて、2 種類の簡易測定方法（蛍光増強阻害法、イムノクロマトグラフィー法）を検討した結果、蛍光増強阻害法では、3-ナフトイルインドール誘導体を検出困難であったが、イムノクロマトグラフィー法では 3-ナフトイルインドール誘導体を検出することが出来た。このイムノクロマト法を用いた検出方法は、将来的に危険ドラッグのひとつで

ある合成カンナビノイド、特に 3-ナフトイルインドール誘導体の簡易測定デバイスとしてその活用が期待される。

# 第 1 章

## 危険ドラッグの特徴及び現行検出方法

### 1-1 小序論

近年、危険ドラッグと言われる薬物が関与した社会問題（自動車事故による障害事件、健康被害など）が発生している。2016 年では、医薬品医療機器等法下の指定薬物として規制されている化合物数は約 2000 種類であり、その中でカンナビノイド受容体に対し作用する合成カンナビノイドの割合は最も多い。その割合は全体の約 40% を占めている。危険ドラッグが日本において顕在化したのは、1990 年代後半からである。他の違法薬物（例えば、コカインや覚せい剤）と比較して安価で、インターネットや繁華街などで簡単に入手することが可能であったため、健康被害や社会的弊害が大きな社会問題となった。その後、2006 年に薬事法（現医薬品医療機器等法）が改正され新しく指定薬物制度が導入されたが、2008 年頃から合成カンナビノイドを乾燥ハーブにまぶした脱法ハーブが社会的に蔓延し深刻な社会問題となった。

これらの危険ドラッグは、ある化合物を指定薬物に指定しても構造に類似している化合物を新たに合成しその新規化合物が販売されるようになった。このように規制と流通との“いたちごっこ”がしばらくの間続いた(1-4)。

厚生労働省は、この課題を解決するために、合成カンナビノイドを対象として、医薬品医療機器等法下で特定の構造を有する化合物群を指定薬物指定して網羅的に規制した（2013 年）。その後、次々と新たに出てくる化合物を速やかに指定薬物として指定し、2016 年 4 月末時点で指定薬物総数は約 2,300（包括指定を含む）となった。さらには、危険ドラッグに関連する医薬品医療機器等法を改正し、指定薬物、指定薬物である疑いがある物品だけではなく、指定薬



物と同等以上に精神毒性を有する蓋然性が高い物である疑いがある物品についても検査命令および販売等停止命令を行うことが可能となる規制を実施した。

その一方で、このような危険ドラッグはアンダーグラウンドで取引されるようになり、今なお多くの利用者がいるものと考えられる。

よって、このような危険ドラッグを早期に、簡単に検出することは将来的にも重要である。

次の章では、危険ドラッグの一つである合成カンナビノイド、特にその中で最も社会的に重要視されている 3-ナフトイルインドール誘導体の特徴及びそれを検出するための技術について記述する。

## 1-2 危険ドラッグの特徴

危険ドラッグには多くの種類がある（図 1-1）。この中でも、特に国内（外）で流通している危険ドラッグとして合成カンナビノイドと言われる一群が存在している。さらに、その中で特に社会問題となっているものの一つとしてナフトレン系の 3-ナフトイルインドール誘導体というものがある。この化合物の基本的構造を図 1-2 に示す。これら合成カンナビノイド類は、大麻の成分である  $\Delta$ -9-テトロヒドロカンナビノイド（19-THC、1）と同等の生理活性を有している。その 3-ナフトイルインドール誘導体として JWH-018（3）が最初に流通し、その後、多数の構造類似体が流通されるようになった（2-4）。その解決策としてこれら 3-ナフトイルインドール誘導体類は包括指定された。

この合成カンナビノイドの多くは、その構造を 4 つの領域（A、B、C、及び結合形態）に分けることが出来る（図 1-2）。このように 4 つの領域が構成されているため、これら 4 つの部位の様々な置換基の組み合わせにより無数の化合物が合成できる。例えば、JWH-018（3）の A 領域が benzyl 基である JWH-250（5）や、phenyl 基である AM-2233（6）、cyclopropyl 基である XLR-11（7）、pyrrole 骨格である JWH-307（8）や、naphthyl 骨格である CB-13（9）など、B 領域が indazole 基である THJ-2201 など、さらには、C 領域が 5-fluoropentyl 基に置換された AM-2201（4）などもある。

危険ドラッグ中の各合成カンナビノイドの含有量については、製品間のばらつきが大きいことが報告されている。例えば、JWH-018 の含有量は数 mg/g～約 39mg/g であり、大小約 18 倍の差があった（10）。

一方、危険ドラッグ中の含有成分の多くは、その薬理作用が不明であることが多いが、合成カンナビノイドは、カンナビノイド受容体（CB1 および CB2）に対する親和性を有することが報告されている。CB1 受容体は脳内に多く局在する

受容体で、カンナビノイドの中枢作用（鎮静作用など）に関与している。合成カンナビノイドと CB1 受容体に対する親和性は、阻害定数  $K_i$  値 (nM) として表され、例えば JWH-018 は  $\Delta^9$ -THC の 5 倍、AB-CHMINACA は 78 倍、MDMB-CHMINACA は 431 倍という強力な親和性を有すると報告されている(11-19)。

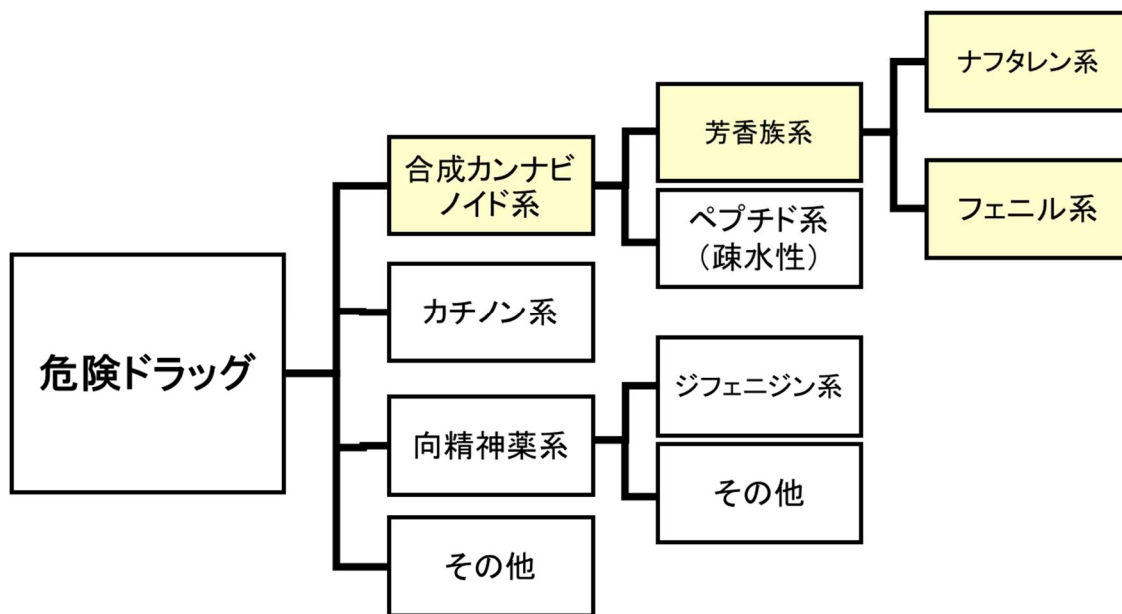


図 1-1 危険ドラッグの分類図

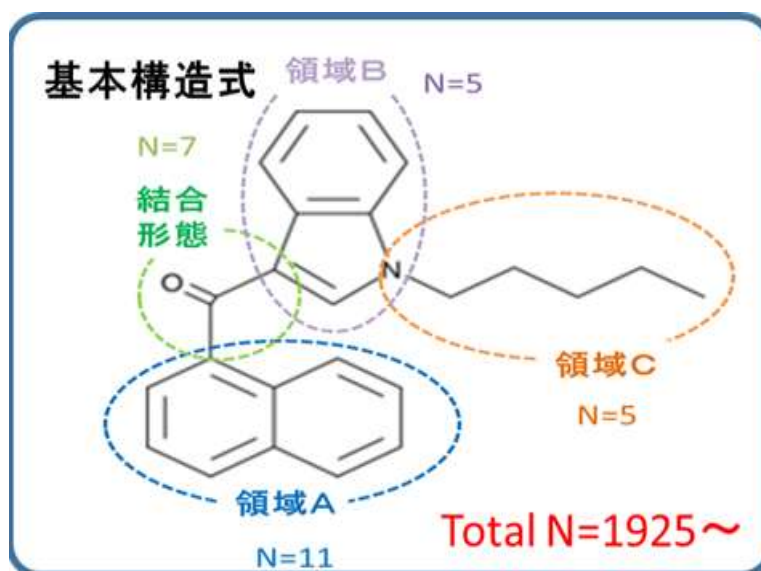


図 1-2 合成カンナビノイドの領域図

### 1-3 危険ドラッグ検出技術の現状

現在、危険ドラッグ成分を検出する迅速かつ広範囲なスクリーニング法としては、下記のような大型装置を用いた分析法が利用されている。これらの分析法は、高感度で、高い確度で物質同定をすることが出来る一方で、装置が大型であるばかりでなく、それぞれの検体を分析する場合には予めメタノールなどの有機溶媒で危険ドラッグ成分の抽出を行う必要がある。

さらには、装置操作にもかなりの熟練者が必要であり、測定結果が出るまでの時間も長時間（1時間～1日）であるという課題がある。

下記にそれぞれの分析法の現状について記載する。

#### 1) ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）

質量分析計（MS）を検出器としたガスクロマトグラフ装置のことを GC/MS と呼んでいる。GC/MS は、基本的にクロマト分離を行うガスクロマトグラフ（GC）と質量分離を行う質量分析計（MS）という異なる 2 つの手法を組み合わせた装置から構成されている。

分析したい混合物試料は GC で成分分離され、その成分ごとをイオン化し質量分析する。MS は検出器の中でも定性に優れた検出器である。

一方、GC/MS 法の薬毒物データベースには、乱用薬物、危険ドラッグなどの法薬毒物分析で必要となる化合物のマススペクトルが登録されている。これらの情報は、メソッドファイル、シミラリティー検索に利用するためのマススペクトルライブラリに登録されており、保持時間やマススペクトルによる化合物同定に利用することができる。

#### 2) 液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS）

LC/MS は、質量分析計（MS）を検出器とした液体クロマトグラフ装置のことをいう。LC/MS は、基本的にクロマト分離を行う液体クロマトグラフ（LC）と質量分

離を行う質量分析計(MS)という異なる 2 つの手法を用いた装置から構成されており、スキャン測定より得られるマススペクトルでは溶出成分に分子量と構造情報を与える。一般的に LC では試料中の各成分の固定相と移動相に対する保持力の差によって成分を分離し、UV-VIS など検出する。これらの検出器では、物質の定性は主に保持時間で、定量はピーク強度・面積で行う。クロマトグラフィーは分離能力に優れているが、多成分同時分析など複数の成分がほぼ同時にカラムから溶出する場合には確実な定性・定量が困難になる。

一方、MS は試料成分を様々な方法でイオン化させ、得られたイオンを真空中で質量と電荷の比 ( $m/z$ ) によって分離し、各イオンの強度を測定する高感度な検出法である。

### 3) フォトダイオードアレイ検出器付液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/PDA/MS)

この分析の場合、上記の GC-MS 分析後のスペクトル検索の結果、分析用標品を所有している化合物が検出された場合に、改めて分析用標品とともに LC/PDA/MS 分析を行い保持時間およびスペクトルデータの一致を確認するためのものである。

### 4) LC-四重極-飛行時間型質量分析計 (LC/Q-TOF MS)

一方、分析用標品を所有していない新規流通化合物が検出された場合は、目的成分をリサイクル分取 LC や質量分析計付フラッシュ精製装置などを用いて製品から分取・精製し、その化学構造をこの分析法を用いて同定している。

### 5) DART-四重極-Orbitrap 型質量分析計

これは、リアルタイム直接分析 DART (Direct Analysis in Real Time) イオン源に、タンデム質量分析計 (四重極-Orbitrap 型質量分析計) を連結した装置による危険ドラッグ製品中薬物の迅速スクリーニングする装置である (9)。こ

の DART イオン化法は、ヘリウムガスをニードル電極の放電でプラズマ化し、大気ガス中に放出させ測定対象物に直接作用しイオン化することができる方法である。真空下でイオン化を行う従来の方法と異なり大気圧下でイオン化を行うので、試料表面上でイオン化を直接行うことが可能である。そのため、前処理なしで様々な試料をイオン源にかざすだけでマスペクトルをリアルタイムに得ることが可能である。

#### 6) LC-イオンモビリティ分離-四重極-飛行時間型質量分析計

(LC/IMS/Q-TOF MS)

これは、LC/Q-TOFMS にイオンモビリティ分離法 (Ion Mobility Separation; IMS) を組み込んだ装置である。IMS はイオンが通過するセル内にガスを通気し、連続パルス電圧を印加することで、各化合物イオンの大きさや形状に基づく移動時間を測定し、衝突断面積 (Collision cross section; CCS) を得る分析法である。この IMS を併用することにより生体試料由来の夾雑物による影響の軽減が可能となった。

#### 7) その他

スクリーニング分析により検出された薬物については、LC-トリプル四重極型質量分析計 (LC/MS/MS) の Multiple Reaction Monitoring (多重反応モニタリング、MRM) 法により定量分析を実施していることがある。LC/MS/MS の MRM 法を用いた薬物分析では、ターゲットとなる化合物由来のプロダクトイオンのみをモニタリングすることにより、極めて選択性の高い高感度な分析を行うことが可能となる。

## 1-4 小括

1-2 で述べたように合成カンナビノイドの多くは、その構造を4つの領域(A、B、C及び結合形態)に分けることが出来、そのため、これら4つの部位の様々な置換基の組み合わせにより無数の化合物が合成できる。一方、1-3 で述べたように、現状の測定装置は大型で、有機溶媒を使用し、かつ煩雑な操作した後に分析することが多いため、簡便に測定することができないという課題がある。

本研究では、このことを踏まえて抗体作製及び検出技術の研究開発を行う必要がある。抗体作製の場合には、抗体の交差反応性がある程度広いものあるいは、多様性のある抗体を獲得することが重要である。モノクローナル抗体作製の場合にはなるべく多くのクローンを作製することが重要であり、VHH抗体の場合には多様性を大きなライブラリーを作製することが重要である。

また、検出技術の研究開発については、世の中に存在する多くの化合物から怪しい化合物を簡易にスクリーニングできる検出方法を確立する必要があると考えられる。



## 1-5 引用文献

1. Kikura-Hanajiri, R. ; Uchiyama, N. ; Goda, Y.

Survey of current trends in the abuse of psychotropic substances and plants in Japan. Legal Medicine 2011; 13, 109-115.

2. Kikura-Hanajiri, R. ; Uchiyama, N. ; Kawamura, M. ; Ogata, J. ; Goda, Y.

Prevalence of new designer drugs and their legal status in Japan  
Yakugaku Zasshi. 2013;133(1):31-40.

3. Uchiyama, N. ; Matsuda, S. ; Kawamura, N. ; Kikura-Hanajiri, R. ;

Goda, Y.

Two new-type cannabimimetic quinolinyl carboxylates, QUPIC and QUCHIC, two new cannabimimetic carboxamide derivatives, ADB-FUBINACA and ADBICA, and five synthetic cannabinoids detected with a thiophene derivative  $\alpha$ -PVT and an opioid receptor agonist AH-7921 identified in illegal products.

Forensic Toxicol. 2013; 31, 44-53.

4. Kikura-Hanajiri, R. ; Kawamura, N. ; Goda, Y.

Changes in the prevalence of new psychoactive substances before and after the introduction of the generic scheduling of synthetic cannabinoids in Japan. *Drug Test. Analysis* 2014; 6, 832–839.

5. 花尻 (木倉) 瑠理. *医薬ジャーナル*. 2016;52:57–60.

6. Uchiyama, N.; Kikura-Hanajiri, R.; Kawamura, N.; Haishima, Y.; Goda, Y.

Identification of a Cannabinoid Analog as a New Type of Designer Drug in a Herbal Product. *Chem. Pharm. Bull.* 2009; 57, 439–441.

7. Uchiyama, N.; Shimokawa, Y.; Matsuda, S.; Kawamura, N.; Kikura-Hanajiri, R.; Haishima, Y.; Goda, Y.

Two new synthetic cannabinoids, AM-2201 benzimidazole analog (FUBIMINA) and (4-methylpiperazin-1-yl) (1-pentyl-1H-indol-3-yl) methanone (MEPIRAPIM), and three phenethylamine derivatives, 25H-NBOMe 3,4,5-trimethoxybenzyl analog, 25B-NBOMe, and 2C-N-NBOMe, identified in illegal products.

*Forensic Toxicol.* 2014; 32(1), 105–117.

8. Uchiyama, N.; Shimokawa, Y.; Kikura-Hanajiri, R.; Demizu, Y.; Goda, Y.; Hakamatsuka, T. A synthetic cannabinoid FDU-NNEI, two

2H-indazole isomers of synthetic cannabinoids AB-CHMINACA and NNEI indazole analog (MN-18), a phenethylamine derivative N-OH-EDMA, and a cathinone derivative dimethoxy- $\alpha$ -PHP, newly identified in illegal products. *Forensic Toxicol.*

2015;33(2):244-259.

9. Uemura, N. ; Fukaya, H. ; Kanai, C. ; Yoshida, M. ; Nakajima, J. ;

Takahashi, M. ; Suzuki, J. ; Moriyasu, T. Identification of a

synthetic cannabinoid A-836339 as a novel compound found in a product. *Forensic Toxicol.* 2014; 32(1), 45-50.

10. Uchiyama, N. ; Kikura-Hanajiri, R. ; Ogata, J. ; Goda, Y. Nahoko

Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products. *Forensic Sci. Int.* 2010; 198, 31-38.

11. .Showalter, V. M. ; Reynen, P. H. ; Calixto, J. J.

Pharmacological Comparison of a Recombinant CB1 Cannabinoid Receptor with Its Gal6 Fusion Product. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996; 278, 989-999.

12. Compton, D.R. ; Rice, K.C. ; De Costa, B.R. ; Razdan, R.K. ;

Melvin, L.S. ; Johnson, M.R. ; Martin, B.R. Cannabinoid

structure-activity relationships: correlation of receptor binding and in vivo activities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993; 265, 218-226.

13. Aung, M. M. ; Graeme, G. ; Huffman, J. W. ; Wu, M.J. ; Keel, C. ; Yang, B. ; Showalter, V. M. ; Abood, M.E. ; Martin, B. R. ; Metrics, P. Influence of the N-1 alkyl chain length of cannabimimetic indoles upon CB1 and CB2 receptor binding. *Drug Alcohol Depend.* 2000; 60, 133-140.

14. Makriyannis, A. ; Deng, H. Cannabimimetic indole derivatives. 2001; patent : WO/2001/28557.

15. Huffman, J. W. et al. 1-Pentyl-3-phenylacetylindoles, a new class of cannabimimetic indoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005; 15, 4110-4113.

16. Deng H. et al. Potent Cannabinergic Indole Analogues as Radioiodinatable Brain Imaging Agents for the CB1 Cannabinoid Receptor. *J. Med. Chem.* 2005; 48, 6386-6392.

17. Huffman, J. W. : In : Reggio PH (ed) *The cannabinoid receptors*, Humana Press, New York. 2009; 49-94.

18. Buchler I. P. Indazole derivatives as CB1 receptor modulators and their preparation and use in the treatment of CB1-mediated diseases. 2009; Patent : WO/2009/106982.

19. Buchler I. P. Indazole derivatives as CB1 receptor modulators and their preparation and use in treatment of diseases. 2009; Patent : WO/2009/106980.

## 第 2 章

# ハイブリドーマ法を用いた 3-ナフトイルインドール誘導体 特異的マウスモノクローナル抗体の作製及びその特性評価

### 2-1 小序論

抗体は、生体においては免疫作用の一つとして機能しており、工業的には治療薬やターゲット物質に対する特異的反応分子として、様々な分野で機能する蛋白質のひとつである。種々のターゲット物質に対してこのような機能的タンパク質を作製する技術を取得することは応用性が高く、様々な分野に応用可能である。

今回、このハイブリドーマ法を用いてマウスモノクローナル抗体の作製を試みた。

本研究のターゲット分子は、低分子化合物である 3-ナフトイルインドール誘導体である。以下に、抗ハプテン抗体の調製方法及びハイブリドーマ法について記載する。

分子量が小さい低分子量の化合物 (MW 1000 以下) は、免疫学の分野ではハプテンと呼ばれ、そのまま動物に投与しても免疫原性がないため免疫応答を誘導できないと言われている。一方、このハプテンをタンパク質 (担体、キャリア分子) と共有結合すると免疫原性を示すようになる。ハプテンはホルモンや低分子有機化合物 (例えば、ビタミン、薬物、環境汚染物質、抗生物質、除草剤等) など広範囲に存在している。そのため、このような低分子化合物を検出するために必要な材料として、ハプテンに対する抗体を作製することは有用であ

る。これらの低分子を検出するために重要な要因のひとつとして、抗体の特異性がある。サンプルからターゲット分子のみを特異的に検出する場合、あるいは特異性の広い抗体を利用して類似化合物を一度に検出する場合など、目的に合わせた抗体を作製することが重要である。このような抗体は、研究用試薬、診断キット、バイオセンサーや医薬品等に有用な材料である。

このようなハプテンに対する抗体の特徴について下記に記載する。

#### ①ハプテンに対する抗体の特徴的な構造(1)

ハプテンが抗原の場合には、抗原認識表面はキャビティ型であると報告されており、重鎖可変領域 (VH) と軽鎖可変領域 (VL) の接触面を形成する  $\beta$  スtrand中のアミノ酸残基と相互作用していると考えられている。また、実際に抗原と結合するアミノ酸残基 (specificity-determining residues : SDR) の平均的な数は、ハプテンに対する抗体の場合は 11.9 で、タンパク質抗体の場合よりも少ない。その中でも重鎖相補鎖決定領域ループ 3

(complementaritydetermining region H3 : CDRH3) の SDR の割合は、ハプテンに対する抗体の場合は 33% (タンパク質やペプチドに対する抗体の場合には 25%) である。このことから分かるように、H3 ループはハプテンに対する抗体においては特に重要であると記載されている。

#### ②ハプテンと抗体との特徴的な相互作用(2)

ハプテンとの結合には、結合部位の相補的な電荷を要し、 $\pi$ -スタッキングやファンデルワールス作用により特異性が決定され则认为られている。

#### ③ハプテン抗原の調製方法(3, 4)

ハプテンは一般的に低分子・疎水性物が多く、抗原-抗体結合を形成可能な反応基を保持していない場合が多い。また、キャリアタンパク質をコンジュゲートしても免疫応答を誘発しない低分子化合物もある。

一方、ハプテンはターゲット物質と構造的に最も類似したものとなるようにデザインすることが重要である。さらには、免疫量の増加・ハプテンの含有モル比の増加により早い免疫応答と高いタイターを得ることができるが、逆にそれらの減少により、抗体の特異性・選択性を上げることができると考えられている。

抗体作製については種々の方法があるが、その代表的なものとして1975年に Köhler と Milstein により報告されたハイブリドーマ法がある(4)。下記に、ハイブリドーマ法を用いたマウスモノクローナル抗体の作製概要について記載する(図2-1)。

まず、免疫原であるキャリア蛋白質と結合したハプテンを動物の腹腔内、静脈内、あるいは皮下等に投与することにより免疫応答を行わせる。その後、血清中に十分な抗体価を示した動物の脾臓、あるいはリンパ節を摘出し、これらに含まれる抗体産生細胞(脾臓細胞またはリンパ球)と骨髓腫細胞とを融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を作製する。マウスを用いた場合は、骨髓腫細胞としては、SP2/0やP3-X63Ag8(P3)などがある。細胞融合の方法としては、センダイウイルスを使用する方法、ポリエチレングリコールなどの高分子ポリマーを使用する化学的方法や高電圧パルスによる電気穿孔法等がある。ハイブリドーマ細胞の選択の手段としては、HAT培地(正常培地にヒポキサンチン、アミノプリテン、チミジンを加えた培地)で未融合細胞とハイブリドーマを培養して、アミノプリテン耐性を備えたハイブリドーマのみを選択的に増殖させることができる。クローニング方法として限界希釈法を用いることによりモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を樹立することができ、その細胞を培養することによりモノクローナル抗体を得ることが出来る。



本研究では、3-ナフトイルインドール誘導体-タンパク質結合物を免疫原として、ハイブリドーマ法により、抗 3-ナフトイルインドール誘導体モノクローナル抗体の作製に着手した。

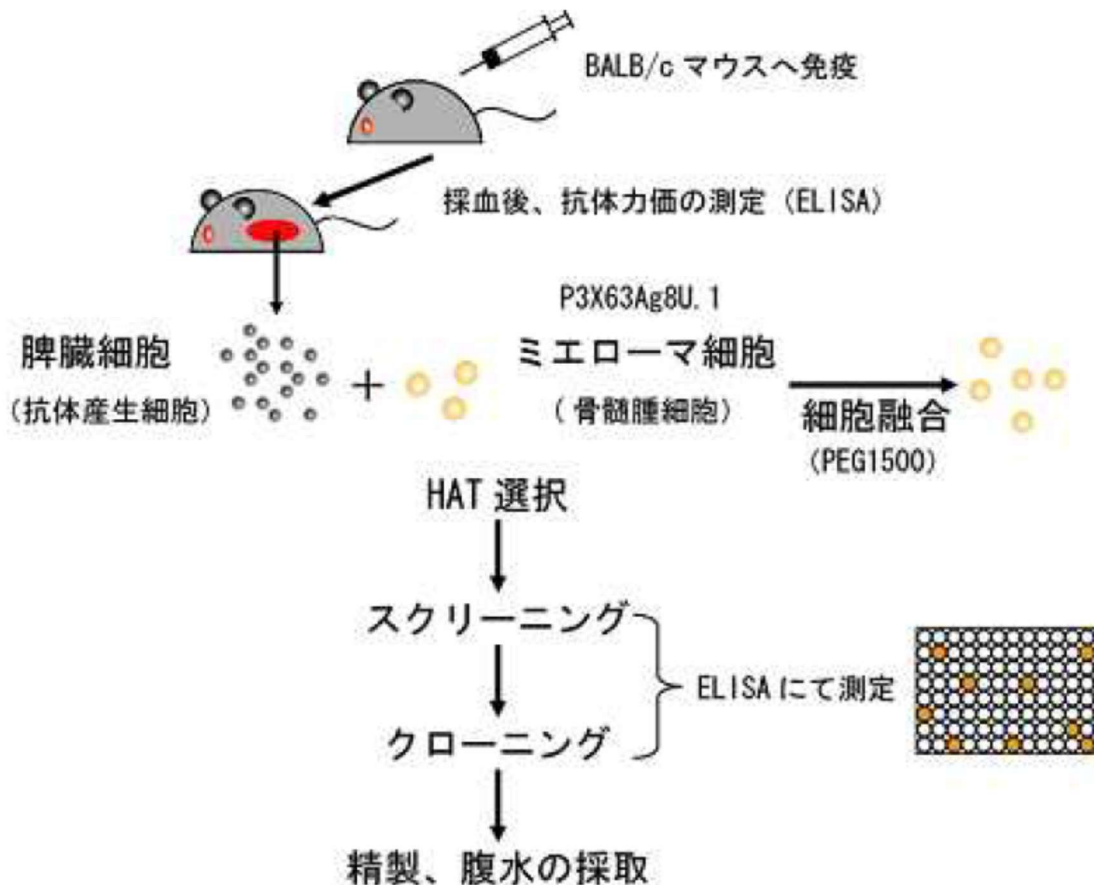


図 2-1 ハイブリドーマ法の概略図

マウスに免疫原を免疫し抗体力価の上昇した脾臓細胞とミエローマ細胞とを細胞融合する。HAT 選択後、スクリーニング・クローニングを行いモノクローン化したハイブリドーマ細胞を確立する。

## 2-2 材料と方法

(1) ハプテン (1-ヘプタン酸-3- (1-ナフトイル) インドール ; Hep) の合成

2.5M エチルマグネシウムブロミド (1.65mmol) を 1.1ml エーテル溶媒中に添加し、しばらく 0°C で攪拌した。この溶液に、あらかじめ 1.1ml エーテル溶媒で溶解したインドール (1.3mmol) を徐々に添加し、添加終了後 30 分間、室温で攪拌した。攪拌しながら、予め 1ml エーテル溶媒で溶解した 1-ナフトイルクロライド (1.46mmol) を徐々に添加した。その反応液は 1.5 時間、室温で攪拌しながら放置した。その後、飽和塩化アンモニウム水溶液を反応液と同体積添加することにより反応を停止させると共に、微粉末状になるまで攪拌を続けた。この粉末をろ過し、適当量の水で洗浄した後に適当量のエーテルで洗浄した。粉末を 1ml メタノールで溶解した後に、1ml 水酸化ナトリウム水溶液 (0.4g/ml) を添加し、室温で 18 時間攪拌した。沈殿物をろ過後に適当量のメタノール、水、エーテルで洗浄した。その後、100°C 真空下で乾燥させ、3- (1-ナフトイル) インドール混合物を得た。この混合物を精製することなく次の合成ステップに利用した。0.2g 3- (1-ナフトイル) インドール混合物を 1.5ml ジメチルスルフォキシド (DMSO) で溶解した後に、0.6g 水酸化カリウムを添加した。この反応液に 1-ブロモヘプタン酸 (5.5mmol) を徐々に添加し、85°C で 18 時間攪拌した。反応液を適量の水で希釈した後に、適量の酢酸エチルで 3 度抽出した。抽出物を濃縮後、クロマトグラフィー (シリカ担体、溶出液 : 石油エーテル/酢酸エチル = 7/1) により精製し、1-ヘプタン酸-3- (1-ナフトイル) インドール (Hep) を得ることができた (図 2-2)。得られた反応生成物の構造は、赤外線スペクトル及び NMR データにより同定した。

(2) 免疫原 (Hep-KLH) の合成

10mg Hep を 1ml の DMSO に溶解後、5mg エチル（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）を添加し、1 時間、室温で攪拌した。その溶液を、予め 100mg のキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）を 5ml の生理食塩水を含むリン酸緩衝液 [（pH7.4）PBS バッファ] に溶解した溶液に、攪拌しながら徐々に添加した。その後、更に 8 時間、室温で攪拌した。この溶液を予め、0.25  $\mu$ m フィルターで沈殿物を除去した後に、セファデックス G-25 カラム（溶出液：PBS バッファ）により未反応物の Hep を除去することにより、免疫原である Hep -KLH を得た（図 2-2）。

### （3）免疫

上記で作製した 1mg/mL 免疫原に同体積のアジュバント（ヒト結核死菌含有完全フロイントアジュバント、和光純薬製、H37Rv）を添加し、よくホモジナイザ（1000rpm）で乳化した。生後約 8 週のマウスに、免疫原を含むアジュバントエマルジョンを 100ul ずつ 10 箇所注射した。2 週間後、1mg/mL 免疫原に同体積の不完全フロイントアジュバントをホモジナイザで乳化し、このエマルジョンをマウスに 100ul ずつ 10 箇所注射した後、4、6、8 週間後に再度 免疫原を含む不完全フロイントアジュバントエマルジョンを同様に注射した。注射後、1 週間目に採血し、その血清を以下に示す血清評価法により抗体産生（力価）を確認した。

### （4）血清評価

採取した血清を、酵素免疫測定法（ELISA）により抗体産生の確認をした。固相として 0.1mg/mL・BSA-PBS-Az（0.04 重量%ナトリウムアジド PBS 溶液にウシ血清アルブミン（以下 BSA という）を 0.1mg/mL の濃度で溶解したもの）で調製した 2.5  $\mu$ g/mL Hep-BSA を 100ul/ウェルずつ使用した。第二抗体としてペルオ

キシダーゼ標識抗マウスモノクローナル抗体またはペルオキシダーゼ標識抗マウス IgM 抗体を使用した。

#### (5) 細胞融合

免疫したマウスの中で特に力価の高かった 2 匹の脾臓を肥大させるために、ブースト（弱い免疫原の注射）をした。免疫原として 1mg/mL Hep -KLH 溶液（アジュバント不含）をそのまま用いた。ブースト後 3 日を経過したマウスの脾臓細胞を摘出し、平均分子量 1, 500 のポリエチレングリコールを用いた常法により、マウス骨髄腫由来細胞ライン（P3X63-Ag8. 653）と融合した。フィーダー（成長因子を供給する細胞）として同じマウスの脾臓細胞を用い、96 ウェルプレート 2 枚の上で 15 重量%のウシ胎児血清（以下、FCS）を含むイシコフ培地で 1 日間培養した後（100u1/ウェル）、2 倍濃度のヒポキサンチン/アミノプテリン/チミジン（HAT）培地を 100u1/ウェル添加して CO2 インキュベータ（CO2 濃度：5 体積%、温度：37℃、湿度：95%）内で 1 週間培養した。その後、培養上清を除いた後、15 重量%の FCS を含むヒポキサンチン/チミジン（HT）培地（250u1/ウェル）と交換した。

#### (6) 細胞選別

HT 培地と交換 1 週間後、培養上清を 200u1/ウェルずつ取り出した。15 重量%の FCS を含む HT 培地（200u1/ウェル）を添加し、3 日間培養し後培養上清を 200u1/ウェルずつ取り出した。合計で培養上清を 400u1/ウェルを得ることができた。この培養上清を用いて以下に示す ELISA 法により Hep -BSA に対する結合能を測定した。固相として 0. 1mg/mLBSA・PBS・Az で調整した 2. 5  $\mu$ g/mL Hep -BSA 溶液を 100u1/ウェルずつ使用した。抗体液として細胞培養上清を使用した。この結果、Hep -BSA に対して結合能を示したものは 25 ウェルあった。

#### (7) クローニング

上記 25 ウェルの細胞についてウェルあたり 1 個の細胞が含まれる濃度に希釈（限界希釈）し、96 ウェルのマイクロプレート 3 枚に分注した。フィーダーとして生後 5 週のマウス (Balb/c) の胸線細胞を用いて初期増殖を促した。プレートのサイズを上げながら培養を進め、適時上清について ELISA 法によるスクリーニングを繰り返し、Hep-BSA に対して高い力価を示し、かつ良好な増殖を示している細胞ラインを 6 ウェルを選別し、200μl 中で  $5 \times 10^5$  細胞/mL の濃度に至るまで培養を進めた。最終的に、Hep-BSA に対して結合能を示した 2 株を選定した。

#### (8) 細胞の保存

最終的に選別された細胞ラインは、上清を遠心分離し、 $5 \times 10^6$  細胞/mL の濃度で FCS : ジメチルスルフォキシド = 9 : 1 (体積比) の溶液 1mL に浮遊させ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結した後、 $-135^{\circ}\text{C}$  に移して長期保存状態にした。

#### (9) 抗体の精製

採取した培養液を遠心分離より単離した後に、その上清についてプロテイン A 結合ゲル (プロテイン A セファロース CL-4B、ファルマシア製) を用いたアフィニティークロマトグラフィにより、細胞培養上清からモノクローナル抗体を精製した。

#### (10) 抗体の評価 (結合能評価)

上記のアフィニティークロマトグラフィにより精製したモノクローナル抗体について以下に示す酵素免疫測定法 (ELISA 法) で抗体評価を行った。

##### (A) 抗原のコーティング

$2.5 \mu\text{g/mL}$  Hep-BSA をマイクロプレートに  $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ注入し、 $20^{\circ}\text{C}$  で一晩保存した。実験直前に、アスピレータで抗原溶液を除去した。

##### (B) ブロッキング

BSA-PBS-Az を 200 $\mu$ l/ウェル注入し、30 分間室温で放置した。その後、アスピレータで BSA-PBS-Az を除去した。即日以後の実験を行わないときは、この状態で、水で湿したろ紙と共に 4 度で保存した。

#### (C) 抗体の反応

1 重量%BSA-PBS-Az で希釈した抗体溶液（希釈倍率：100～1000000 倍）を 100 $\mu$ l/ウェル振とうしながら加えた。常温で 3 時間保存した後、アスピレータで抗体溶液を除去し、PBS で 3 回洗浄し、アスピレータで残存する PBS を除去した。

#### (D) 第 2 抗体の反応

0.2  $\mu$ g/mL のペルオキシダーゼ標識抗マウスモノクローナル抗体ヤギ由来（KPL 社製）を 1 重量%BSA の PBS 溶液に溶解したもの、または 0.2  $\mu$ g/mL のペルオキシダーゼ標識抗マウス IgM 抗体ヤギ由来（KPL 社製）を 1 重量%BSA の PBS 溶液に溶解したものを 50 $\mu$ l/ウェル注入し、常温で 30 分放置した。アスピレータで除去し、PBS で 3 回洗浄し、さらにアスピレータで残存する PBS を除去した。

#### (E) 基質の反応と停止

O-フェニレンジアミン（生化学用）40mg を 10mL のクエン酸-リン酸バッファ-（pH5）に溶解し、使用直前に 30 重量%過酸化水素水 4 $\mu$ l を加えた溶液（基質溶液）を 100 $\mu$ l/ウェル注入し、室温放置した。5 分後、4N 硫酸を 25 $\mu$ l/ウェル注入して反応を停止した。

#### (F) 測定

東洋ソーダマイクロプレートリーダーを用いて 492nm の吸光度を測定した。

#### (11) 3-ナフトイルインドール誘導体の合成（交差反応性評価）

各種の交差反応性評価用 3-ナフトイルインドール誘導体は、上記 Hep 合成で記載した方法に準拠して合成した（図 2-3）。

下記に詳細に記載する。

2.5M エチルマグネシウムブロミド (1.65mmol) を 1.1ml エーテル溶媒中に添加し、しばらく 0°C で攪拌した。この溶液に、あらかじめ 1.1ml エーテル溶媒で溶解したインドール (1.3mmol) を徐々に添加し、添加終了後 30 分間、室温で攪拌した。攪拌しながら、予め 1ml エーテル溶媒で溶解した 1-ナフトイルクロライド (1.46mmol) あるいは、4-メチル-1-ナフトイルクロライド (1.46mmol) を徐々に添加した。その反応液は 1.5 時間、室温で攪拌しながら放置した。その後、飽和塩化アンモニウム水溶液を反応液と同体積添加することにより反応を停止させると共に、微粉末状になるまで攪拌を続けた。この粉末をろ過し、適当量の水で洗浄した後に適当量のエーテルで洗浄した。粉末を 1ml メタノールで溶解した後に、1ml 水酸化ナトリウム水溶液 (0.4g/ml) を添加し、室温で 18 時間攪拌した。沈殿物をろ過後に適当量のメタノール、水、エーテルで洗浄した。その後、100°C 真空下で乾燥させ、0.25g の 3- (1-ナフトイル) インドール混合物あるいは、0.26g の 3- (4-メチル-1-ナフトイル) インドール混合物を得た。

各混合物については、クロマトグラフィー (シリカ担体、溶出液：石油エーテル/=5/5) により精製し、3- (1-ナフトイル) インドール混合物及び、3- (4-メチル-1-ナフトイル) インドールを得ることができた (図 2-3)。

一方、3- (1-ナフトイル) インドール混合物については、0.2g を 1.5ml ジメチルスルフォキシド (DMSO) で溶解した後に、0.6g 水酸化カリウムを添加した。この反応液に各種 1-ブロモアルキル (5.5mmol) を徐々に添加し、85°C で 18 時間攪拌した。反応液を適量の水で希釈した後に、適量の酢酸エチルで 3 度抽出した。抽出物を濃縮後、クロマトグラフィー (シリカ担体、溶出液：石油エーテル/酢酸エチル=7/1) により精製し、1-メチル-3- (1-ナフトイル) インドー

ル、1-エチル-3-(1-ナフトイル) インドール及び 1-オクチル-3-(1-ナフトイル) インドールを得ることができた (図 2-3)。得られた反応生成物の構造は、赤外線スペクトル及び NMR により同定した。

#### (12) 抗体の評価 (交差反応性評価)

上記のアフィニティクロマトグラフィにより精製したモノクローナル抗体について以下に示す酵素免疫測定法 (ELISA 法) で抗体評価を行った。

##### (A) 抗原のコーティング

2.5  $\mu$ g/mL Hep-BSA をマイクロプレートに 100 $\mu$ l/ウェルずつ注入し、20 度で一晩保存した。実験直前に、アスピレータで抗原溶液を除去した。

##### (B) ブロッキング

BSA-PBS-Az を 200 $\mu$ l/ウェル注入し、30 分間室温で放置した。その後、アスピレータで BSA-PBS-Az を除去した。即日以後の実験を行わないときは、この状態で、水で湿したろ紙と共に 4 度で保存した。

##### (C) 抗体の反応

PBS で希釈した各 3-ナフトイルインドール誘導体あるいは、原料化合物溶液 50 $\mu$ l/ウェル及び 1 重量%BSA-PBS-Az で希釈した抗体溶液 (希釈倍率: 1000 倍) 50 $\mu$ l/ウェルを振とうしながら加えた。常温で 3 時間保存した後、アスピレータで抗体溶液を除去し、PBS で 3 回洗浄し、アスピレータで残存する PBS を除去した。

##### (D) 第 2 抗体の反応

0.2  $\mu$ g/mL のペルオキシダーゼ標識抗マウスモノクローナル抗体ヤギ由来 (KPL 社製) を 1 重量%BSA の PBS 溶液に溶解したもの、または 0.2  $\mu$ g/mL のペルオキシダーゼ標識抗マウス IgM 抗体ヤギ由来 (KPL 社製) を 1 重量%BSA の PBS



溶液に溶解したものを 50ul/ウェル注入し、常温で 30 分放置した。アスピレータで除去し、PBS で 3 回洗浄し、さらにアスピレータで残存する PBS を除去した。

(E) 基質の反応と停止

O-フェニレンジアミン (生化学用) 40mg を 10mL のクエン酸-リン酸バッファ (pH5) に溶解し、使用直前に 30 重量%過酸化水素水 4ul を加えた溶液 (基質溶液) を 100ul/ウェル注入し、室温放置した。5 分後、4N 硫酸を 25ul/ウェル注入して反応を停止した。

(F) 測定

東洋ソーダマイクロプレートリーダーを用いて 492nm の吸光度を測定した。

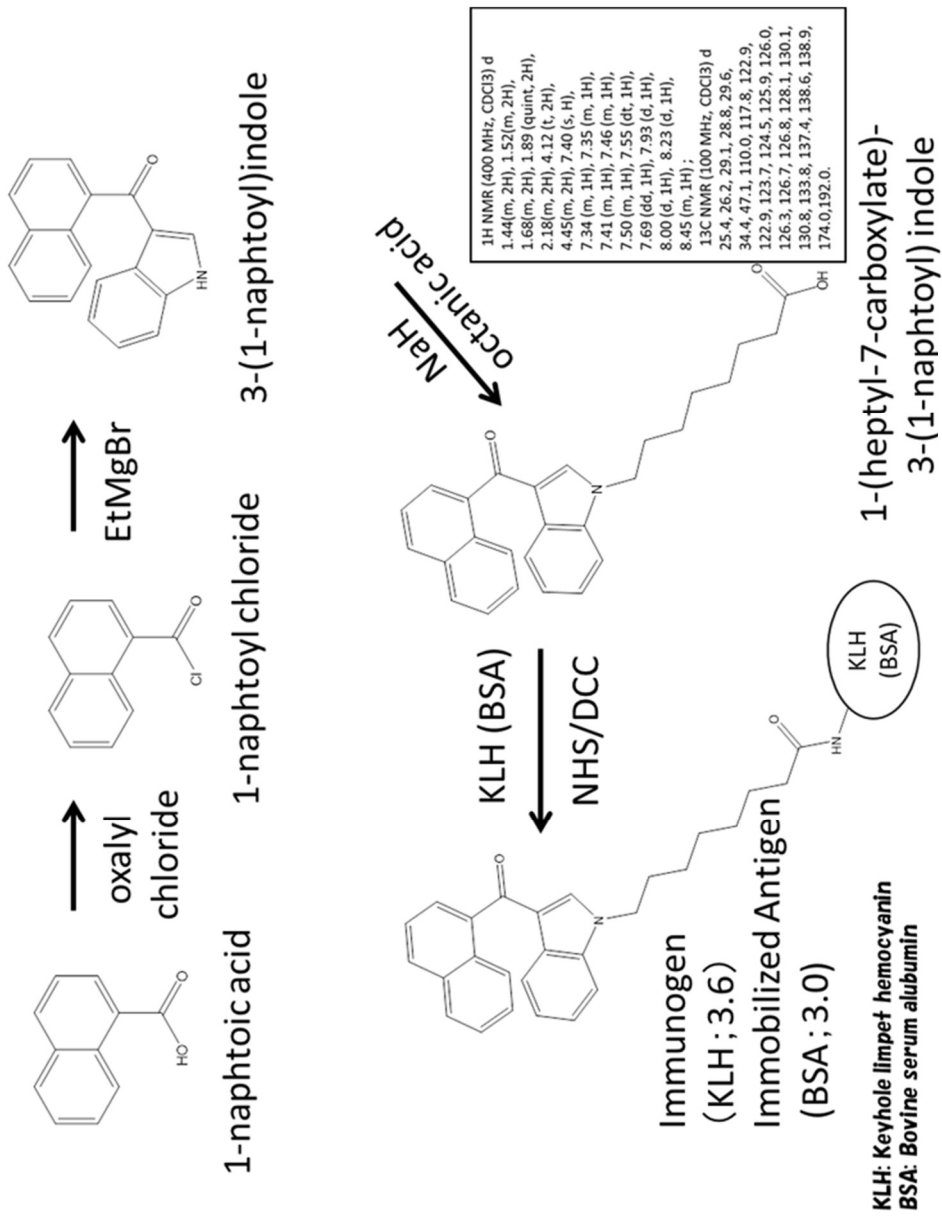


図 2-2 免疫原の合成経路図

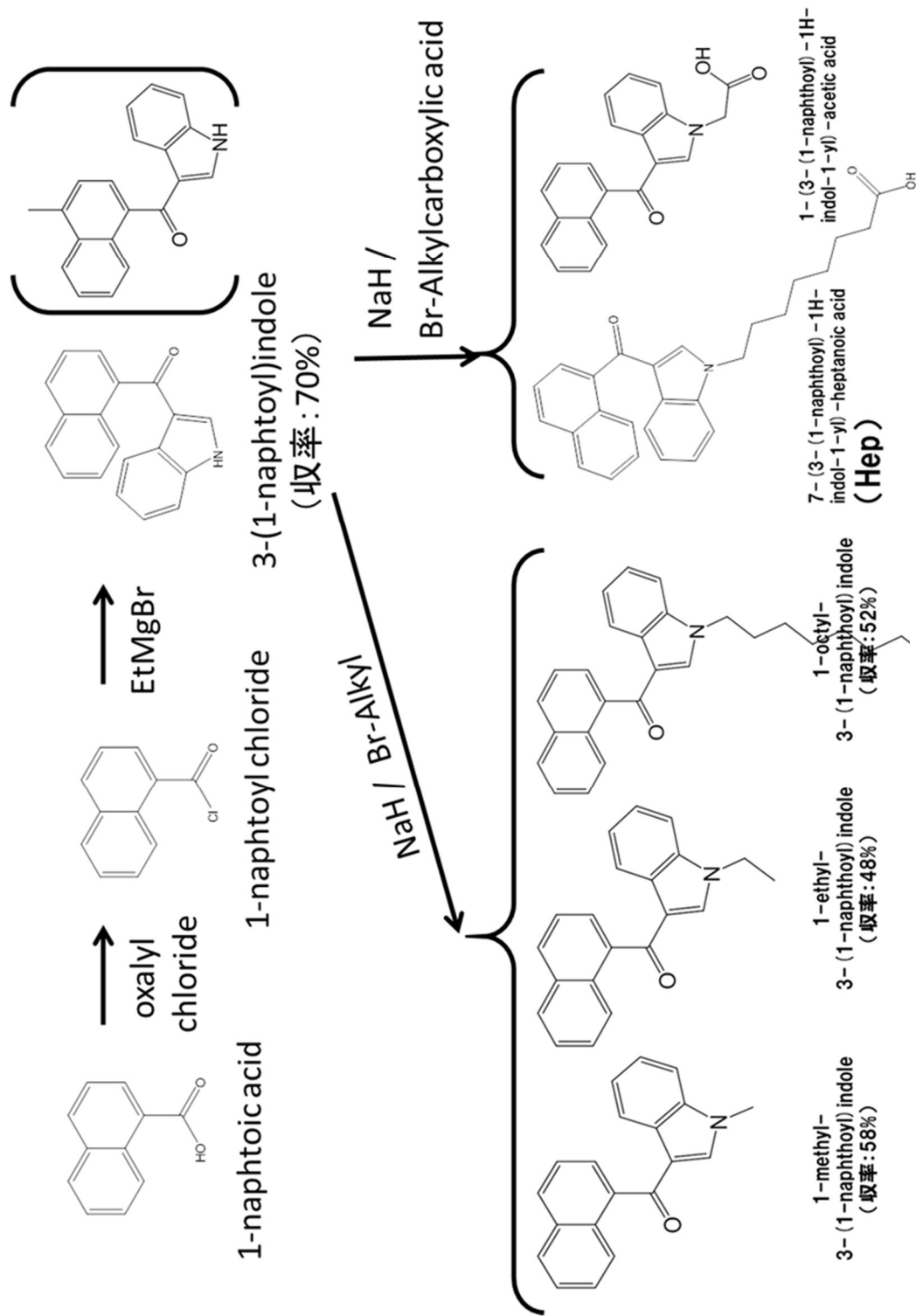


図 2-3 3-ナフトイルインドール誘導体の合成経路図

## 2-3 結果と考察

今回、ハプテンの合成により 0.1g 1-ヘプタン酸-3- (1-ナフトイル) インドール (Hep、収率：41%) を得ることができた。得られた反応生成物の構造は、赤外線スペクトル及び NMR データにより同定した。その化合物の NMR 結果は以下のとおりであった。

：  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 1.44(m, 2H), 1.52(m, 2H), 1.68(m, 2H), 1.89 (quint, 2H), 2.18(m, 2H), 4.12 (t, 2H), 4.45(m, 2H), 7.40 (s, H), 7.34 (m, 1H), 7.35 (m, 1H), 7.41 (m, 1H), 7.46 (m, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.55 (dt, 1H), 7.69 (dd, 1H), 7.93 (d, 1H), 8.00 (d, 1H), 8.23 (d, 1H), 8.45 (m, 1H) ;  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 25.4, 26.2, 29.1, 28.8, 29.6, 34.4, 47.1, 110.0, 117.8, 122.9, 122.9, 123.7, 124.5, 125.9, 126.0, 126.3, 126.7, 126.8, 128.1, 130.1, 130.8, 133.8, 137.4, 138.6, 138.9, 192.0.

この Hep を KLH に結合することにより免疫原である Hep-KLH (濃度：1mg/ml) を得た。これをマウスに免疫し、免疫反応状態を各週における血清力価を評価した結果、3-ナフトイルインドール誘導体抗体の産生が認められるとともに、モノクローナル/IgM 比が 100 以上ありクラススイッチが起こっていることを確認した(図 2-4、2-5)。

力価が十分に上昇した段階で、PEG を用いた細胞融合を実施し 2 種類のハイブリドーマ細胞 (NT01, NT02) を得ることが出来た。この細胞を培養し、その培養上清を protein-A カラムで精製し、モノクローナル抗体を得た。このモノクローナル抗体は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、標準蛋白との比較から、精製抗体は分子量約 50, 000 の H 鎖と約 25, 000 の L 鎖からなるモノクローナルであることを確認した。

各モノクローナル抗体のサブクラスは Mouse MonoAB IDKIT (Zymed 社製) を用いて決定した。タイピングした結果、いずれの抗体もサブクラスは IgG1 であった。

一方、得られたモノクローナル抗体を評価するために、種々の 3-ナフトイルインドール誘導体を合成した。それぞれの化合物については、0.21g の 3- (1-ナフトイル) インドール、0.22g の 3- (4-メチル-1-ナフトイル) インドール、0.1g の 1-メチル-3- (1-ナフトイル) インドール (収率: 58%)、0.12g の 1-エチル-3- (1-ナフトイル) インドール (収率: 48%) 及び、0.15g の 1-オクチル-3- (1-ナフトイル) インドール (収率: 52%) を得ることができた。得られた反応生成物の構造は、赤外線スペクトル及び NMR により同定した。

得られたモノクローナル抗体について、上記で合成した 1-ヘプタン酸-3- (1-ナフトイル) インドール及び種々の 3-ナフトイルインドール誘導体に対する感度及び交差反応性を ELISA により評価した。その結果、得られた 2 種類のモノクローナル抗体について、1-ヘプタン酸-3- (1-ナフトイル) インドールに対する IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 40nM であった (図 2-6)。また、3-ナフトイルインドール誘導体である 3-ナフトイルインドール、3- (4-メチル-1-ナフトイル) インドール、1-メチル-3- (1-ナフトイル) インドール、1-エチル-3- (1-ナフトイル) インドール、1-オクチル-3- (1-ナフトイル) インドールの IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 120、120、60、80、80nM であった (表 2-1)。一方、原料あるいは、その類似体であるインドール、ナフチルアミン、ナフチル酸の IC<sub>50</sub> 値は、いずれも 10000nM 以上であった (表 2-1)。

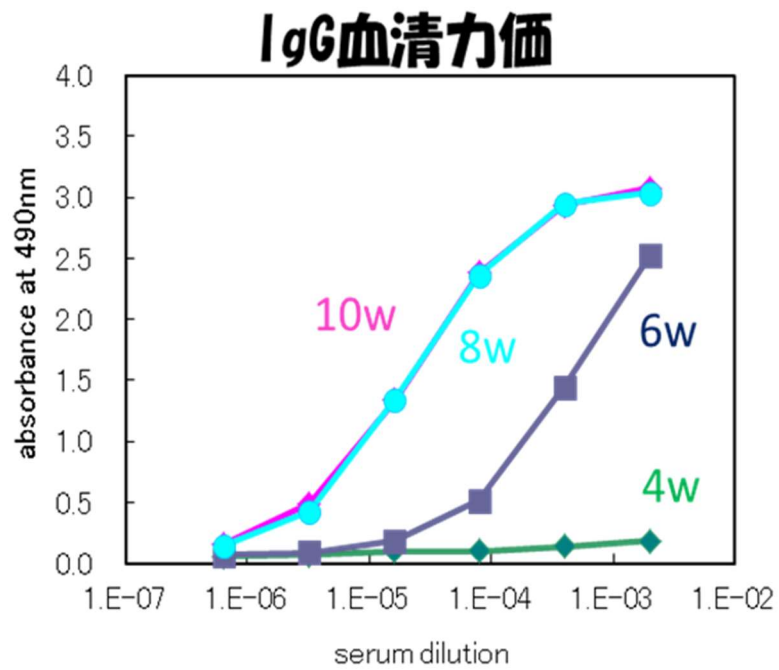


図 2-4 血清中の IgG 力価測定結果図

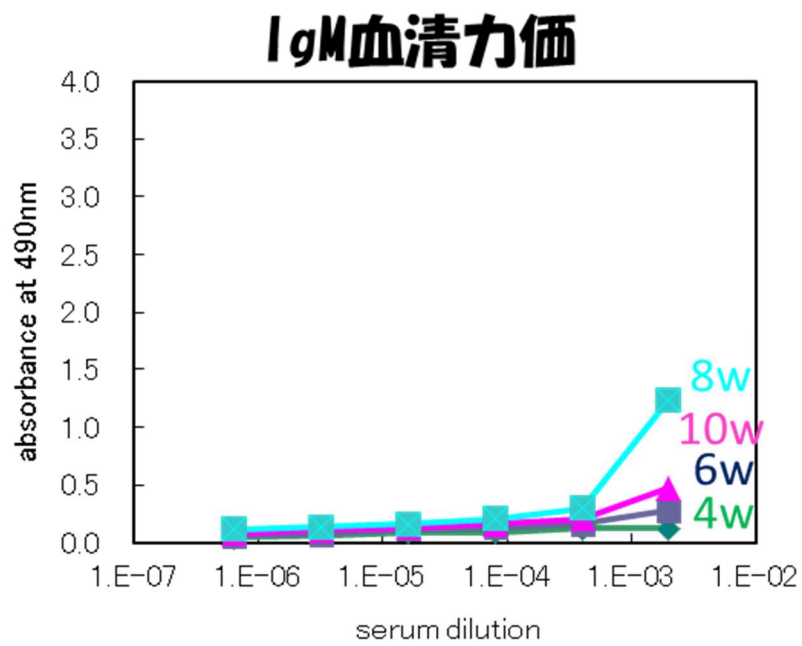


図 2-5 血清中の IgM 力価測定結果図

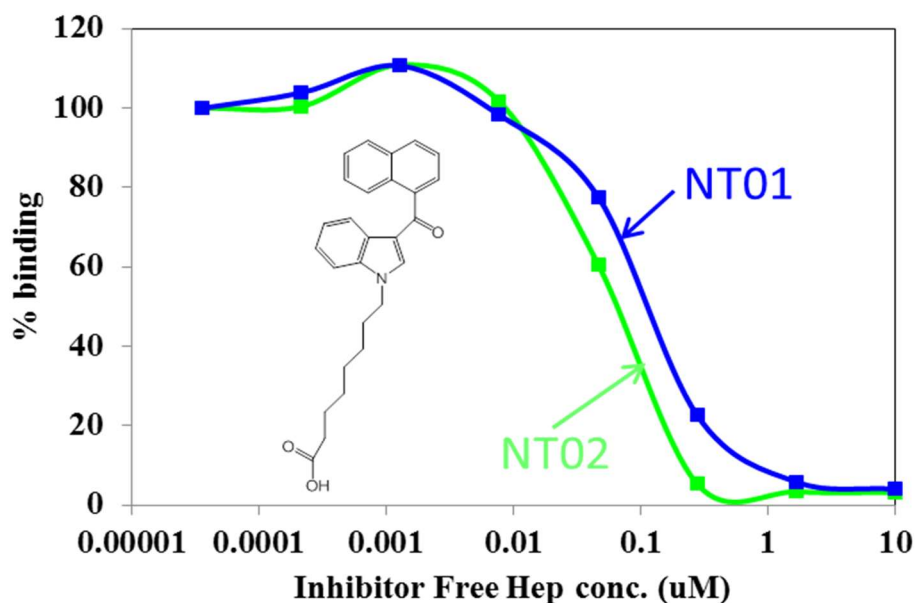


図 2-6 各モノクローナル抗体を用いた Hep に対する阻害活性評価結果図

表 2-1 NT01 モノクローナル抗体の各化合物に対する IC50 値表

| Name                           | IC50 (nM) |
|--------------------------------|-----------|
| Immunogen-1                    | 40        |
| Immunogen-2                    | 40        |
| 1-methyl-3-(1-naphthoyl)indole | 60        |
| 1-ethyl-3-(1-naphthoyl)indole  | 80        |
| 1-octyl-3-(1-naphthoyl)indole  | 80        |
| Naphtoyl-Indole                | 120       |
| 4-methyl-Naphtoyl-Indole       | 120       |
| Indole                         | 10000<    |
| Naphtylamine                   | 10000<    |
| Naphtic acid                   | 10000<    |

Immunogen-1 : 1-ヘプタン酸-3- (1-ナフトイル) インドール

Immunogen-2 : 1-酢酸-3- (1-ナフトイル) インドール

## 2-4 小括

Hep-KLH を免疫原として免疫した結果、2 種類のハイブリドーマ細胞 (NT01, NT02) を得ることができた。このハイブリドーマ細胞を培養することで得られた 2 種類のマウスモノクローナル抗体は、種々の 3-ナフトイルインドール誘導体と結合することが確認できた。一方、原料であるインドール、ナフチル酸などには結合しないことも確認した。

今回作製したマウスモノクローナル抗体は、種々の化合物に対して高感度に結合するため (IC<sub>50</sub>=約 100nM 以下)、これを用いて十分感度の高い検出器を作製することができると考えられる。



## 2-5 引用文献

1. Almagro, J. C. Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires. *J Mol Recognit* 2004, 17, 132-143.
2. Xu, Z. L.; Shen, Y. D.; Beier, R. C.; Yang, J. Y.; Lei, H. T.; Wang, H.; Sun, Y. M. Application of computer-assisted molecular modeling for immunoassay of low molecular weight food contaminants: A review. *Anal Chim Acta* 2009, 647, 125-136.
3. Fodey, T. L.; Greer, N. M.; Crooks, S. R. Antibody production: Low dose immunogens vs. low incorporation haptens using salmeterol as a model. *Anal Chim Acta* 2009, 637, 328-332.
4. Köhler, G.; Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975, 256, 495-497.

## 第3章

# ファージディスプレイ法を用いた 3-ナフトイルインドール誘導体特異的 VHH 抗体の作製及びその特性評価

### 3-1 小序論

近年では、抗体の低分子化が求められており、これまでに作製された Fab 抗体や scFv 抗体等に加え、ラマやラクダが有する一重鎖抗体の可変ドメインを切り出した VHH の monobody が singledomain antibody として注目されている(1)。

また、タンパク質抗原を中心として様々な抗体分子及び様々な分子骨格を用いた抗体様分子構築の試みもある(表 3-1)。

抗ハプテン抗体としては、リガンドポケットが深く、リガンドに対して相補的である anticalins(2)、長い CDR3 ループを有しキャビティ型のリガンドポケットを形成することができる VHH(1)及び元来のマウスモノクローナル抗体が適していると考えられる。

VHH 抗体を作製する方法の一つとして、1985 年に Smith 等により報告されたファージディスプレイ法(3)があり、この方法は、ハイブリドーマ法の問題点を克服する手法として開発されたものである。この方法により、抗体の多様性の増加、免疫原に対して非依存的であり、ヒト抗体作製等のメリットであるが、完全抗体製造には組換え DNA 操作を必要とする点や良質なライブラリの確保、高親和性ファージ抗体選択技術などで生じる技術的な困難さも欠点としてある。

このファージディスプレイ法は、生物学的に機能性タンパク質分子をその表面に提示するバクテリオファージの能力を利用して、抗体断片や目的の機能を持ったライブラリを作製し、迅速に単離する方法として広く利用されている。

このライブラリには、免疫した動物の単核球細胞由来の抗体遺伝子を抽出することにより構築した免疫ライブラリ、予め免疫をしないナイーブライブラリ、あるいは合成ライブラリ等がある。このようなライブラリの構築にあたっては、特異的なプライマーを設計し、抗体遺伝子断片を作製し、これらを M13 ファージベクターまたはファージミドベクターに挿入することにより作製する。

通常利用する繊維状ファージ M13 は、環状の一本鎖ゲノム DNA を持ち、そのまわりに 5 つのコートタンパク (g3p、g6p、g7p、g8p、g9p) がアセンブリーした細長い筒状の構造をしており、大腸菌に感染して増殖するウィルスである。

このファージディスプレイは、これらのファージコートタンパクと外来ポリペプチド (例えば、VHH 抗体) を融合した形で発現させることでファージ表面にディスプレイさせる。ファージに提示された外来ポリペプチドのアミノ酸配列はファージゲノムの塩基配列を読むことにより判定することができる。ファージ表面に発現するコートタンパク質としては、主に g3p、g8p がある。ファージ 1 匹に 5 分子存在する g3p を用いた場合、分子量約 50,000 程度までのポリペプチドをファージ 1 匹あたり 1-5 分子提示することができる (図 3-1)。

一方、ファージ 1 匹に約 3,000 分子存在する g8p を提示系として用いた場合 5 から 8 アミノ酸残基のポリペプチドを約 3,000 分子提示させることが可能である。ファージディスプレイ法は示したストラテジーによりターゲットに結合する分子を単離することができる (図 3-2)。

免疫した動物の単核球細胞より作製した抗体断片遺伝子群をファージミドベクター等に挿入しライブラリを作製する。ライブラリは目的抗原を固定化した

プラスチックプレート中で反応させ、洗浄後抗原に結合したファージを溶出させ回収する。大腸菌に感染させることにより増幅させた後、同様のパンニング操作を繰り返すことにより目的抗原に結合するファージクローンが選別される。パンニング後、選別したファージを E. coli HB2151 へ感染させることにより VHH 抗体を調整することが出来る。

今回の 3-ナフトイルインドール誘導体に対する抗体作製におけるファージディスプレイ法の最大の利点は、抗体の多様性を達成できる点である (4)。

さらには、ハイブリドーマ形成効率に依存しない点や、ディスプレイ化によるハイスループットな選択手法も非常に優れている。一方で、ファージディスプレイ法の課題としては、良質なライブラリの確保や高親和性ファージ抗体の選択技術において慎重な検討が必要となってくる点である。

本研究開発におけるハイブリドーマ法と比較して、ファージディスプレイ法の有用性を以下に述べる。

#### ① 多様な抗体作製

構造の類似した化合物間を識別する抗体を作製するためには、多様性の大きい抗体集団を作り上げ、その中から目的の性能を持つ抗体を選択することが重要である。この点から、ファージディスプレイ法を利用した方が多様性となる抗体獲得の可能性が高いと考えられる。

#### ② 遺伝子改変の容易性

ファージディスプレイ法では遺伝子を直接捕ってくる事ができるので、性能向上のための遺伝子改変（抗体エンジニアリングへの対応）も行い易いというメリットがある。

#### ② コスト面

ハイブリドーマ法で作製する抗体は、無血清培地もしくは血清が必要であり、高コストである。これに対してファージディスプレイ法は VHH 抗体を大腸菌で作製するため安価な大腸菌用培地で済むというメリットがある。

表 3-1 抗ハプテン抗体に最適な分子

|               | Ab        | Fab, scFv      | Domain Ab<br>(Domanist, UK) | VHH<br>(Ablynx, Belgry)                                    | anticalins<br>(Pieris, Germany) | affibody<br>(Affibody, Sweden) |
|---------------|-----------|----------------|-----------------------------|--|---------------------------------|--------------------------------|
| サイズ           | 150kDa    | 57kDa<br>27kDa | 13kDa                       | 15kDa  | <20kDa                          | 6kDa                           |
| 特異性           | pM-nM     | pM-nM          | nM                          | pM-nM  | pM-nM                           | pM-nM                          |
| ハプテン抗体に対する優位性 | 元来の免疫システム | 元来の免疫システム      |                             | CDR3 の long fingerlike extension により抗原結合 capacity を保有している。 | 深く、非常に相補的なリガンドポケットを形成する         |                                |

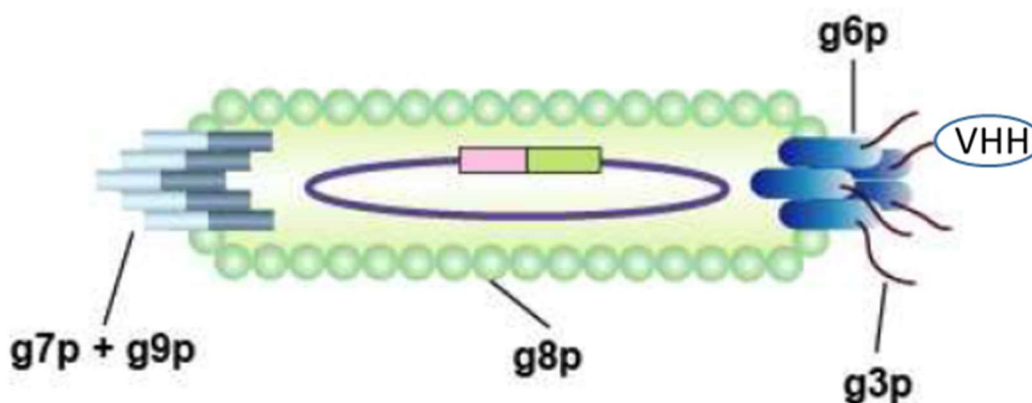


図 3-1 M13 ファージ模式図 (g3p に VHH 抗体提示)

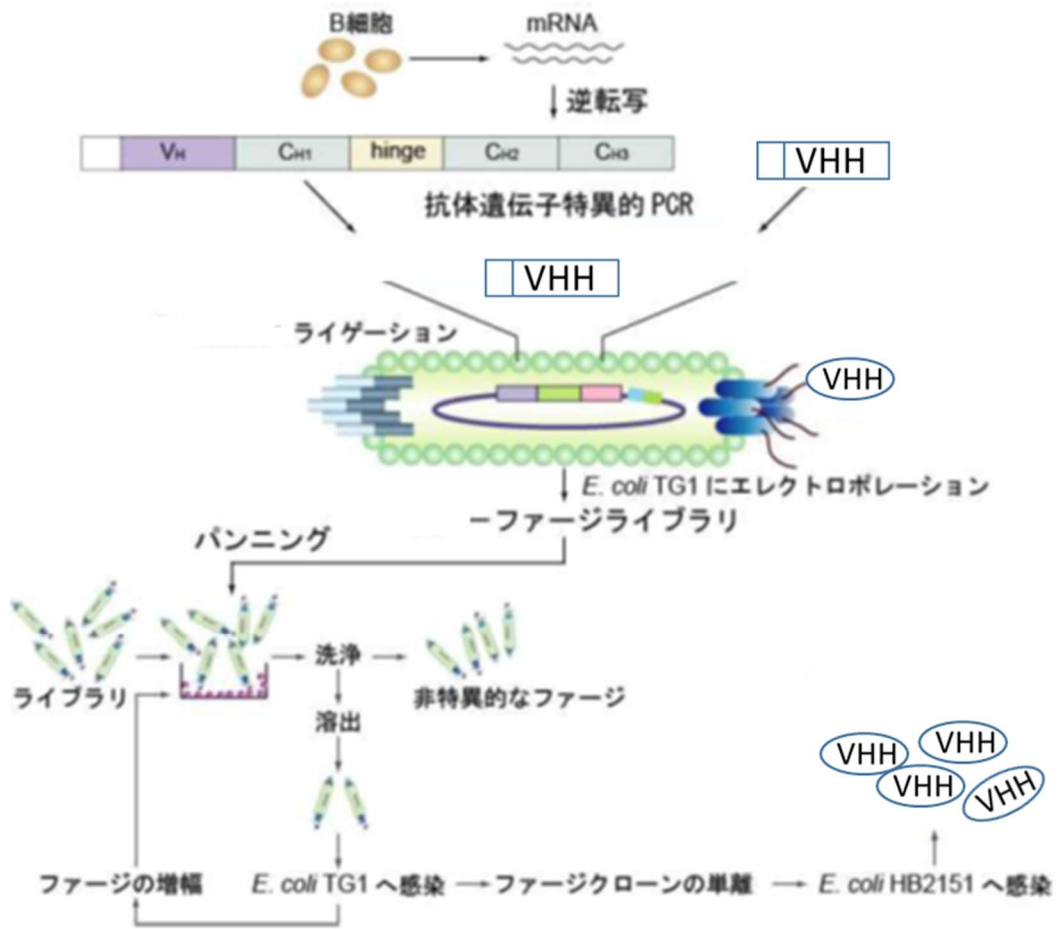


図 3-2 ファージディスプレイ法の概略図

## 3-2 材料と方法

### (1) 免疫原の合成

免疫原およびハプテンである 1-(ヘプチルー7-カルボシレート)-3-(1-ナルトイル) インドール (Hep) の合成は、2-2 で記載した方法を利用した。

500mg 水素化ナトリウムを 10ml テトラヒドロフランに溶かした 0.8g 3-(1-ナルトイル) インドール (Cayman Chemical 社より購入) 溶液に添加した。さらに、この反応液に室温で混ぜながら、0.79ml の 1-ブロモ-7-ヘプタン酸を添加した。その溶液を 80°C で 3 時間混ぜながら反応させた。その反応液を室温まで冷却後に水を適量添加後に酢酸エチルで 3 度分液抽出した。抽出液を減圧下で乾燥させて後にエタノール溶液中で再結晶をした。その結果、0.82g 1-(ヘプチルー7-カルボシレート)-3-(1-ナルトイル) インドールを得ることができた (収率 40%)。その化合物の NMR 結果は以下のとおりであった。

: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d 1.44(m, 2H), 1.52(m, 2H), 1.68(m, 2H), 1.89 (quint, 2H), 2.18(m, 2H), 4.12 (t, 2H), 4.45(m, 2H), 7.40 (s, H), 7.34 (m, 1H), 7.35 (m, 1H), 7.41 (m, 1H), 7.46 (m, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.55 (dt, 1H), 7.69 (dd, 1H), 7.93 (d, 1H), 8.00 (d, 1H), 8.23 (d, 1H), 8.45 (m, 1H);  
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d 25.4, 26.2, 29.1, 28.8, 29.6, 34.4, 47.1, 110.0, 117.8, 122.9, 122.9, 123.7, 124.5, 125.9, 126.0, 126.3, 126.7, 126.8, 128.1, 130.1, 130.8, 133.8, 137.4, 138.6, 138.9, 192.0.

上記で合成した 1.0mg Hep を 1.0ml ジメチルスルホキシド溶媒に溶解し、これに 0.2mg N-ヒドロキシサクシミドを添加した後に室温で 1 時間反応させた。その溶液にジクロロヘキシルカルボジイミドを添加して室温で 8 時間反応させた。その反応液に予め PBS (50mM、pH 7.4) で溶解した 10mg KLH を添加して、室

温で8時間反応させた。その後、PBS(50mM、pH 7.4)に対して10時間透析することにより5mgのHep-KLHを得ることができた。

一方、ELISA用固定化タンパク質の作製については、上記で使用したKLHの代わりに10mg BSAを用いて同じ方法により7mg Hep-BSAを得ることができた。

## (2) アルパカへの免疫

VHH抗体遺伝子ライブラリを作製するため、上記で合成したHep-KLHを免疫原としてアルパカに免疫した。具体的には、100ug/mlの濃度を有するHep-KLHをアルパカへ投与した(首付近皮下注射)。1週間後、再度、同じ濃度を有するHep-KLHをアルパカへ投与した。このようにして、5週間かけて5回Hep-KLHを用いて免疫した。

## (3) 単核球の取得

1週間後、アルパカの血液を採取した。次いで、以下のように血液から単核球を取得した。リンパ球分離チューブ(Leucosep)に、血球分離溶液(Lymphoprep)を添加し、その溶液を20°Cで1000×gで1分間遠心した。アルパカから採取した血液は、ヘパリンによって処理した後血液と等量のPBSを添加してサンプル液を得た。次いで、サンプル液は血球分離溶液を添加したリンパ球分離チューブに移し、20°C、800×gで30分遠心した後に、単核球を含有する画分を回収し、3倍の容量を有するPBSで希釈した。その希釈液を20°Cで300×gで5分遠心した。沈殿物が、PBSを用いて穏やかに懸濁した後に細胞数の測定のために10ulの懸濁液を分離した。残りの懸濁液を20°Cで300×gで5分間遠心した。その後、沈殿物に2mlの容積を有するRNA保存溶液(RNAlater)を添加した。その溶液は穏やかに懸濁した後に、2本の1.5mLチューブに1mlずつ注入した。そのチューブは、-20°Cで保存した。細胞数の測定のために分離した懸濁液(5ul)をチュルク液(15ul)と混合され、血球計算盤を用いて単核球数を数えた。



#### (4)VHH 抗体の cDNA 遺伝子ライブラリの作製

単核球から TOTAL RNA を抽出し、そして VHH 抗体の cDNA 遺伝子ライブラリを以下の手順で作製した。以下の手順では、RNase free grade の試薬および器具を使用した。

単核球分画に、トータル RNA 抽出試薬 (TRIzol Reagent) 1ml を加え、試薬は緩やかに混和した後室温にて 5 分間放置した。さらに、200ul クロロホルムを試薬に加え、15 秒間攪拌した後に室温で 2~3 分間静置し、4°C で 15 分間、12,000 ×g 以下で遠心した。各 200ul の RNase フリー水およびクロロホルムを添加した後に 500ml のイソプロパノールを添加した。攪拌した後に液体は室温で 10 分間静置し、次いで、その液体は 4°C で 15 分間、12,000 ×g 以下で遠心した。上清を捨て、沈殿物を 1ml の 75% エタノールでリンスした。この溶液は、4°C の温度で 5 分間、7,500 ×g 以下で遠心した後に乾燥し全 RNA を得た。得られた全 RNA は、RNase フリー水に溶解した。

Total RNA から cDNA を取得するため、逆転写酵素を含むキット (PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit) を用いた。キットに含まれる Random 6 mer および Oligo dT primer がプライマーとして使い、キットの標準プロトコルに従って cDNA が取得した。これにより、VHH 抗体の遺伝子を cDNA から PCR 法によって獲得した。

PCR の条件は下記のとおりである。

- ① 混合液を摂氏 95 度で 2 分間加熱
- ② 摂氏 96 度で 30 秒間
- ③ 摂氏 52 度で 30 秒間
- ④ 摂氏 68 度で 40 秒間

この②~④のサイクルを 30 回繰り返した。

最後に、摂氏 68 度で 4 分間加熱した後、4°C で保存した。

この PCR 法においては、以下のプライマーを使用した (5)。

primer 1: 5' - GGTGGTCCTGGCTGC -3'

primer 2: 5' - ctgctcctcgcGGCCCAGCCGGCCatggcTSAGKTGCAGCTCGTGGAGTC -3'

primer 3: 5' - TGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG -3'

primer 4: 5' - TTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG -3'

primer 5: 5' - tttgCtctGCGGCCGCagaGGCCgTGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG -3'

primer 6: 5' - tttgCtctGCGGCCGCagaGGCCgaTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG -3'

上記のプライマーそれぞれを用いて PCR を 3 回実施した。

1 回目の PCR では、cDNA、Primer 1 および Primer 3 からなるプライマーセット A、および cDNA、Primer 1 および Primer 4 からなるプライマーセット B が用いられた。

2 回目の PCR 法では、プライマーセット A を用いて増幅した遺伝子、Primer 2 および Primer 3 からなるプライマーセット C、およびプライマーセット B を用いて増幅した遺伝子、Primer 2 および Primer 4 からなるプライマーセット D が用いられた。

3 回目の PCR 法では、プライマーセット C を用いて増幅した遺伝子、Primer 2 および Primer 5 からなるプライマーセット E、およびプライマーセット D を用いて増幅した遺伝子、Primer 2 および Primer 6 からなるプライマーセット D が用いられた。

以上のようにして VHH 抗体の遺伝子ライブラリを形成した。

#### (5) フェージライブラリの作製

VHH 抗体の遺伝子ライブラリから、以下の手順に従ってフェージライブラリを作製した。市販品のプラスミド pUC119 由来のプラスミド Vector1 を制限酵素

SfiI により処理した。図 3-3A における制限酵素サイト SfiI (a) は、GGCCCAGCCGGCC により表される遺伝子配列からなり、制限酵素サイト SfiI (b) は、GGCCTCTGCGGCC により表される遺伝子配列からなる。

図 3-3B は、プラスミド Vector1 の詳細なベクターマップを示す。同様に、VHH 抗体の遺伝子ライブラリも制限酵素 SfiI により処理した。このようにして、VHH 抗体遺伝子断片が得られた。

このように処理したプラスミド Vector1 を VHH 抗体遺伝子断片と 1 : 2 の割合で混合した。混合液に、酵素 (Ligation High ver. 2) を注入し 16°C で 2 時間静置した。このようにして、VHH 抗体遺伝子断片をプラスミド Vector1 にライゲーションした後に、大腸菌 (HST02) にトランスフェクトした。

次いで、大腸菌は、100ug/ml の濃度を有するアンピシリンを含有する 2YT プレート培地上で 15 時間培養することにより、VHH 抗体を提示するファージライブラリを作製した。培養後、2YT プレート培地上に形成したシングルコロニーの数をカウントすることでライブラリの濃度を算出した。

#### (6) Hep-BSA に特異的に結合する VHH 抗体のスクリーニング

##### (A) Hep-BSA の固定化

10ug/ml Hep-BSA 溶液を 2ml イムノチューブに注入し 1 時間静置することによりイムノチューブの内部に Hep-BSA を固定化した。次いで、イムノチューブの内部を PBS で 3 回洗浄した後に、3% スキムミルクを含有する PBS を添加して室温にて 1 時間静置した。その後、イムノチューブを PBS で 3 回洗浄することによりブロッキングした。

##### (B) パンニング

VHH 抗体を提示するファージライブラリ (濃度 : 約  $2 \times 10^5$  /ml) を、3% スキムミルクを含有した 2ml の PBS と混合した混合液を、Hep-BSA を固定化したイ

ムノチューブに注入した。そのイムノチューブを、ローテーターを用いて10分間、回転させながら室温にて1時間静置した。次に、イムノチューブを0.05%の tween20 を含有する PBS (PBST) で10回洗浄した後、PBST を満たして10分間静置した。その後、PBST で10回洗浄した。Hep-BSA に結合した VHH 抗体を提示するファージを抽出するために、100mM トリメチルアミン溶液を1ml イムノチューブに注入した。その後、ローテーターを用いて、10分間回転させながら放置した。その後、溶液を中和するため、1mL の 0.5M Tris/HCl (pH: 6.8) を含有するチューブに移した。再度、100mM トリメチルアミン溶液 (1ml) を用いてファージの抽出を繰り返し、最終的に 3mL の抽出液が得られた。この抽出液 1mL を 9mL の大腸菌 HST02 と混合し、30°C で1時間静置した。コロニーを計数するため、大腸菌 HST02 を含有する 10ul の混合液は、2TYA 培地を含む小プレート (10ml/プレート) にまき、残りの混合液は遠心分離した。その沈殿物 2TYA 培地を含む大プレート (40ml/プレート) に蒔いた。これらの2つのプレートは、30°Cで一晩静置した。このようにして、1回目のパニングが行われた。

1回目のパニングの手順と全く同様に、2回目のパニングが行われた。その結果、VHH 抗体を提示するモノクローナルファージを精製した。2回目のパニングの後、大腸菌のコロニーが爪楊枝でピックアップし、96 平底プレートの1つのウェル (200ul の 2YTAG 培地を含有) に置かれた。そのウェルを 30°C で 213rpm 攪拌し、増殖した大腸菌を含む溶液 (50ul) を回収した。回収した溶液は、50ul の 2YTA 培地 (感染多重度 MOI が 20 になるようなヘルパーファージを含有) と混合し、37°C で 40 分間静置した後、1800rpm にて 20 分間遠心分離することにより大腸菌を回収した。その回収物を再度 200ul の 2YTAK 培地と混合し、30°C にて一晩静置した。その後、1800rpm にて 20 分間遠心分離し、大腸菌を回収した。

(C) ELISA によるファージ提示 VHH 抗体の評価

96 ウェルプレート (maxisorp) の各ウェルに、100ug/ml Hep-BSA 溶液を 50ul ずつ添加した後に、室温で 1 時間放置した。その後、PBS で 3 回洗浄し、3% スキムミルクを含有する PBS を 200ul/ウェルの割合で添加後に室温で 1 時間放置した。次に PBS で 3 回洗浄した後に VHH 抗体を提示するモノクローナルファージを 50ul/ウェルの割合で添加し、1 時間静置した。その後、PBST で 3 回洗浄した後に、抗 M13 抗体 (ab50370、10000 倍希釈) を 50ul/ウェルで添加した。次いで、各ウェルは PBST で 3 回洗浄した後に発色剤 (1-STEP ULTRA TMB-ELISA) を 50ul/ウェルの割合で添加した。2 分後に 1N 硫酸水溶液を 50ul/ウェルの割合で添加し、反応を停止させた。その後、450nm の波長での溶液の吸光度が測定した。

良好な吸光度測定の結果を有する 2 つのウェルを選択した。選択した 2 つのウェルに含有されるファージに含まれる DNA 配列を解析した。

#### (7) 抗 VHH 抗体の発現

抗 VHH 抗体の発現系ベクターを図 3-4 に示す。以下に作製手順を詳細に説明する。

まず、以下 2 つのプライマーおよび制限酵素 (PrimeSTAR Max DNA polymerase) を用いて、PCR により制限酵素サイト SfiI (a) をベクター pET22b (+) に付加した。

Primer 1: 5' - GCCGGCTGGGCcGCGAGGAGCAGCAGACCA -3'

Primer 2: 5' - GCCCAGCCGGCcATGGCCATGGATATCGGA -3'

次に、以下 2 つのプライマーおよび制限酵素 (PrimeSTAR Max DNA polymerase) を用いて、PCR により 5' 末端側および 3' 末端側にそれぞれ制限酵素サイト BamHI および XhoI を有する 3xFlag タグ DNA 断片を作製した。

Primer 1: 5' -

CATGGATATCGGAATTAATTCggatccGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCctcgagCACCAACCACCACCACCACTGA -3'

Primer 2: 5' -

TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTgctcgagGATGTCATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCggatccGAATTAATTCCGATATCCATG -3'

2つの制限酵素 BamHI および XhoI を用いて、この 3xFlag タグ DNA 断片およびベクター-pET22b (+) を処理した。Ligation Kit を用いて、3xFlag タグ DNA 断片が、ベクター-pET22b (+) にライゲーションした。このようにして、3xFlag タグおよび制限酵素サイト SfiI (a) が付加したベクター-pET22b (+) が得られた。以下2つのプライマーおよび制限酵素(PrimeSTAR Max DNA polymerase)を用いて、PCR法により5'末端側および3'末端側にそれぞれ制限酵素サイト NcoI および BamHI を有する DNA 断片を作製した。

Primer 1: 5' -

AAATACCTGCTGCCGccatggATATCGGAATTAATTCggcctctgcggccGCaggatccGACTACAAAGACCAT-3'

Primer 2: 5' -

ATGGTCTTTGTAGTCggatccTGCggccgcagaggccGAATTAATTCCGATATccatggCGGCAGCAGGTATTT-3'

次に、2つの制限酵素 NcoI および BamHI を用いて、この DNA 断片およびベクター-pET22b (+) を処理した。Ligation Kit を用いて、この DNA 断片がベクター-pET22b (+) にライゲーションした。このようにして、3xFlag タグおよび制限酵素サイト SfiI (a) (b) が付加したベクター-pET22b (+) が得られた。

ベクターpET22b (+) のシーケンスを解析するために、一般的な T7promoter primer セットが用いられた。シーケンスの解析を通して目的通りに形成されたことが確認されたベクターpET22b (+) が選択された。PCR により得られた液体に含まれるベクターpET22b (+) を、DNA 抽出キットを用いて 50ul の蒸留水中で精製かつ回収した。このようにして回収したベクターpET22b (+) が、SfiI 制限酵素により処理した。

一方、VHH 抗体の遺伝子ライブラリに含まれる VHH 抗体遺伝子断片がライゲーションしたプラスミド Vector1 が、SfiI 制限酵素で処理すると共に、これらの 2 つの DNA も SfiI 制限酵素により処理した。これらの DNA は、SfiI 制限酵素により処理したプラスミドに、DNA ライゲーションキットを用いてライゲーションした。ライゲーション溶液 (2.5ul) および大腸菌 HB2151 (25ul) が氷上にて混合し、6 分間氷上にて静置した後、42°C で 45 秒間加熱した。次にその混合液を 1 分間氷上で静置した。その後、この混合液を 100ug/ml の濃度でアンピシリンを含有する LBA 培地上に散布し、37°C で一晩静置した。

LBA 培地上に形成したコロニーの中から 2 つのコロニーを選択し、LBA 培地 (3ml) で一晩培養した。

培養した大腸菌に含まれるプラスミドは、プラスミド抽出キット (QIAprepspin miniprep kit) を用いて LBA 培地から抽出した。目的の VHH 抗体の遺伝子がプラスミドに挿入されていることを確認するため、プラスミドの配列を解析した。その後、選択したプラスミドを用いて大腸菌 (Competent Cell BL21 (DE3) pLysS) をヒートショック法によりトランスフェクトした。トランスフェクトした大腸菌を含有する溶液に、SOC 培地 (50ul) を添加し、213rpm で振とうされながら、37°C で 1 時間培養した。

その培養液から回収した大腸菌溶液 (5ml) を LBA 培地に散布し、37°Cで一晩、静置した。LBA 培地内に形成したコロニーの中から、1つのコロニーが選択した。ピックアップしたコロニーを LBA 培地 (3ml) 中で、213rpm で振とうされながら 37°Cで培養した。さらに、培養液 (25ml) を LBA 培地 (500ml) に混合し、600nm の波長において吸光度が 0.5 になるまで 37°C、160rpm で振とうした。吸光度が 0.5 となった後、イソプロピルチオガラクトシド溶液を最終濃度は 1mM になるように添加した。その後、37°Cで 6 時間培養し、6000rpm で 10 分間、4°Cで遠心することにより回収した大腸菌を PBS で攪拌、洗浄した。その大腸菌は、超音波を用いて破碎した後に 10000rpm で 15 分間、4°Cで遠心した。上清を 0.45um フィルタを用いて濾過した後に His-trap を用いて推奨プロトコルに従って精製した。このようにして得られた溶液に含有される抗体は、吸光度計 (nanodrop) を用いて、280nm での波長での吸収測定値に基づいて定量された。

#### (8) 抗 3-ナフトイルインドール誘導体 VHH 抗体の ELISA 評価

Hep-BSA を含有する溶液 (濃度 : 10ug/ml) を 50ul ずつウェルに添加し、室温で 2 時間静置することにより Hep-BSA をウェル内に固定化した。0.05% tween20 を含有する PBS (PBST) で 2 回洗浄後に、3% スキムミルクを含有する PBS で固相をブロックキングした。その後、PBST で 2 回洗浄を繰り返した。

その後、希釈した VHH 抗体を 50ul ずつ各ウェルに注入し、室温にて 1 時間静置した。次に、PBST で 2 回洗浄後に、標識抗体 (Monoclonal ANTI-FLAG M2 HRP antibody) PBS 溶液を各ウェルに 50ul/ウェル注入し、暗所にて 1 時間静置した。その後、PBST で 2 回洗浄後に、発色剤 (1-STEP ULTRA TMB-ELISA) 溶液を各ウェルに 50ul/ウェル注入し、30 分間静置され、発色剤を抗体と反応させた。



1N 硫酸水溶液 50ul/ウェルの濃度で各ウェルに添加することにより反応を停止させ後に 450nm の波長での溶液の吸光度が測定した。

#### (9) 抗 3-ナフトイルインドール誘導体抗体のインヒビション ELISA による

##### 交差反応性評価

2 種類の VHH 抗体と 3-ナフトイルインドール誘導体との交差反応性能力を ELISA 測定法により評価した。3-ナフトイルインドール誘導体合成の原料であるインドール、ナフチルアミンおよびナフトイル酸と 5 種類の 3-ナフトイルインドール誘導体 3-ナフトイルインドール誘導体である 3-ナフトイルインドール、3-(4-メチル-1-ナフトイル) インドール、1-メチル-3-(1-ナフトイル) インドール、1-エチル-3-(1-ナフトイル) インドール、1-オクチル-3-(1-ナフトイル) インドールをそれぞれ 40uM/L の濃度で含有する溶液を用意した。

##### 1) VHH 抗体(2-A1)の評価

Hep-BSA を含有する溶液（濃度：10ug/ml）を 50ul ずつウェルに添加後、室温で 2 時間静置することにより固定化した。その後、PBST で 2 回洗浄し、3%スキムミルクを含有する PBS ブロッキングした。その後、PBST で 2 回洗浄した。

50ng/m VHH 抗体溶液と予め希釈系列を作製した各 3-ナフトイルインドール誘導体溶液を各ウェルに 50ul ずつ添加し、1 時間室温にて静置した。その後、PBST で 2 回洗浄した。標識抗体 (Monoclonal ANTI-FLAG M2 HRP antibody) PBS 溶液を各ウェルに 50ul/ウェルずつ添加して暗所にて 1 時間静置した。その後、PBST で 2 回洗浄した。

発色剤 (1-STEP ULTRA TMB-ELISA) PBS 溶液を各ウェルに 50ul/ウェル注入した。30 分間静置され、発色剤を抗体と反応させた。

1N 硫酸水溶液を 50ul/ウェルずつ各ウェルに添加され、反応を停止させた。450nm の波長での溶液の吸光度が測定した。

## 2) VHH 抗体(2-E9)の評価

上記と同様の方法により VHH 抗体(2-E9)の評価を実施した。

ただし、ウェルに添加する VHH 抗体溶液の濃度は 3ug/ml とした。

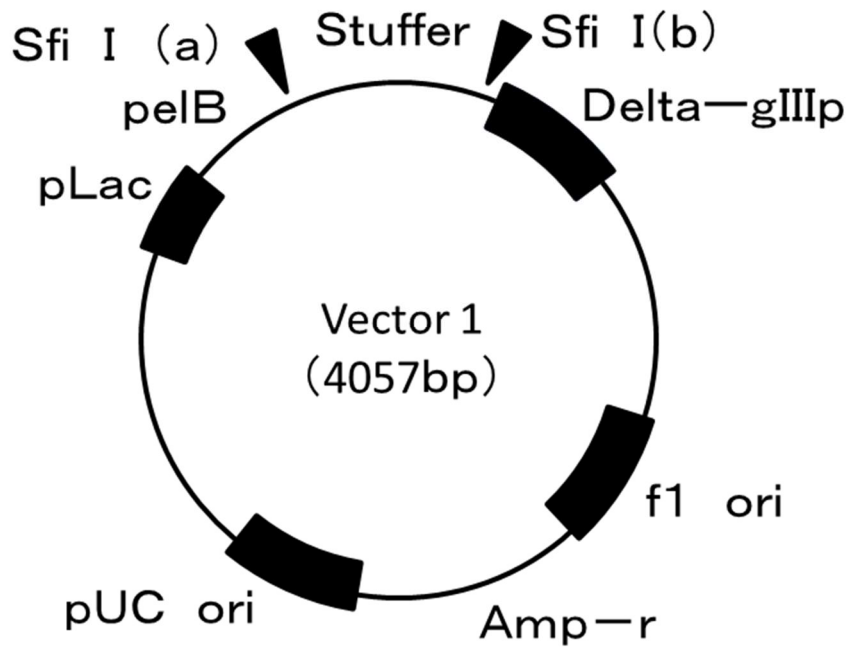
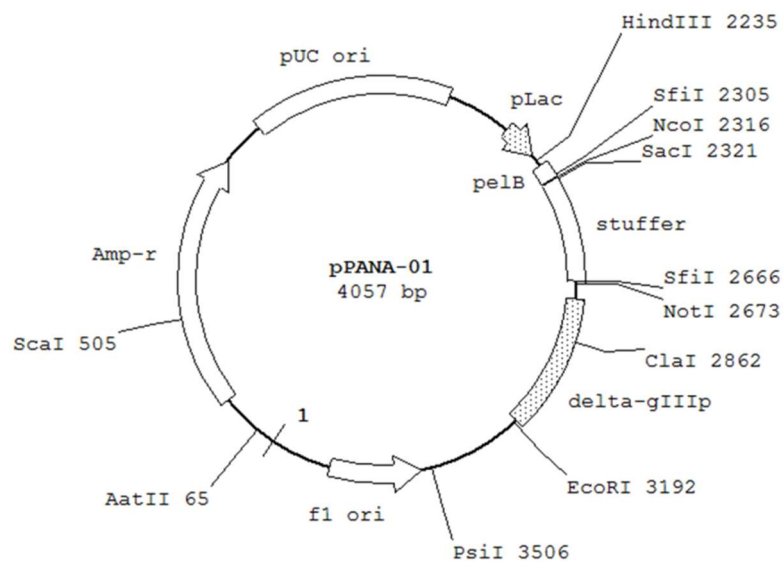


図 3-3A Vector1 制限サイトマップ図



Plasmid name:pPANA-01  
 Plasmid size:4057 bp  
 Constructed by:  
 Construction date:2014/09/01  
 Comment&Reference: This phagemid vector can be used for a phage display.  
 The original plasmid is pUC19.  
 SfiI(2305): GGCCcagccGGCC. SfiI(2666): GGCctctgcGGCC

図 3-3B Vector1 詳細マップ図

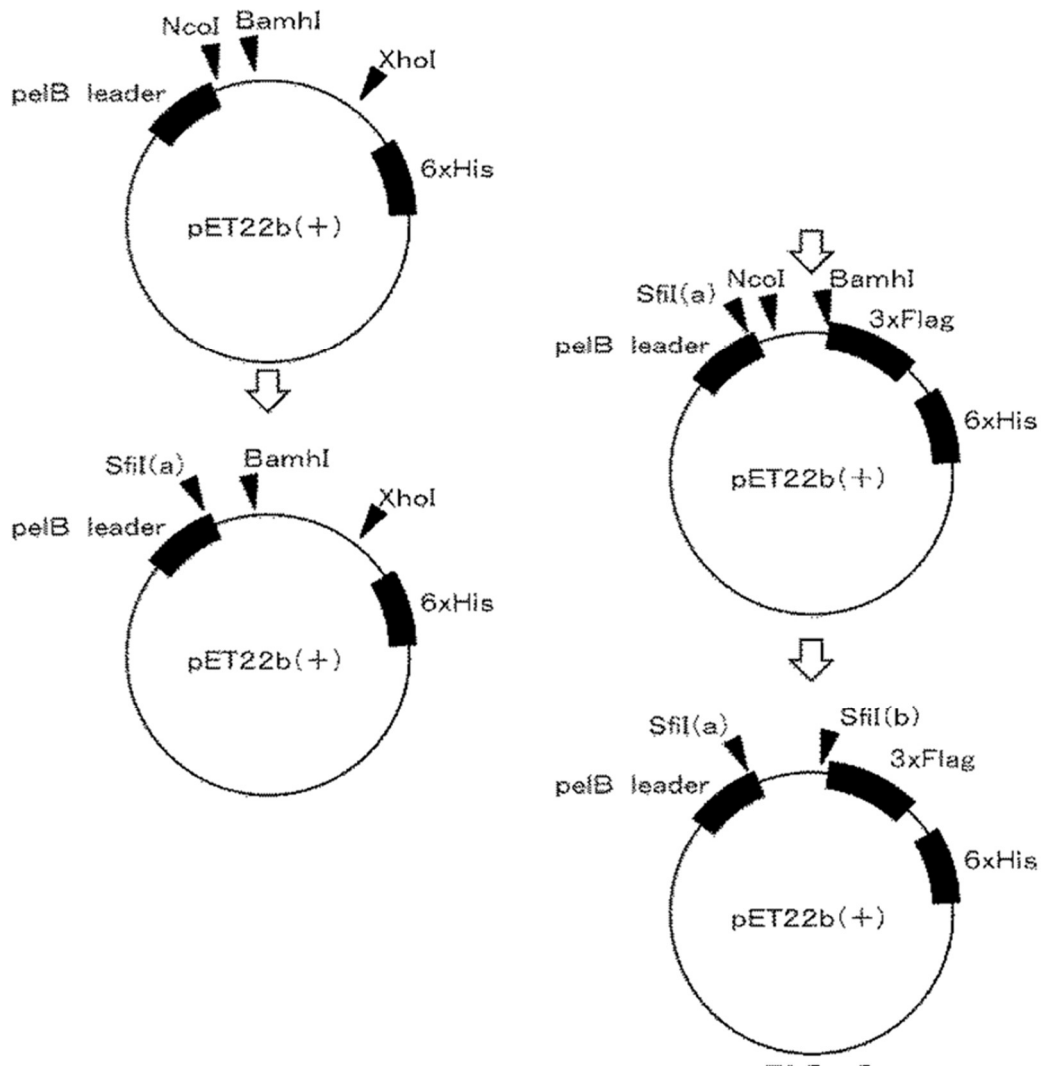


図 3-4 発現用ベクター作製図

### 3-3 結果と考察

上記のハイブリドーマ方法の場合と同じ免疫原を利用してアルパカに免疫し、その単核球から得た VHH 抗体遺伝子をファージライブラリー化した後に、パンニングにより Hep-BSA に結合するものだけを選別し、3-ナフトイルインドール誘導体に特異的に結合する VHH 抗体を作製することに成功した(図 3-5)。今回、得られた免疫ライブラリーの多様性は、 $2.0 \times 10^5$  個/ml であった。また、このライブラリーからパンニングにより少なくとも 2 クローンの VHH 抗体 (2-A1、2-E9) を得ることができた。それぞれを 500ml 培地で大腸菌にて発現させたところ、いずれの抗体についても 4mg ずつ得ることができた。

これらの VHH 抗体のアミノ酸配列を解析したところ下記のような配列であった。

#### ○VHH 抗体(2-A1)のアミノ酸配列

```
QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAATRRTSSTYAMGWFRQAPGKEREFVAASAASTYYADSVKGRFTIS
RDNVKKTVSLQMSGLKPEDTAVYYCAAGSAYALRIRRPDYWGQGTQVTVSSEPKTPKPKQSASAAAGSDYK
DHDGDYKDHDIDYKDDDDKLEHHHHHHH
```

#### ○VHH 抗体(2-E9)のアミノ酸配列

```
QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAATRRTSSTYAMGWFRQAPGKEREFVAASAASTYYADSVKGRFTIS
RDNAMVMVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGSAYALRIRRPDYWGQGTQATVSSEPKTPKPKQSASAAAGSDYK
DHDGDYKDHDIDYKDDDDKLEHHHHHHH
```

これらの配列を比較すると図 3-6 のように FR3 領域に若干の相違があるだけであった。

一方、VHH 抗体(2-A1)及び VHH 抗体(2-E9)の Hep-BSA への結合性能について ELISA 法を利用して測定した(図 3-7)。

この結果から、半値となる VHH 抗体濃度は、VHH 抗体(2-A1)の場合 50ng/ml で、VHH 抗体(2-A1)の場合は 3ug/ml であり、それぞれの抗体濃度で 3-ナフトイルインドール誘導体に対する結合性測定をした。

次に、3-ナフトイルインドール誘導体との交差反応性評価をインヒビション ELISA 法により実施したところ、VHH 抗体 (2-A1) については原料物質および 3-ナフトイルインドール誘導体との交差反応性測定結果を図 3-8 に、VHH 抗体 (2-E9) については原料物質および 3-ナフトイルインドール誘導体との交差反応性測定結果を図 3-9 に示した。

また、各 VHH 抗体に対する各種化合物に対する IC50 値を表 3-2 にまとめた。

その結果、VHH 抗体 (2-A1) は、3-ナフトイルインドール誘導体合成の原料であるインドールおよびナフトイル酸に対しては交差反応性を示さず、他の 5 種類の 3-ナフトイルインドール誘導体に対しては同程度の交差性を有していた (図 3-8)。一方、VHH 抗体(2-E9)も同様に、原料であるインドールおよびナフトイル酸に対しては交差反応性を示さず、他の 5 種類の 3-ナフトイルインドール誘導体に対しては同程度の交差性を有していた (図 3-9)。

VHH 抗体 (2-A1) と VHH 抗体(2-E9)を比較したところ、VHH 抗体 (2-A1) の方が、より高感度に 3-ナフトイルインドール誘導体を検出できる可能性を示していた。

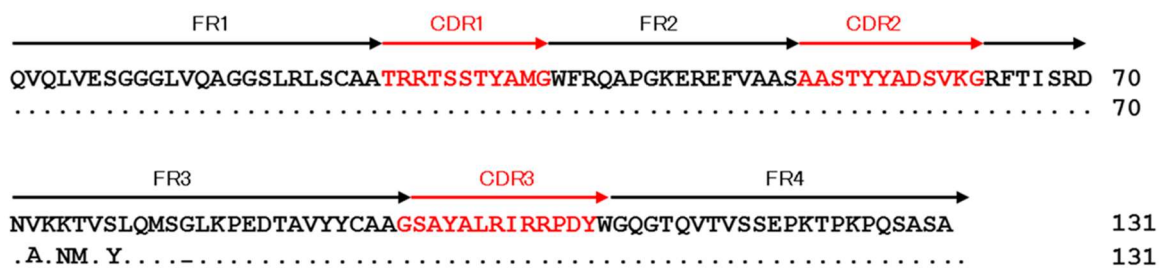


図 3-6 各VHH抗体のアミノ酸配列比較図

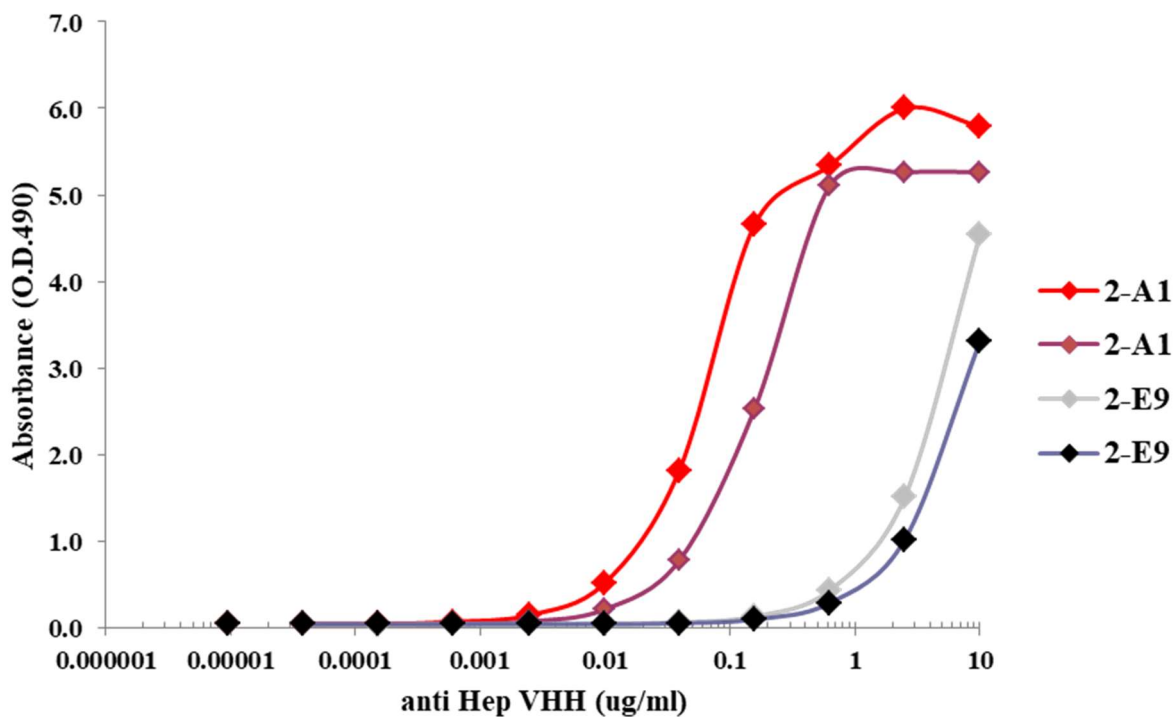


図 3-7 VHH 抗体 (2-A1、2-E9) の結合性能評価図

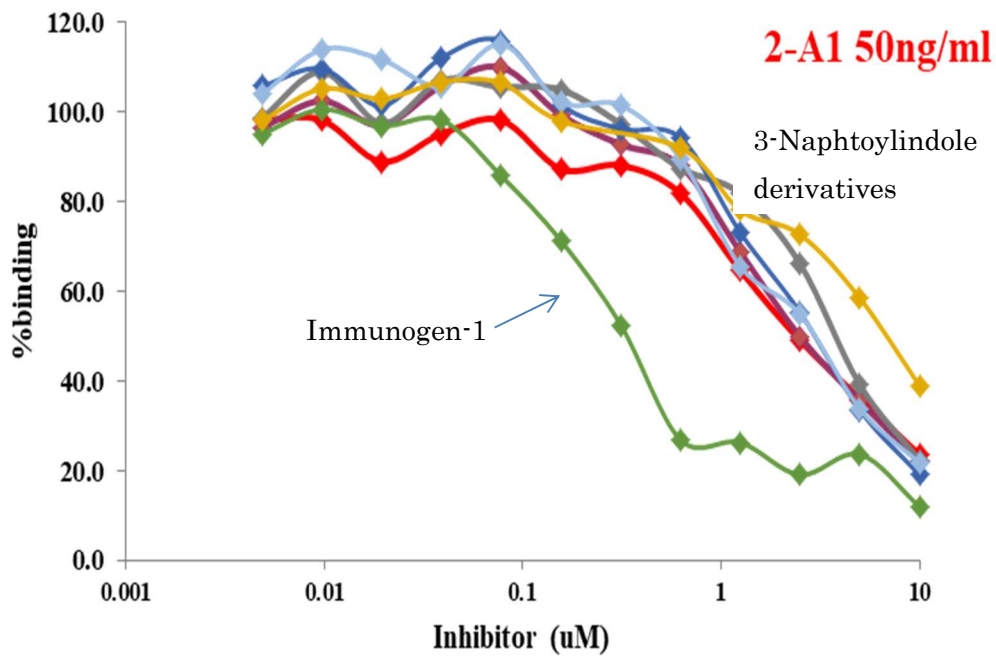


図 3-8 VHH 抗体 (2-A1) の感度特性評価図

Immunogen-1 : 1-ヘプタン酸-3- (1-ナフトイル) インドール

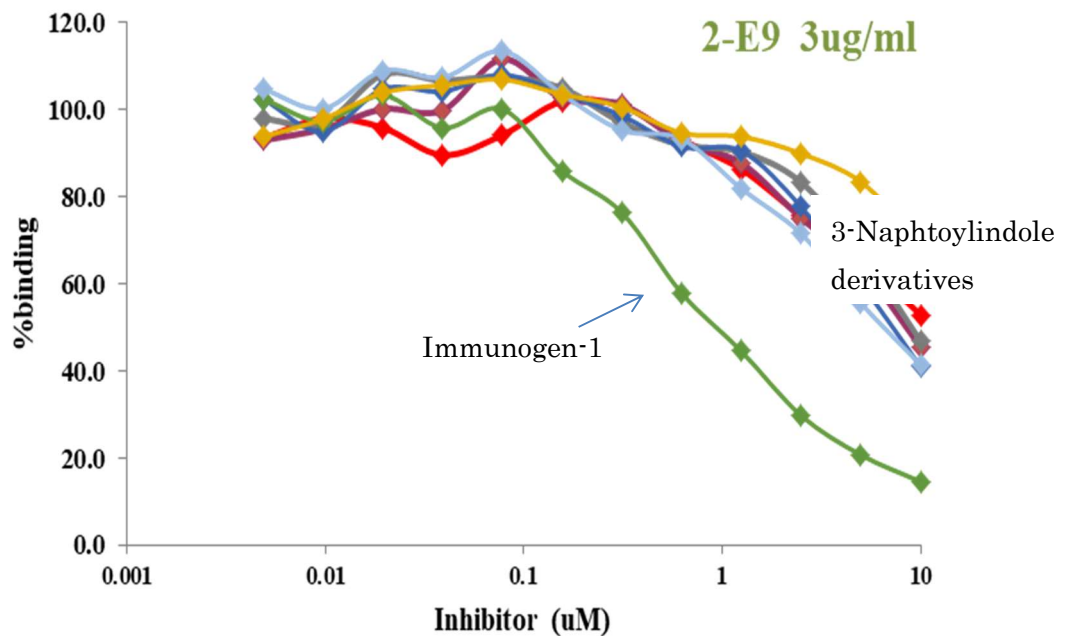


図 3-9 VHH 抗体 (2-E9) の感度特性評価図

Immunogen-1 : 1-ヘプタン酸-3- (1-ナフトイル) インドール



表 3-2 各化合物の IC50 値 (uM) 表

| <b>Ligand</b> | <b>VHH<br/>2-A1</b> | <b>VHH<br/>2-E9</b> |
|---------------|---------------------|---------------------|
| 1-methyl-3NI  | 2.64                | > 10                |
| 1-ethyl-3NI   | 2.83                | 8.75                |
| 1-octyl-3NI   | 3.84                | 9.14                |
| NI            | > 10                | > 10                |
| Methyl-NI     | > 10                | > 10                |
| Indole        | > 10                | > 10                |
| Naphtoylamine | > 10                | > 10                |
| Naphtoic acid | > 10                | > 10                |
| Immunogen-1   | 0.61                | 1.08                |

Immunogen-1 : 1-ヘプタン酸-3- (1-ナフトイル) インドール

### 3-4 小括

Hep-KLH 抗原をアルパカに免疫した結果、 $2.0 \times 10^5$  個/ml という多様性を有するファージライブラリーを作製した。そのライブラリーをパンニングし、大腸菌中で発現させることにより 2 種類(2-A1、2-E9)の VHH 抗体を得ることができた。この 2 種類の VHH 抗体は、種々の 3-ナフトイルインドール誘導体と結合することを確認できた。一方、原料であるインドール、ナフチル酸などには結合しないことを確認した。

しかしながら、第 2 章で作製したマウスモノクローナル抗体は、種々の化合物に対して高感度に結合 ( $IC_{50}$ =約 100nM 以下) していたが、それと比較して今回の VHH 抗体は 1/10~1/100 の親和性しか有しておらず、これを用いて十分感度の高い検出器を作製することはできないと考えられる。また、今回示していないが、各抗体の  $T_M$  値 (蛋白質の主鎖構造が 50%崩れた温度のこと) も  $50^\circ\text{C}$  以下と低いため、保存安定性の面からもセンサ材料としては、不適當であると考えられる。

### 3-5 参考文献

1. Wesolowski, J.; Alzogaray, V.; Reyelt, J.; Unger, M.; Juarez, K.; Urrutia, M.; Cauerhff, A.; Danquah, W.; Rissiek, B.; Scheuplein, F.; Schwarz, N.; Adriouch, S.; Boyer, O.; Seman, M.; Licea, A.; Serreze, D. V.; Goldbaum, F. A.; Haag, F.; Koch-Nolte, F. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol* 2009, 198, 157-174.
2. Skerra, A. Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *Febs J* 2008, 275, 2677-2683.
3. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985, 228, 1315-1317.
4. Moghaddam, A.; Borgen, T.; Stacy, J.; Kausmally, L.; Simonsen, B.; Marvik, O. J.; Brekke, O. H.; Braunagel, M. Identification of scFv antibody fragments that specifically recognise the heroin metabolite 6-monoacetylmorphine but not morphine. *J Immunol Methods* 2003, 280, 139-155.
5. Dan WANG, Yang XU, Zhui TU, Jin Heng FU, Yong Hua XIONG, Fan FENG, Yong TAO, Da LEI Isolation and Characterization of Recombinant Variable Domain of Heavy Chain Anti-idiotypic Antibodies Specific to Aflatoxin B1  
*Biomed Environ Sci*, 2012; 27(2):118-121

## 第4章

### マウスモノクローナル抗体を用いた簡易検出方法の検討

#### 4-1 小序論

今回作製したマウスモノクローナル抗体を用いて、免疫クロマトグラフィー方法及び、蛍光増強阻害法による簡易検出法を検討した。

以下にこれら2種類の方法について記載する。

##### ●免疫クロマトグラフィー方法

従来、覚せい剤やコカインなどの低分子薬物を検出する方法としては、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法やガスクロマトグラフィー（GC）法による機器分析的手法が用いられていた(1-6)。しかし、これらの手法は、有機溶媒等を使用して検体から抽出液を得た後、HPLC法やGC法を用いて分離し、各種検出器（紫外線（UV）、マススペクトル（MS）など）により同定する工程を要し、感度が比較的高く、同定・定量等が可能である反面、大掛かりな分析機器を使用しなければならず、また、その操作技術の習得も必要とするので簡便でなく、現場向きでないという問題点があった。このような機器分析的手法の欠点を解決するために、種々の分析法が開発されており、例えば、有機化学反応による分析法として、インドール骨格に対して反応するエールリッヒ反応を利用したものが知られている。しかし、この分析法は、トリプトファンやセロトニンのようなインドール環を有する非麻薬成分に対しても反応するため、擬陽性が現れる可能性が高かった。

一方、免疫測定方法としては、覚せい剤やコカインなどに特異的に結合を示すモノクローナル抗体を用いたアッセイ法（7-14）は多く報告されており、麻薬取締りの現場では金コロイド標識した抗体を利用した製品であるトライエージ DOA が使用されている。この製品は、競合的結合免疫学的測定法により、尿中に排泄された乱用薬物を検出するものであって、フェンサイクリジン類、ベンゾジアゼピン類、コカイン類、覚醒剤、大麻、モルヒネ類、バルビツール酸類および三環系抗うつ剤を検出することが可能である。しかしながら、合成カンナビノイドのひとつである 3-ナフトイルインドール誘導体については検出できなかった。そこで今回、3-ナフトイルインドール誘導体を検出するための免疫クロマトグラフィー方法について検討した。

以下に、3-ナフトイルインドール誘導体を検出するための免疫クロマトデバイス材料及び作製の概要について記載する。図 4-1 に免疫クロマトグラフィーデバイスの概略図を示す。

使用されるメンブレンは、3-ナフトイルインドール誘導体の抗原決定基を備えた Hep-BSA を固定化したものであって、検体試料自体またはこれを含む液体がクロマト展開できるメンブレンである。メンブレンとしては、例えば、セルロース類膜（濾紙、ニトロセルロース膜等）、ナイロン膜、ガラス繊維膜などのメンブレンが挙げられ、なかでもニトロセルロース膜が最適である。

Hep-BSA は、メンブレンの所定位置に予め固定されテストラインを形成させる。Hep-BSA 溶液をメンブレンの所定位置にライン状に塗布し、これを室温で十分に乾燥させることで容易に固定化できる。

一方、3-ナフトイルインドール誘導体に対するモノクローナル抗体は、予めコロイド金属および着色ラテックスなどの呈色標識物質で標識しておく。コロイド金属の代表例としては、白金コロイド、金コロイドなどが挙げられる。コ

ロイド金属の粒子の大きさは、直径3～100nm程度とされる。着色ラテックスの代表例としては、赤色および青色などのそれぞれの顔料で着色されたポリスチレンラテックスなどの合成ラテックスがある。着色ラテックスの大きさは、直径数十nmから数百nm程度から選択することができる。

呈色標識抗体の調製は、各呈色標識物質に応じた常法に従って行なわれ、たとえば、呈色標識物質が金コロイド粒子の場合には、抗体と金コロイド溶液とを室温乃至常温下で数分間、混合することによって両者を物理的に結合できる。

この金コロイド修飾抗体は、メンブレンにクロマト展開可能な位置に配置されていればよく、適当な溶液透過性のコンジュゲートパッドに含浸させてメンブレンに接続させておく。コンジュゲートパッドとしては、あらかじめ金コロイド修飾抗体の溶液を含浸させる際に、すみやかに吸収・保持・乾燥し得るものであって、かつ、クロマト展開される検体試料により容易に再溶解され、クロマト展開がスムーズに進行するものであればよい。コンジュゲートパッドの材質として、例えば、ガラス繊維布、セルロース類布（濾紙、ニトロセルロース等）、ポリエチレン、ポリプロピレン等の多孔質プラスチック布類が挙げられるが、特にガラス繊維布が最適である。

なお、メンブレンのクロマト展開下流側には、メンブレンの毛細管現象によるクロマト展開を補助するとともに、クロマト展開において捕捉部位でトラップされなかったものを吸収、保持するために、吸収パッドを接続しておく。吸収パッドの材料としては、液体をすみやかに吸収、保持できる材質のものであればよく、綿布、濾紙、およびポリエチレン、ポリプロピレン等からなる多孔質プラスチック不織布等があり、特に濾紙が最適である。

作製した免疫クロマトデバイスの流れとしては、検体試料をサンプルパッドに添加後、コンジュゲートパッドに浸透し、検体試料中に3-ナフトイルインド

ール誘導体が含まれている場合は、3-ナフトイルインドール誘導体は金コロイド修飾抗体と抗原抗体反応することにより複合体を形成し、メンブレン上にクロマト展開されるが、テストラインで捕捉されずに通過する。

一方、3-ナフトイルインドール誘導体と反応しなかった金コロイド修飾抗体は、テストラインで捕捉されて集積する。したがって、検体試料中に含まれる3-ナフトイルインドール誘導体が少ないほど、テストラインにおける金コロイド修飾抗体の集積量は増大する。テストラインにおける呈色の度合いを判定することにより、検体試料中の3-ナフトイルインドール誘導体の存否および含有量を判定できる。

なお、メンブレンのテストラインのクロマト展開下流側に、3-ナフトイルインドール誘導体モノクローナル抗体に対する抗マウスモノクローナル抗体を固定してコントロールラインを設けることが好ましい。この場合、3-ナフトイルインドール誘導体と3-ナフトイルインドール誘導体モノクローナル抗体との複合体はテストラインを通過して該コントロールラインに捕捉されて集積する。したがって、検体試料中に含まれる3-ナフトイルインドール誘導体が少ないほど、コントロールラインにおける3-ナフトイルインドール誘導体モノクローナル抗体の集積量は減少する。このように、テストラインとコントロールラインにおける3-ナフトイルインドール誘導体モノクローナル抗体の各集積量は、検体試料中に含まれる3-ナフトイルインドール誘導体の量に対して逆の関係にある。すなわち、検体試料中に含まれる3-ナフトイルインドール誘導体の量が少ない場合には、テストラインにおける3-ナフトイルインドール誘導体モノクローナル抗体の集積量が多くなり、コントロールラインにおける3-ナフトイルインドール誘導体モノクローナル抗体の集積量は少なくなる。一方、検体試料中に含まれる3-ナフトイルインドール誘導体の量が多い場合には、テストライン

における 3-ナフトイルインドール誘導体モノクローナル抗体の集積量が少なくなり、コントロールラインにおける 3-ナフトイルインドール誘導体モノクローナル抗体の集積量は多くなる。したがって、3-ナフトイルインドール誘導体モノクローナル抗体を金コロイドなどで呈色標識した場合は、これらテストラインおよびコントロールラインのそれぞれにおける呈色の度合いを対比して判定することにより、検体試料中の 3-ナフトイルインドール誘導体の存否および含有量をより一層正確に判定できる。なお、コントロールラインにおける 3-ナフトイルインドール誘導体モノクローナル抗体の集積により、クロマト展開の終了を確認することもできる。

抗マウスモノクローナル抗体のメンブレンへの固定化は、常法により行うことができ、代表的には、抗マウスモノクローナル抗体とヒト血清アルブミンやウシ血清アルブミン等の血清アルブミンとの混合液をメンブレンの所定位置にスポット状またはライン状に塗布し、これを室温で十分に乾燥させることで容易に行える。



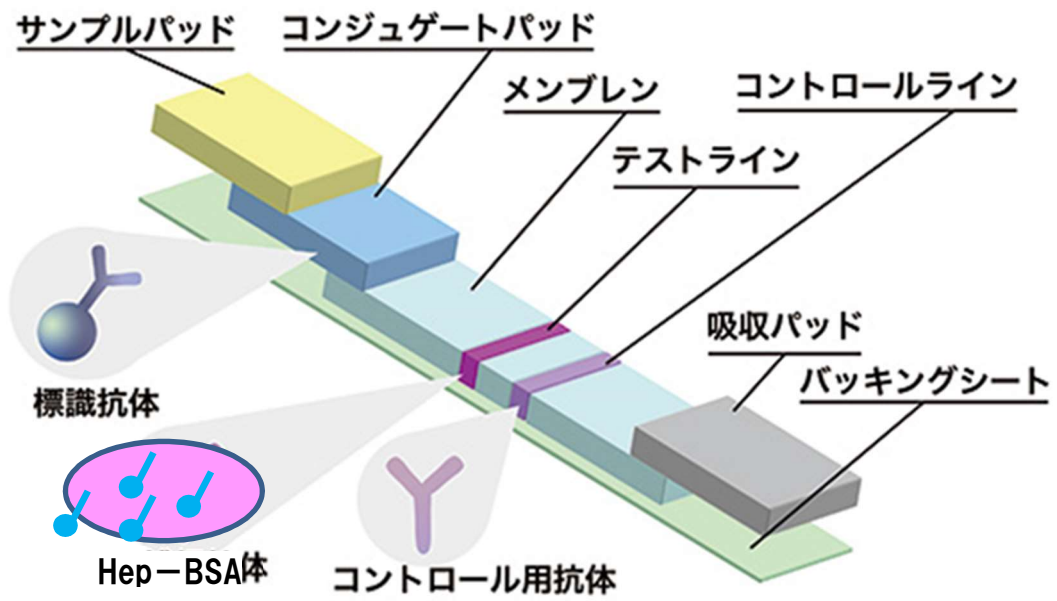


図 4-1 免疫クロマトデバイス概略図

## ● 蛍光増強阻害法

従来、蛍光免疫を利用した測定方法として、蛍光増強法、蛍光消光法、蛍光増強阻害法および蛍光消光阻害法が知られている。

これらの方法は、抗体と蛍光色素標識された抗原が免疫反応することにより標識蛍光色素の蛍光強度が変化することを利用したものである。また、これらの方法は、ハプテン（低分子量物質）を検出する手段として利用されることがあった(15, 16)。その原理は、以下のとおりである。

### ① 蛍光増強法

この方法は、ハプテン自身が抗体と結合することにより、抗体の抗原結合付近に存在するトリプトファン（蛍光特性を有するアミノ酸）の蛍光が増強することにより起こる現象を利用した測定法である。例としては、メタンフェタミンとある特定の抗体との組み合わせで起こる現象である。

### ② 蛍光消光法

この方法は、ハプテン自身が抗体と結合することにより、抗体の抗原結合付近に存在するトリプトファン（蛍光特性を有するアミノ酸）の蛍光が消光することにより起こる現象を利用した測定法である。例としては、ニトロ基を有するハプテン（ジニトロベンゼン、トリニトロトルエンなど）の場合に起こる現象である。

### ③ 蛍光消光阻害法

抗原抗体反応時に抗体の抗原結合部位にハプテンに標識した消光物質の一部あるいは全部が取り込まれることにより起こることが知られている。この場合、上記のようにニトロ化合物を標識物として使用することにより、上記蛍光消光法と同様に、抗原結合部位の付近のトリプトファンの消光による現象である。

### ④ 蛍光増強阻害法

抗原抗体反応時に抗体の抗原結合部位に、ハプテンに標識した蛍光物質の一部あるいは全部が取り込まれることにより起ることが知られている。この場合、一般的な蛍光色素を標識物として使用することにより起こる現象であり、抗体側の組成に影響されない。つまり、抗原結合部位付近にトリプトファンがなくても利用できる方法である。

以上のことから、抗体の構造に左右されることなく、ハプテンのような低分子化合物を、このような蛍光測定技術を利用して検出する場合に、この蛍光増強阻害法は簡単に利用できる方法であると判断できる。すでに以前、我々はこの方法を用いて覚醒剤やコカインを検出したことを報告した(17)。今回、この方法を利用して3-ナフトイルインドール誘導体を検出することにした。

この蛍光増強阻害法は、抗体と蛍光色素標識抗原が結合することにより一旦、蛍光強度が増加した混合物に、抗原を含む検体を添加すると蛍光強度が減少することを利用したものです。このことを利用して検体中の抗原、今回の場合には3-ナフトイルインドール誘導体を検出あるいは、定量することが出来る検出技術である。

この検出系プロセスの概要を下記に示す(図4-2)。

予め測定セルに適当な濃度の蛍光色素標識3-ナフトイルインドール誘導体溶液を添加し、蛍光色素特有の励起波長の光を照射し蛍光波長を測定する。その後、この溶液に抗3-ナフトイルインドール誘導体モノクローナル抗体溶液に添加し、同じように蛍光色素特有の励起波長の光を照射し蛍光波長を測定する。

上記モノクローナル抗体と蛍光色素標識3-ナフトイルインドール誘導が結合することにより、蛍光色素部分が抗体の抗原結合領域(通常、疎水性を有する領域)に入ることにより蛍光強度が増加する。その後、これに3-ナフトイルインドール誘導体を含む検体を添加すると、予め結合していた蛍光色素標識3-ナ

フトイルインドール誘導体が抗体から外れて蛍光強度が減少する（図 4-2、図 4-3）。

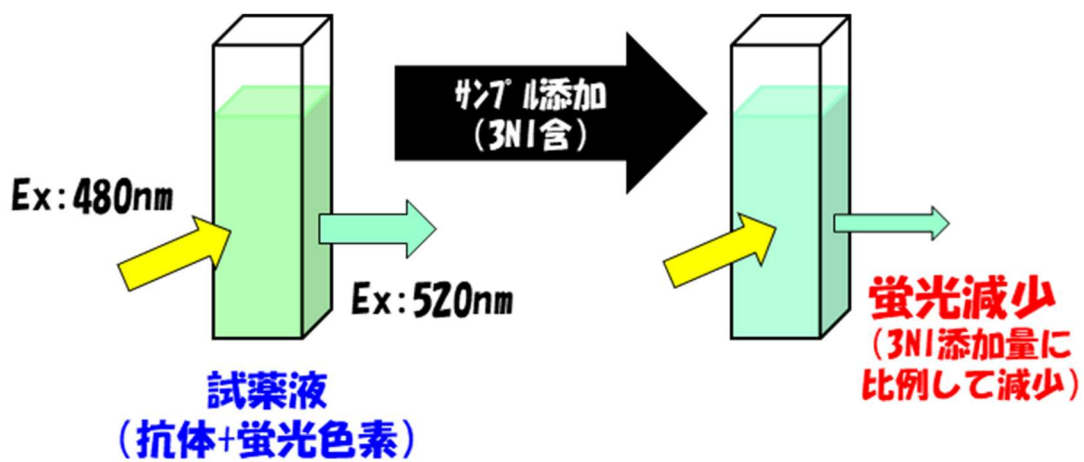


図 4-2 蛍光増強阻害法の概念図

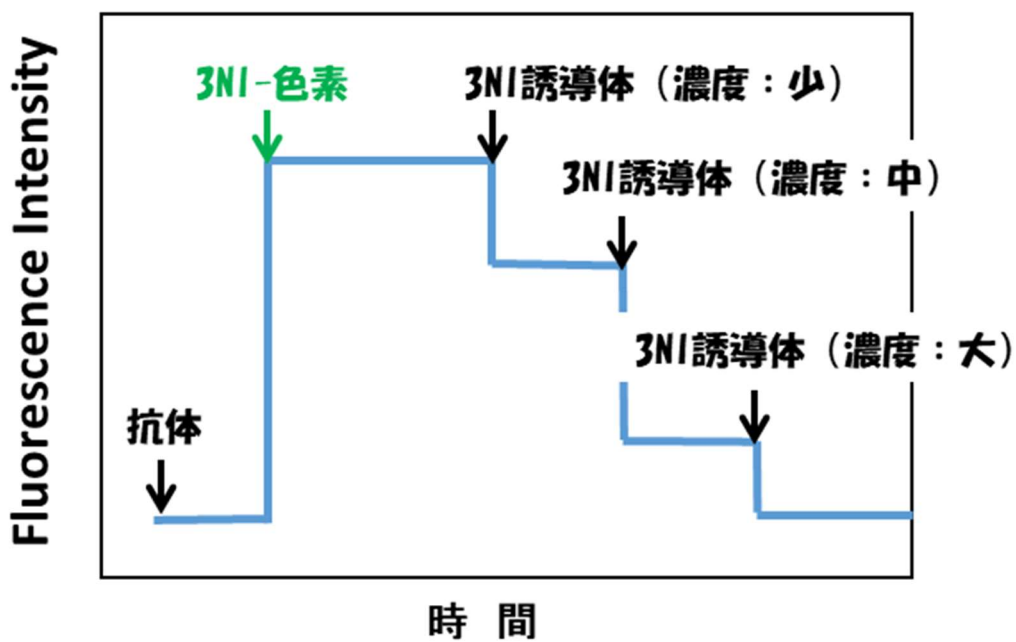


図 4-3 蛍光増強阻害法のセンサグラムイメージ図

## 4-2 材料と方法

### ●免疫クロマトグラフィー技術を利用した

#### 3-ナフトイルインドール誘導体の検出

今回の作製した免疫クロマトデバイスは、文献(18)の方法に少し修飾することにより作製した。具体的な作製方法については下記に記載する。

#### (1) 抗 3-ナフトイルインドール誘導体モノクローナル抗体の金コロイド標識

##### ①金コロイド溶液の調製

加熱によって沸騰させた超純水 99ml に、1% (v/w) 塩化金酸水溶液 1ml を加え、さらに、その 1 分後に 1% (v/w) クエン酸ナトリウム水溶液 1.5ml を加えて加熱し 5 分間沸騰させた後、室温に放置して冷却した。次いで、この溶液に 200mM 炭酸カリウム水溶液を加えて pH9.0 に調製し、これに超純水を加えて全量を 100ml として金コロイド溶液を得た。

##### ②金コロイド標識抗体溶液の調製

抗 3-ナフトイルインドール誘導体モノクローナル抗体溶液と上記の金コロイド溶液をそれぞれ 1ml ずつ混合し、室温で 2 分間静置してこの抗体を金コロイド粒子表面に結合させた。その後、金コロイド溶液における最終濃度が 1% になるように 10%ウシ血清アルブミン (BSA) 水溶液を加え、この金コロイド粒子の残余の表面をブロッキングすることにより、金コロイド標識抗 3-ナフトイルインドール誘導体モノクローナル抗体 (金コロイド標識抗体) 溶液を調製した。この溶液を遠心分離 (7000rpm、25°C、25 分間) して金コロイド標識抗体を沈殿し、上清液を除いて金コロイド標識抗体を得た。この金コロイド標識抗体を 10% サッカロース・1%BSA・0.5%トリトン (Triton) -X100 を含有する PBS (pH7.4) に懸濁して金コロイド標識抗体溶液を得た。

#### (2) 免疫クロマトグラフィーテストストリップの作製

#### ①テストラインの形成

幅 5mm、長さ 40mm の帯状のニトロセルロース膜をクロマト展開用メンブレンとして用意した。Hep-BSA 1mg/ml が含まれる溶液 0.5ul を、このクロマト展開用メンブレンにおけるクロマト展開開始側の末端から 6.0mm の位置にライン状に塗布して、これを室温にて乾燥し、未反応の金コロイド標識抗体を捕捉するテストラインとした。

#### ②コントロールラインの形成

市販の抗マウスモノクローナル抗体 0.2mg/ml が含有している溶液 0.5ul を、このクロマト展開用メンブレンにおけるクロマト展開開始側の末端から 15mm の位置にライン状に塗布して、これを室温で乾燥し 3-ナフトイルインドール誘導体と反応した金コロイド標識抗体を捕捉するコントロールラインとした。

#### ③金コロイド標識抗体コンジュゲートパッド

5mm×15cm の帯状のガラス繊維不織布に、金コロイド標識抗体溶液 600ul を含浸し、これを室温で乾燥させて金コロイド標識抗体コンジュゲートパッドとした。

#### ④イムノクロマトグラフィーテストストリップの作製

上記クロマト展開用メンブレンおよび上記金コロイド標識抗体コンジュゲートパッドの他に、検体試料注入部として綿布を用意し、吸収パッドとして濾紙を用いた。これらの部材を上記図 1 に示されるように配置して、イムノクロマトグラフィーテストストリップを作成した。

Hep-BSA を PBS で希釈し、各種濃度 (3, 30, 300, 3000, 30000nM) になるよう調製し検体試料とした。そして、検体試料 100ul を作製したテストストリップの検体試料注入部に滴下してクロマト展開し、室温で 15 分放置後、テストラインおよびコントロールラインにおける赤紫色の呈色度合いをスキャナーで読み取

り、その色の濃さを定量的に測定した。なお、ブランクは、PBSのみからなる検体試料を 100u1 滴下したものを示した。

テストラインの呈色の度合いによって 3-ナフトイルインドール誘導体の存否を判定でき、3-ナフトイルインドール誘導体の含有量を半定量できることがわかる。

### (3) 検体試料中の 3-ナフトイルインドール誘導体の検出

検体試料として 3-ナフトイルインドール誘導体 (3-ナフトイルインドール、3-(4-メチル-1-ナフトイル) インドール、1-メチル-3-(1-ナフトイル) インドール、1-エチル-3-(1-ナフトイル) インドール、1-オクチル-3-(1-ナフトイル) インドール) および原料 (インドール、5-フルオロペンチルインドール) を含有する 100uM DMSO 溶液を用意した。この溶液を PBS で 10 倍ずつ希釈することにより、各濃度の 3-ナフトイルインドール誘導体および原料を含む模擬検体試料を作製した。この各試料 100u1 を作製したテストストリップの検体試料注入部に滴下してクロマト展開し、室温で 15 分放置後、テストラインおよびコントロールラインにおける赤紫色の呈色度合いを肉眼で観察した。なお、ブランクとして PBS を使用した。

### ● 蛍光増強阻害法を利用した 3-ナフトイルインドール誘導体の検出

#### (1) 蛍光標識用 3-ナフトイルインドール誘導体の作製

2.5M エチルマグネシウムブロミド (1.65mmol) を 1.1ml エーテル溶媒中に添加し、しばらく 0°C で攪拌した。この溶液に、あらかじめ 1.1ml エーテル溶媒で溶解したインドール (1.3mmol) を徐々に添加し、添加終了後 30 分間、室温で攪拌した。攪拌しながら、予め 1ml エーテル溶媒で溶解した 1-ナフトイルクロライド (1.46mmol) を徐々に添加した。その反応液は 1.5 時間、室温で攪拌しながら放置した。その後、飽和塩化アンモニウム水溶液を反応液と同体積添加



することにより反応を停止させると共に、微粉末状になるまで攪拌を続けた。この粉末をろ過し、適当量の水で洗浄した後に適当量のエーテルで洗浄した。粉末を 1ml メタノールで溶解した後に、1ml 水酸化ナトリウム水溶液 (0.4g/ml) を添加し、室温で 18 時間攪拌した。沈殿物をろ過後に適当量のメタノール、水、エーテルで洗浄した。その後、100°C 真空下で乾燥させ、3- (1-ナフトイル) インドール混合物を得た。この混合物を液体クロマトグラフィー (シリカ担体、溶出液：石油エーテル/酢酸エチル=1/1) により精製し、3- (1-ナフトイル) インドールを精製した。得られた反応生成物の構造は、赤外線スペクトル及び NMR データにより同定した。

この 3- (1-ナフトイル) インドールに DansylChloride を常法に従って標識した (図 4-4)。

1.0mmol 3-naphtoylindole、1.11mmol ブロモブチルフタルイミドおよび 1.39mmol 無水炭酸ナトリウムを 10ml ジクロロメタンに溶解し、窒素気流下で 72 時間還流した。反応溶液を室温まで冷却し、濾過した。濾液を 1N 塩酸で 3 回抽出した後、水層をクロロホルムで 3 回抽出した。無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した後、クロロホルムを減圧留去して無色の固体を得た。得られた固体を液体クロマトグラフィー (シリカ担体、展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル=1/1) を用いて精製し、ブチルフタルイミド化物を得た (収率:60%)。上記の 0.20mmol ブチルフタルイミド化物を、3ml の 95%エタノールに溶解しこれに 0.20mmol ヒドラジン 1 水和物を加えた後、2 時間還流した。反応溶液を、液体クロマトグラフィー (シリカ担体、展開溶媒：メタノール/酢酸エチル=1/1) を用いて精製し、アミノ誘導体 (1-(4-アミノブチル)-3- (1-ナフトイル) インドール) を得た (収率:78%、図 4-4)。

上記で作製したアミノ誘導体に FITC (Fluoresceinisothiocyanate) あるいは、DansylChloride を常法に従って標識した。

(2) 蛍光標識 3-ナフトイルインドール誘導体とマウスモノクローナル抗体との反応性評価

第 2 章で作製したマウスモノクローナル抗体と上記で作製した蛍光標識 3-ナフトイルインドール誘導体の反応を ELISA 法で評価した。

詳細を下記に記載する。

(A) 抗原のコーティング

予め 2.5 $\mu$ g/mL Hep-BSA をマイクロプレートに 100 $\mu$ l/ウェルずつ注入し、20°C で一晩保存した。実験直前に、アスピレータで抗原溶液を除去した。

(B) ブロッキング

BSA-PBS-Az を 200 $\mu$ l/ウェル注入し、30 分間室温で放置した。その後、アスピレータで BSA-PBS-Az を除去した。即日に以降の実験を行わないときは、この状態で、水で湿したろ紙と共に 4 度で保存した。

(C) 抗体の反応

PBS で希釈した各蛍光標識 3-ナフトイルインドール誘導体溶液 50 $\mu$ l/ウェル及び 1 重量% BSA-PBS-Az で希釈した抗体溶液（希釈倍率：1000 倍）50 $\mu$ l/ウェルを振とうしながら加えた。常温で 3 時間保存した後、アスピレータで抗体溶液を除去し、PBS で 3 回洗浄し、アスピレータで残存する PBS を除去した。

(D) 第 2 抗体の反応

0.2  $\mu$ g/mL のペルオキシダーゼ標識抗マウスモノクローナル抗体ヤギ由来を 1 重量% BSA の PBS 溶液に溶解したもの、または 0.2  $\mu$ g/mL のペルオキシダーゼ標識抗マウス IgM 抗体ヤギ由来（KPL 社製）を 1 重量% BSA の PBS 溶液に溶解

したものを 50ul/ウェル注入し、常温で 30 分放置した。アスピレータで除去し、PBS で 3 回洗浄し、さらにアスピレータで残存する PBS を除去した。

(E) 基質の反応と停止

O-フェニレンジアミン (生化学用) 40mg を 10mL のクエン酸-リン酸バッファ (pH5) に溶解し、使用直前に 30 重量%過酸化水素水 4ul を加えた溶液 (基質溶液) を 100ul/ウェル注入し、室温放置した。5 分後、4N 硫酸を 25ul/ウェル注入して反応を停止した。

(F) 測定

東洋ソーダマイクロプレートリーダーを用いて 492nm の吸光度を測定した。

(3) 蛍光増強測定

5mm 角石英セルに各 800ul  $4.4 \times 10^{-5}$  M の蛍光色素標識 3- (1-ナフトイル) インドール (FITC 標識 1-(4-アミノブチル)-3- (1-ナフトイル) インドール (ABNI-FITC) 、DansylChloride 標識 3- (1-ナフトイル) インドール (NI-DansylChloride) 、DansylChloride 標識 1-(4-アミノブチル)-3- (1-ナフトイル) インドール (ABNI-DansylChlorid) ) を添加して特定の励起波長 (FITC : 490nm、DansylChloride : 366nm) 及び特定の蛍光波長 (FITC : 520nm、DansylChloride : 510nm) における蛍光強度を測定した。その後 10ul  $2.0 \times 10^{-5}$  M の抗体溶液を入れ、室温で攪拌し、特定の励起波長 (FITC : 490nm、DansylChloride : 366nm) 及び特定の蛍光波長 (FITC : 520nm、DansylChloride : 510nm) における蛍光強度を測定した。さらに、続いて同様の操作を 2 回繰り返した。

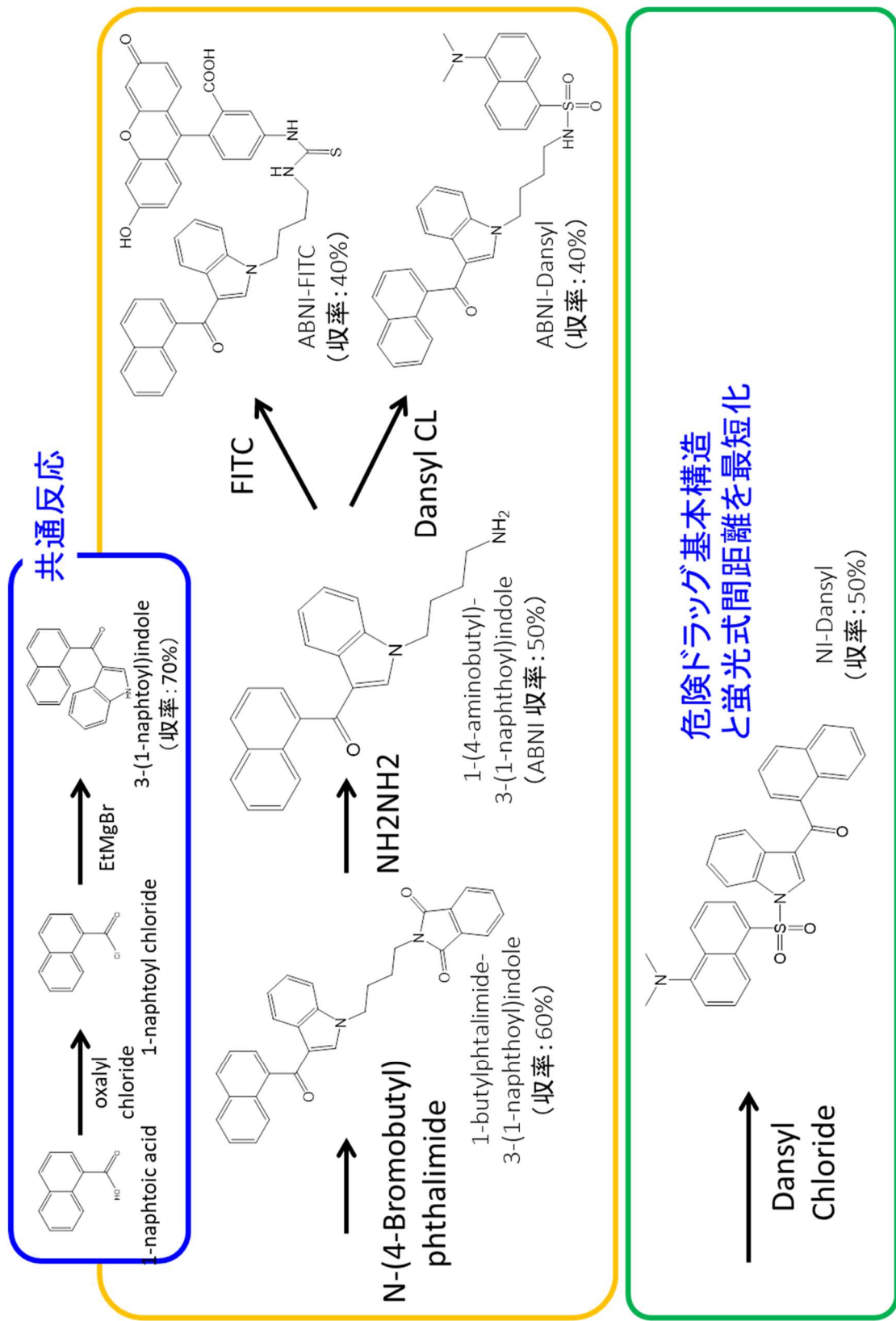


図 4-4 蛍光標識 3-ナフトイルインドールの合成経路図

### 4-3 結果と考察

#### ●免疫クロマトグラフィー技術

今回の免疫クロマトデバイスにより 3-ナフトイルインドール誘導体に対しては検出可能であることが判明した(図 4-5、表 4-1)。一方、原料であるインドールについては反応しなかった(図 4-5、表 4-1)。具体的には、3-ナフトイルインドール、1-メチル-3-(1-ナフトイル)インドール、1-エチル-3-(1-ナフトイル)インドール、1-オクチル-3-(1-ナフトイル)インドールに対する検出限界は、それぞれ 0.99、0.08、0.2、10 $\mu$ M であった(表 4-1)。一方、原料であるインドールについては、10 $\mu$ M 濃度でも検出できなかった(表 4-1)。このことから、今回作製した免疫クロマトデバイスは、3-ナフトイルインドール誘導体を特異的に検出できるデバイスとして利用可能であることが分かった。

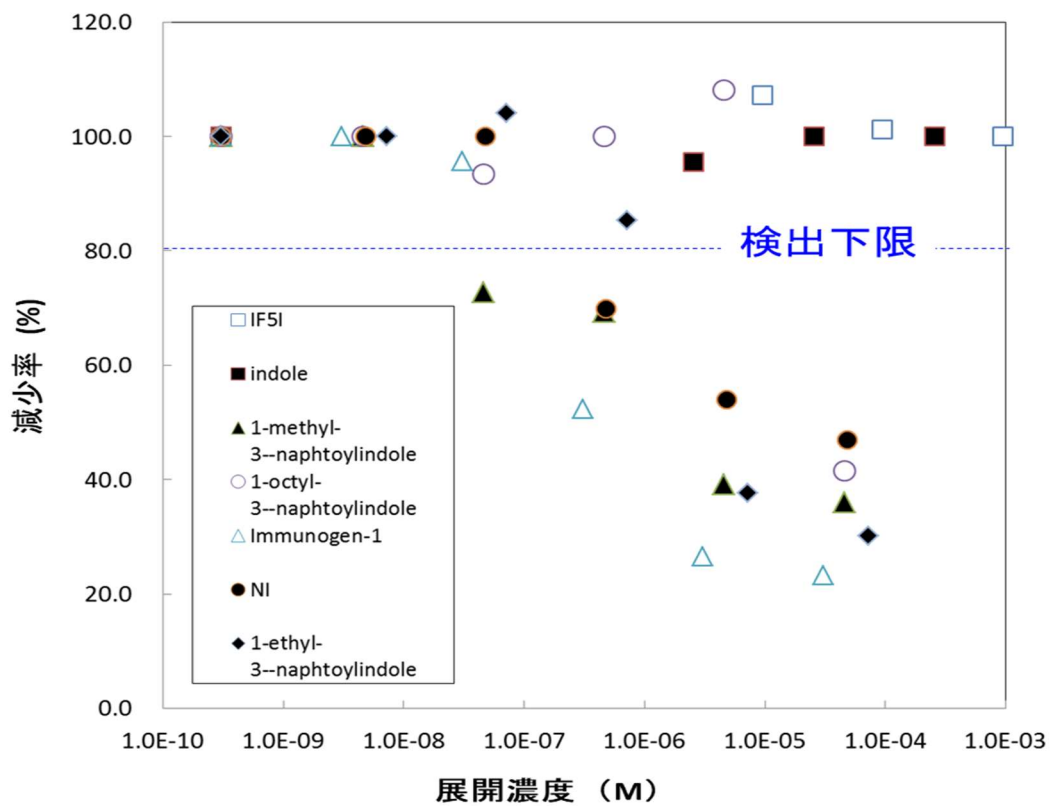


図 4-5 免疫クロマトデバイス評価結果図

表 4-1 各化合物の LOD 値表

| Name          | LOD (uM) |
|---------------|----------|
| Immunogen-1   | 0.08     |
| 1-Methyl-3-NI | 0.08     |
| 1-Ethyl-3-NI  | 0.2      |
| 1-Octyl-3-NI  | 10       |
| NI            | 0.99     |
| Indole        | >10      |
| 1-C5F-indole  | >10      |

Immunogen-1 : 1-ヘプタン酸-3- (1-ナフトイル) インドール

## ● 蛍光増強阻害法を利用した 3-ナフトイルインドール誘導体の検出

### (1) 蛍光標識 3-ナフトイルインドール誘導体の作製

FITC 標識 1-(4-アミノブチル)-3-(1-ナフトイル) インドール (ABNI-FITC)、DansylChloride 標識 3-(1-ナフトイル) インドール (NI-DansylChloride)、DansylChloride 標識 1-(4-アミノブチル)-3-(1-ナフトイル) インドール (ABNI-DansylChlorid) をそれぞれ収率 40%、50%、40%で作製した。

### (2) 蛍光標識 3-ナフトイルインドール誘導体とマウスモノクローナル抗体との反応性評価

第 2 章で作製したマウスモノクローナル抗体に対して、各蛍光標識 3-ナフトイルインドール誘導体 (ABNI-FITC、NI-DansylChloride、ABNI-DansylChlorid) の結合性を ELISA 法で評価した結果、ABNI-FITC 及び ABNI-DansylChlorid については、IC<sub>50</sub> 値が約 100nM であった。一方、NI-DansylChloride については、IC<sub>50</sub> 値が約 4000nM と一桁感度が落ちていた(図 4-6)。これは、インドール基に直接ダンシルクロリドのような嵩高い残基を標識したために結合力が低下したと考えられる。

### (3) 蛍光増強測定

第 2 章で作製したマウスモノクローナル抗体に対して、各蛍光標識 3-ナフトイルインドール誘導体 (ABNI-FITC、NI-DansylChloride、ABNI-DansylChlorid) の結合性を蛍光強度の変化で評価した結果、いずれの化合物についても蛍光強度に差が見られなかった(図 4-7)。上記 ELISA 法及び蛍光測定法による結合性評価結果により、すべての蛍光標識 3-ナフトイルインドール誘導体は抗体には結合しているものの蛍光強度は変化しなかった。これは、文献(19)から判断すると標識した蛍光色素部分が抗体の抗原結合部位から外部に出ているものと考えられ(図 4-8)、このため、蛍光色素部分の周囲の環境が、通常の溶媒下と同じ

状態のために蛍光強度が上昇しなかったと考えられる。このことから、3-ナフトイルインドール誘導体部分に蛍光特性を有するような構造を導入することが望まれる。



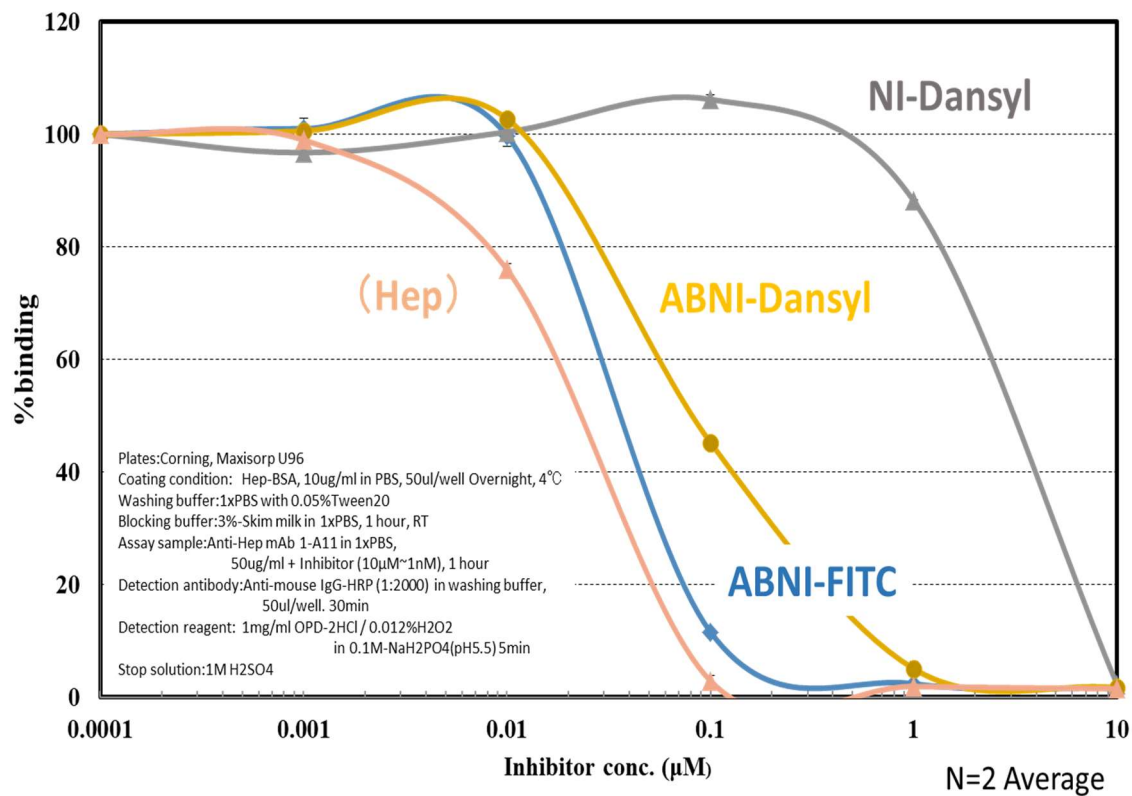


図 4-6 蛍光色素標識 3-ナフトイルインドール誘導体との  
 結合性能評価結果図

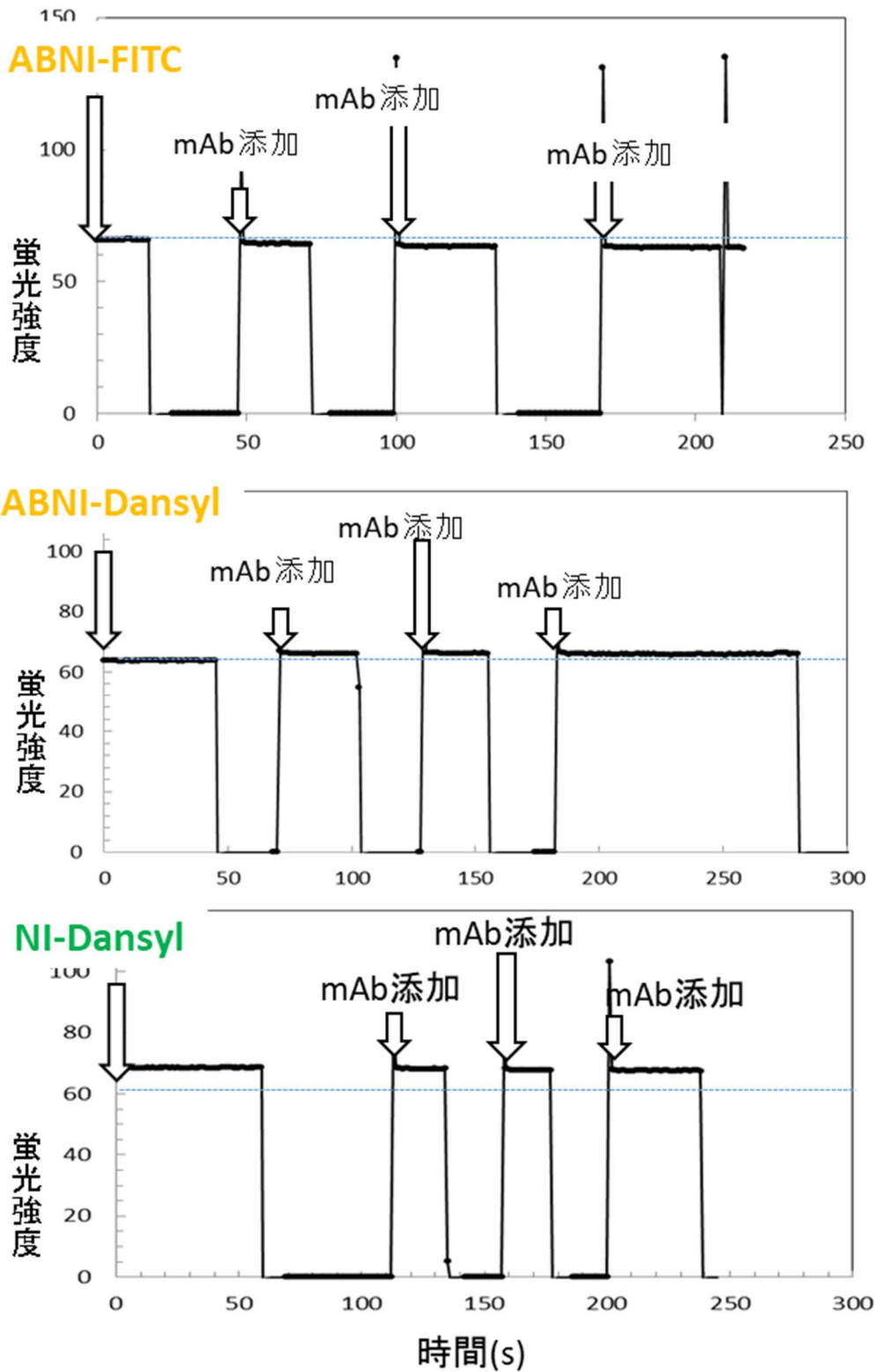
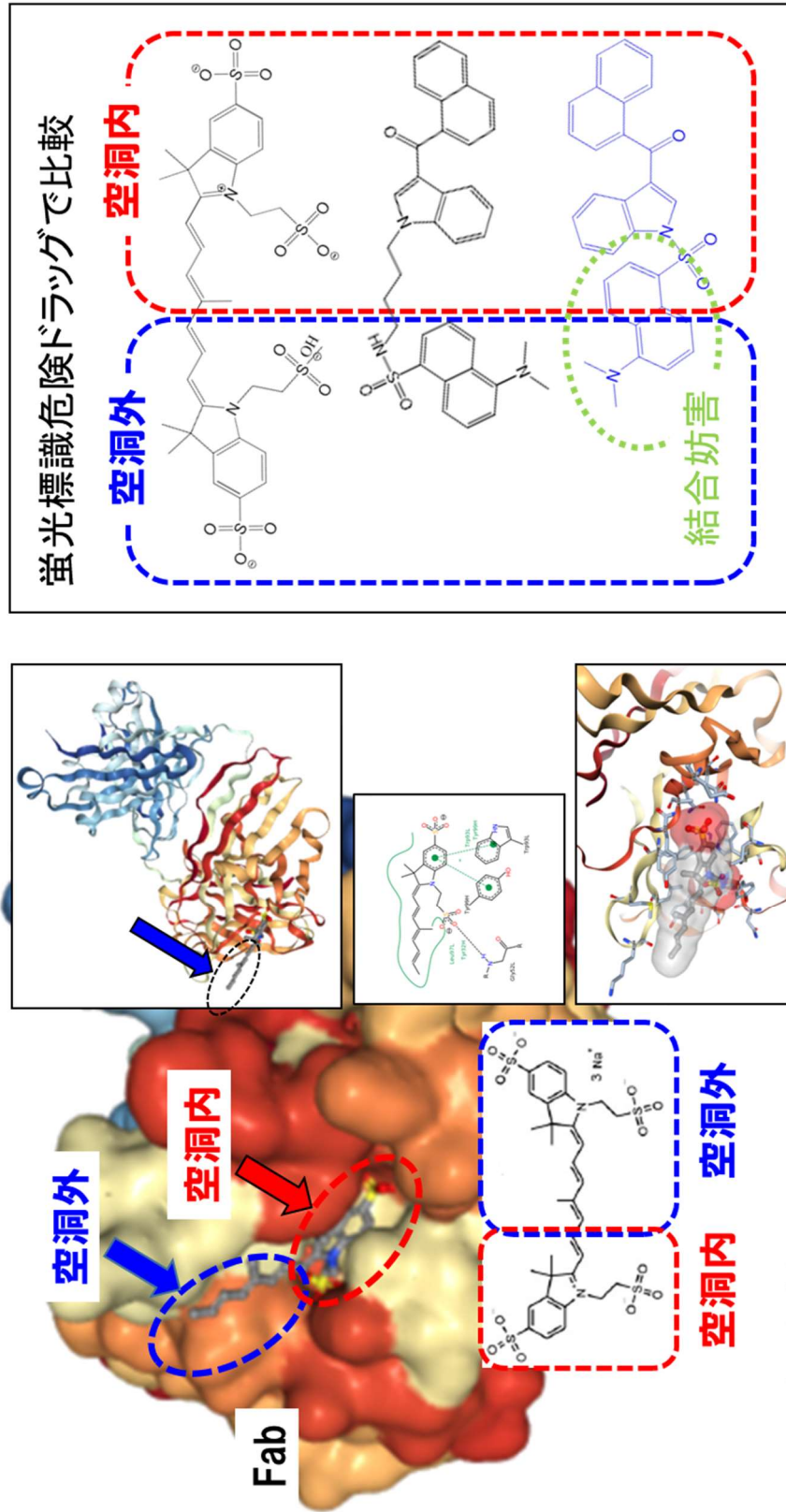


図 4-7 蛍光強度のセンサグラム図



Released: 1/8/2008

Method: X-ray Diffraction

Resolution: 2.8 Å

Residue Count: 460

Organism: Homo sapiens

Fab MOR03268 Triggers Absorption Shift of a Diagnostic Dye via Packaging in a Solvent-shielded Fab Dimer Interface

Roman C. Hillig et al. J. Mol. Biol. (2008) 377, 206-219

2JB5: FAB FRAGMENT IN COMPLEX WITH SMALL MOLECULE HAPTEN, CRYSTAL FORM-1

図 4-8 ハプテンと抗体結合状態のイメージ図

#### 4-4 小括

##### ●免疫クロマトデバイス

今回の免疫クロマトデバイスにより各 3-ナフトイルインドール誘導体の特異的に検出可能であることが判明した。感度としては、3-ナフトイルインドール、1-メチル-3-(1-ナフトイル) インドール、1-エチル-3-(1-ナフトイル) インドール、1-オクチル-3-(1-ナフトイル) インドールに対する検出限界は、それぞれ 0.99、0.08、0.2、10 $\mu$ M であった。

##### ●蛍光増強阻害法

簡易検出技術の確立を目指して、3 種類の蛍光標識 3-ナフトイルインドール誘導体 (FITC 標識 1-(4-アミノブチル)-3-(1-ナフトイル) インドール (ABNI-FITC)、DansylChloride 標識 3-(1-ナフトイル) インドール (NI-DansylChloride)、DansylChloride 標識 1-(4-アミノブチル)-3-(1-ナフトイル) インドール (ABNI-DansylChlorid)) を合成し、第 2 章で作製したマウスモノクローナル抗体との結合性を ELISA 法により確認した後に、蛍光強度変化を測定した。その結果、いずれの蛍光標識 3-ナフトイルインドール誘導体も蛍光強度の変化が見られなかった。以上のことにより、今回の場合、蛍光増強阻害法を検出系として導入することは困難であることが判明した。

#### 4-5 引用文献

- 1.Hegstad S, Westin AA, and Spigset O:Detection Times of Carboxylic Acid Metabolites of the Synthetic Cannabinoids JWH-018 and JWH-073 in Human Urine. *J Anal Toxicol* 2015; 39(4):280-6.
- 2.Paul BD, and Bosy T: A sensitive GC-EIMS method for simultaneous detection and quantification of JWH-018 and JWH-073 carboxylic acid and hydroxy metabolites in urine. *J Anal Toxicol* 2015;39(3):172-82.
- 3.Erol Öztürk Y, Yeter O, and Alpertunga B: Validation of JWH-018 and its metabolites in blood and urine by UPLC-MS/MS: Monitoring in forensic cases. *Forensic Sci Int* 2015;248:88-93.
- 4.Elian AA, and Hackett J: Analysis of AM-2201 and metabolites in a drugs and driving case. *Drug Test Anal* 2014;6(4):389-95
- 5.Scheidweiler KB, and Huestis MA: Simultaneous quantification of 20 synthetic cannabinoids and 21 metabolites, and semi-quantification of 12 alkyl hydroxy metabolites in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2014 ;1327:105-17.
- 6.Jang M, Yang W, Shin I, Choi H, Chang H, and Kim E: Determination of AM-2201 metabolites in urine and comparison with JWH-018 abuse. *Int J Legal Med* 2014;128(2):285-94.
- 7.Devine PJ, Anis NA, Wright J, Kim S, Eldefrawi AT, and Eldefrawi ME: A fiber-optic cocaine biosensor. *Anal Biochem* 1995; 227:216-224.

8. Spiehler V, Fay J, Fogerson R, Schoendorfer D, and Niedbala R: Enzyme immunoassay validation for qualitative detection of cocaine in sweat. *Clin Chem* 1996; 42:34-38.
9. Ziegler T, Eikenberg O, Bilitewski U, and Grol M: Gas phase detection of cocaine by means of immunoanalysis. *Analyst* 1996; 121:119-125.
10. Guilbault GG and Schmid RD: Biosensors for the determination of drug substances. *Biotechnol Appl Biochem* 1991; 14:133-145.
11. Watanabe K, Okada K., Oda H, Furuno K, Gomita Y, and Katsu T: New cocaine-selective membrane electrode. *Anal Chim Acta* 1995; 316:371-375.
12. Wennig R, Moeller MR, Haguenoer JM, Marocchi A, Zoppi F, Smith BL, de la Torre R, Carstensen CA, Goerlach-Graw A, Schaeffler J, and Leinberger R
13. Development and evaluation of immunochromatographic rapid tests for screening of cannabinoids, cocaine, and opiates in urine. *J Anal Toxicol* 1998; 22:148-155.
14. Bauer CG, Eremenko AV, Kühn A, Kürzinger K, Makower A, and Scheller FW: Automated amplified flow immunoassay for cocaine. *Anal Chem* 1998; 70:4624-4630.
15. 吉井 富夫、向田 政博、石山 国夫：蛍光ハプテンを用いた抗メタンフェタミン抗体・ハプテン反応の研究 *日本法医学雑誌* 40(6), p799-804, 1986-12

16.小野寺 昌彦：蛍光ハプテンを用いた抗体・ハプテン反応の研究  
(蛍光測定の原理と生体系への応用)

蛋白質核酸酵素 (別冊), 189-197, 1974-07

17. Nakayama H, Kenjjou N, Shigetoh N, Ito Y: Fluorescence  
Immunoassay for Cocaine Detection. Monoclon Antib Immunodiagn  
Immunother. Vol. 35 No.2 pp. 83-85

18.北條博史、尾崎恵子、山口光峰、望月剛、難波靖治：  
Immuno chromatography detection method and test kit of psilocin such by  
the competitive method. JP4174016B2

19. Roman C. Hillig et al. Fab MOR03268 Triggers Absorption Shift of a  
Diagnostic Dye via Packaging in a Solvent-shielded Fab Dimer Interface.  
J. Mol. Biol. (2008) 377, 206–219

## 第5章

### 総括

第1章は、社会問題となっている危険ドラッグの特徴について記載すると共に、現状の検出方法の課題について記載した。

危険ドラッグには多種多様な化合物が存在しており、すべての化合物を網羅的に検出することは容易なことではないことが分かった。

一方、現状の危険ドラッグ検出装置は大型装置が主流であり、感度、精度はよいものの、設置場所が限定的であり操作する場合にも訓練を受けた人材が必要であるという問題点を抱えてことも判明した。

そこで、合成カンナビノイドの中で最も社会問題化している3-ナフトイルインドール誘導体に対する検査技術を開発することが重要であると考えられる。

しかも、簡易にスクリーニングできる検出技術開発が必要であると考えられる。

第2章は、ハイブリドーマ法を用いた3-ナフトイルインドール誘導体特異的マウスモノクローナル抗体の作製及びその特性評価について記載した。免疫原であるHep-KLHを免疫したマウスの脾臓細胞を用いて、ハイブリドーマ法により2種類のハイブリドーマ細胞を作製したことについて記載した。さらに、そのハイブリドーマ細胞から得られた2種のモノクローナル抗体の結合親和性及び交差反応性について記載した。

今回、作製した2種類のモノクローナル抗体は、いずれも原料あるいは、その類似体であるインドール、ナフチルアミン、ナフチル酸には反応せずに、3-ナ



フトイルインドール誘導体である3-ナフトイルインドール、3-(4-メチル-1-ナフトイル)インドール、1-メチル-3-(1-ナフトイル)インドール、1-エチル-3-(1-ナフトイル)インドールあるいは、1-オクチル-3-(1-ナフトイル)インドールに100nM以下の感度で結合することを確認した。

このことにより、このモノクローナル抗体を利用することにより、高感度な検出技術及びデバイスを開発できるものと考えられた。

第3章は、ファージディスプレイ法を用いた3-ナフトイルインドール誘導体特異的VHH抗体の単離とその特性評価について記載した。既報および公開データベース情報からVHH抗体遺伝子の重鎖(VHH)を増幅するプライマーを設計し、これらプライマーを用いて免疫原であるHep-KLHを免疫したアルパカの血中リンパ球から抽出した全RNAを材料として、作製したファージライブラリについて記載した。このファージライブラリーの多様性は $2.0 \times 10^5$ 個/mlであり、かなり小さいことが判明した。また、このライブラリーからパンニングにより少なくとも2種類のVHH抗体を得ることができた。それぞれを500ml培地で大腸菌にて発現させたところ、いずれの抗体についても4mgずつ得ることができた。これらのVHH抗体のアミノ酸配列を解析したところFR3領域に若干の相違があるだけでほぼ同一の一次配列であった。

一方、各VHH抗体の種々の3-ナフトイルインドール誘導体に対する交差反応性及び結合性評価をしたところ、いずれのVHH抗体の場合も3-ナフトイルインドール誘導体合成の原料であるインドールおよびナフトイル酸に対しては交差反応性を示さず、他の3-ナフトイルインドール誘導体に対しては同程度の交差性を有していた。VHH抗体(2-A1)及びVHH抗体(2-E9)を比較したところ、VHH抗体(2-A1)の方が、比較的感度良く3-ナフトイルインドール誘導体を検出できる

可能性があるが、上記で記載したハイブリドーマ法により作製したモノクローナル抗体よりも 1/10~1/100 倍の低感度を示した。

以上のことより、3-ナフトイルインドール誘導体を検出するための材料としては、今回作製したマウスモノクローナル抗体を利用する方が適切であると判断できる。

第4章は、マウスモノクローナル抗体を材料として利用した免疫クロマトグラフィー法及び蛍光増強阻害法を用いた簡易検出方法について検討した結果について記載した。今回の免疫クロマトグラフィー法は、通常サンドイッチ型の検出方法（例：妊娠検査器）ではなく、インヒビション方式のものである。この免疫クロマトグラフィー法を用いた検出技術では、上記で示したクロマトデバイスを作製し、これを用いて3-ナフトイルインドール誘導体及びこれを合成するための原料について測定した結果、3-ナフトイルインドール、1-メチル-3-(1-ナフトイル) インドール、1-エチル-3-(1-ナフトイル) インドールあるいは、1-オクチル-3-(1-ナフトイル) インドールに対しては、それぞれ0.99、0.08、0.2、10 $\mu$ M以上の濃度を検出することが可能であることが分かった。一方、原料であるインドールについては検出できなかった。

一方、蛍光増強阻害法を用いた検出技術については、3種類の蛍光標識3-ナフトイルインドール誘導体（FITC標識1-(4-アミノブチル)-3-(1-ナフトイル) インドール（ABNI-FITC）、DansylChloride 標識3-(1-ナフトイル) インドール（NI-DansylChloride）、DansylChloride標識1-(4-アミノブチル)-3-(1-ナフトイル) インドール（ABNI-DansylChlorid））を合成し、抗体との結合による蛍光強度変化を測定したが、いずれの蛍光標識3-ナフトイルインドール誘導体も蛍光強度の変化が見られなかったため、蛍光増強阻害法を検出系として導入

することは困難であった。

## 発表文献リスト

主論文

著者 Nakayama H, Kenjjou N, Ito Y

論文題目 「Development and Characterization of Monoclonal  
Antibodies Specific for 3-(1-naphthoyl) Indole  
Derivatives」

Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.

2016年2月 Vol. 35 No.1 pp. 48-51

著者 Nakayama H, Murakami A, Yoshida M, Muraoka J, Wakai J,  
Kenjyou N, Ito Y

論文題目 「Characterization and Selection of  
3-(1-Naphthoyl)-Indole Derivative-Specific Alpaca  
VHH Antibodies Using a Phage Display Library」

Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.

2016年8月 Vol. 35 No.2 pp. 231-234

参考論文

著者 Nakayama H, Kenjjou N, Shigetoh N, Ito Y

論文題目 「Fluorescence Immunoassay for Cocaine Detection」

Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.

2016年4月 Vol. 35 No.2 pp. 83-85

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり多くの方々に御世話になりました。まずは、ここに深く感謝の意を表します。

本研究は、鹿児島大学大学院理工学研究科システム科学専攻（伊東研究室）にて行われた研究であり、本論文は私が本研究室に在籍した平成28年度から平成30年度の研究成果をまとめたものです。研究活動全般にわたり格別なる御指導と御高配を賜りました鹿児島大学大学院理工学研究科教授 伊東祐二先生には、甚大なる謝意を表します。

私が3年間で博士論文をまとめることができたのは、先生のお人柄の良さのみならず、研究者としての考え方や面白さを常に私に示して下さい、私の遅々として進まぬ研究に辛抱強く付き合い、公私共にお付き合いくださったからに他なりません。伊東研究室での経験を糧に、今後も研究者として、また企業人として人の役に立っていく所存です。今回合成しました種々の3-ナフトイルインドール誘導体を合成及び分析するための環境を提供して頂くと共に貴重なご教

示を賜りました帝京大学薬学部教授 高橋秀依先生に心より感謝申し上げます。貴重な御教示を賜りました鹿児島大学大学院理工学研究科教授 内海俊樹先生および橋本雅仁先生、帝京大学薬学部教授 夏莉英昭先生および忍足鉄太先生、抗体工学研究センター 東隆親社長（元東京理科大学生命研究所所長）に心より感謝申し上げます。

また、貴重な実験協力及び御教示を賜りました琉球大学医学部助教 村上明一先生に心より感謝申し上げます。ご多忙な先生方からご指導やご助言を賜ることができたおかげで、研究に対する姿勢、実験での精密さが改善され、本論文の完成度が高まりました。本当にありがとうございました。

研究活動においては、パナソニック株式会社 テクノロジーイノベーション本部 センサ・デバイス研究所所長 吉岡俊彦様には、大切な業務があるにもかかわらずこのような機会を与えていただき、さらに多大なる御支援及びご鞭撻を頂戴しました。大変感謝しております。

最後になりましたが、博士課程においてあらゆる場面で私に適切なご支援とご指示を頂いたパナソニック株式会社 テクノロジーイノベーション本部 センサ・デバイス研究所主任研究員 村岡仁様、

パナソニック株式会社 テクノロジーイノベーション本部 資源・エネルギー研究所主任研究員 若井純子様、パナソニックヘルスケア社主任研究員 権丈紀子様に深く感謝いたします。ここに重ねて厚く謝意を表し、謝辞といたします。

平成30年9月

中山 浩