

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	オープンサンドイッチイムノクロマトグラフィー(OS-IC)による非競合的な低分子抗原の検出
Title(English)	
著者(和文)	原田義孝
Author(English)	Yoshitaka Harada
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11985号, 授与年月日:2021年3月26日, 学位の種類:課程博士, 審査員:上田 宏,中村 浩之,西山 伸宏,柳田 保子,堤 浩,北口 哲也,小林 典裕
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11985号, Conferred date:2021/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

# オープンサンドイッチイムノクロマトグラフィー (OS-IC)による非競合的な低分子抗原の検出

東京工業大学 生命理工学院

ライフエンジニアリングコース 上田・北口研究室

原田 義孝

## 目次

### 第1章 序論

1.1	イムノクロマトグラフィー	10
1.2	競合法	13
1.3	オープンサンドイッチイムノアッセイ	15
1.4	オステオカルシン	16
1.5	オープンサンドイッチイムノクロマトグラフィー(OS-IC)	16

### 第2章 金コロイド標識による OS-IC 構築の検討

2.1	緒言	19
2.2	金コロイド標識による OS-IC の作製と検討	19
2.2.1	金コロイド標識 MBP-V <sub>L</sub> と固定 Trx-V <sub>H</sub> による OS-IC の検討	
2.2.2	金コロイド標識 Trx-V <sub>H</sub> と固定 MBP-V <sub>L</sub> による OS-IC の検討	
2.3	非特異反応に対する条件検討	25
2.3.1	金コロイド標識アビジンを用いた非特異反応の検証	
2.3.2	金コロイド標識 IgG を用いた非特異反応の検証	
2.3.3	金コロイドブロッキング剤の検討	
2.4	MBP と金コロイド標識 Trx-V <sub>H</sub> との反応の検討	31

2.5	血清による金コロイドブロッキングの検討	33
-----	---------------------	----

2.6	小括	35
-----	----	----

### 第3章 アルカリホスファターゼ(AP)標識による OS-IC 構築の検討

3.1	緒言	38
-----	----	----

3.2	AP 標識 OS-IC の検討	38
-----	-----------------	----

3.3	OS-IC 用メンブレンの検討	43
-----	-----------------	----

3.3.1	メンブレンの検討	
-------	----------	--

3.3.2	FP120 HP を使用した AP 標識による OS-IC の評価	
-------	-----------------------------------	--

3.4	AP 標識による OS-IC の条件検討	48
-----	----------------------	----

3.4.1	AP 標識 Trx-V <sub>H</sub> 量の検討	
-------	-------------------------------	--

3.4.2	発色基質量の検討	
-------	----------	--

3.4.3	洗浄工程の検討	
-------	---------	--

3.5	小括	54
-----	----	----

### 第4章 着色セルロース粒子による OS-IC 構築の検討

4.1	緒言	57
-----	----	----

4.2	着色セルロース粒子の標識法の検討	57
-----	------------------	----

4.2.1	受動結合型着色セルロース粒子標識の検討	
4.2.2	共有結合型着色セルロース粒子標識の検討	
4.3	着色セルロース粒子標識による OS-IC の検討	66
4.4	小括	69

## 第5章 ヒスタミン、グリアジン由来ペプチド検出用 OS-IC 作製への取り組み

5.1	緒言	71
5.1.1	ヒスタミン	
5.1.2	グリアジン由来ペプチド	
5.2	モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製	74
5.2.1	抗ヒスタミン抗体産生ハイブリドーマの作製	
5.2.2	抗グリアジン由来ペプチド抗体産生ハイブリドーマの作製	
5.3	モノクローナル抗体の活性、特異性評価	84
5.3.1	抗ヒスタミン抗体の競合法 ELISA による特異性評価	
5.3.2	抗グリアジン由来ペプチド抗体のウェスタンブロットによる特異性評価	
5.3.3	抗グリアジン由来ペプチド抗体の ELISA による活性評価	
5.3.4	抗グリアジン由来ペプチド抗体の SPR による親和性評価	
5.4	モノクローナル抗体の遺伝子解析	97

5.5 小括.....	101
第6章 結論.....	103
謝辞.....	105
文献.....	106

## 略語一覧

本論文で使用した略語は以下の通り。

AP (Alkaline phosphatase)

ASW (Australian standard white)

BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)

BGP (Bone Gla Protein)

BSA (Bovine serum albumin)

BWp16 (Buckwheat p16; ソバに含まれる 16 kDa タンパク質、ソバアレルギーの一種)

CAPS (N-Cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid)

CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)

cDNA (complementary DNA)

COVID-19 (Coronavirus disease 2019)

DMSO (Dimethyl sulfoxide)

DNA (Deoxyribonucleic acid)

DNS (Dark northern spring)

dNTP (Deoxyribonucleotide triphosphate)

DTT (Dithiothreitol)

EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Fab (Fragment antigen binding)

Fc (Fragment crystallizable)

FDA (Food and Drug Administration)

GIT 培地(GFS、Insulin、Transferrin を特徴とする無血清培地)

GFS (Growth factor in serum、GIT 培地の GFS はウシ血清の硫酸アンモニウム 55~70%画分)

HBS (HEPES buffered saline)

hCG (Human chorionic gonadotropin)

HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

HLA (Human Leukocyte Antigen)

HRP (Horseradish peroxidase)

IC (Immunochromatography)

Ig (Immunoglobulin)

mABS (Milli absorbance)

MBP (Maltose binding protein)

MES (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid)

Mr (relative molecular mass)

mRNA (messenger RNA)

Mw (Molecular weight)

ND (Not detected)

NHS (N-Hydroxysuccinimide)

OD (Optical density)

OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride)

OS-IA (Open sandwich immunoassay)

OS-IC (Open sandwich immunochromatography)

PBS (Phosphate buffered saline)

PCR (Polymerase chain reaction)

PVDF (Polyvinylidene difluoride)

RNA (Ribonucleic acid)

SPR (Surface plasmon resonance)

Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)

Trx (Thioredoxin)

V<sub>H</sub> (Antibody heavy chain variable region)

V<sub>L</sub> (Antibody light chain variable region)

# 第 1 章 序論

## 1.1 イムノクロマトグラフィー

近年、COVID19 やインフルエンザなどの感染症の検査、診断に向けた、迅速診断法の開発や利用に注目が集まっている。その中でも、抗原抗体反応を利用した検出法は、抗原抗体反応の強さによる検出感度の高さや、標的物質に対する特異性などから、活用の幅が広い。抗原抗体反応を利用した検出法の例としては、例えば、ウェスタンブロット法や免疫沈降法、Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)、免疫染色法、イムノクロマトグラフィーなど、検出する標的物質や、使用する場面や目的に合わせて、様々な手法が開発されてきた。

イムノクロマトグラフィー(Immunochromatography)は、キットに試料液を滴下し、展開させるだけで結果が迅速かつ簡便に標的物質の検出ができることや、キットが小さく、また目視で結果の判定が可能であるため、場所を選ばず使用できるということから、様々な用途に活用されている検出法である<sup>1,2)</sup>。

例えば、インフルエンザ検査用のイムノクロマトでは、患者の体液をサンプリングして10～15分程度で結果の判定が可能であり、短時間での診断を可能としている<sup>3,4)</sup>。また、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)を検出するイムノクロマトは、全国の薬局で入手可能であり、尿を滴下して結果を目視で確認できる簡便さと、その結果の正確性から、医療関係者のみならず、一般家庭でも広く利用されている<sup>5)</sup>。また、近年問題となっているCOVID-19や、それに対する抗体を検出するイムノクロマトの開発も行われている<sup>6,7)</sup>。

人以外に対しても、例えば植物に対する病原体を検出するイムノクロマトも広く販売されており、圃場での診断が可能であることから、農作物の感染症に対して迅速な対応を行う一助となっている<sup>8)</sup>。

イムノクロマトは、標識抗体、および抗原捕捉用の抗体を固定したメンブレン、吸収パッド、そしてこれらを統合するためのバックグランドシートなどから構成される(図1-1)。各構成要素と、標的物質の検出に対する働きは以下の通りである。

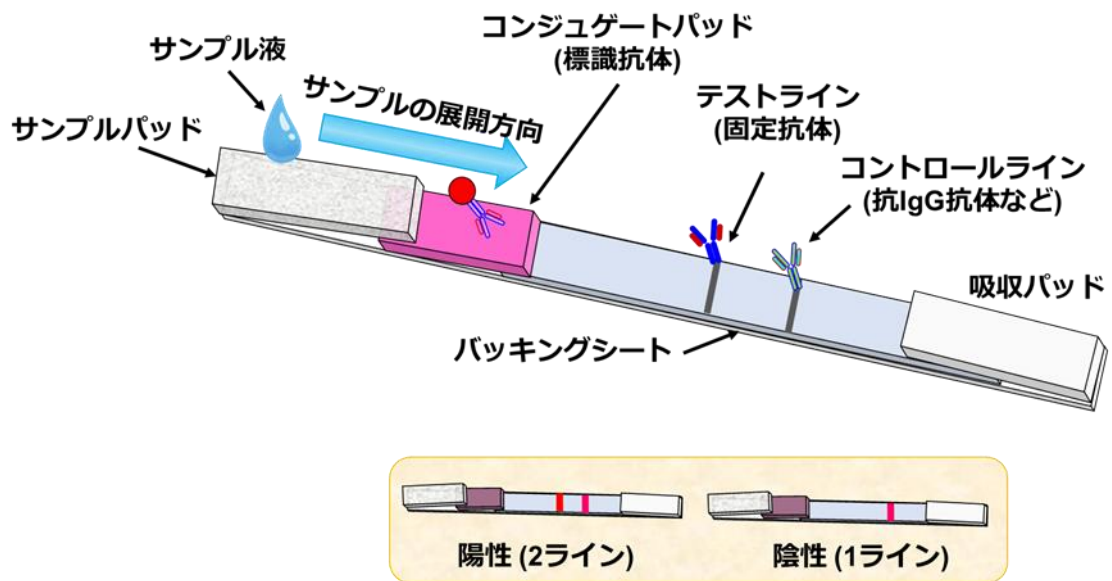


図 1-1. イムノクロマトの構造

まず、標識抗体は金コロイドやラテックス粒子などの着色粒子や、Horseradish peroxidase (HRP)などの酵素で標識された抗体である。標識抗体はサンプル液に混合されることで、サンプル液中の標的物質と反応し、標的物質は標識抗体の着色粒子、または酵素によって間接的に標識される。イムノクロマトでは、安価で標識が容易な金コロイドが標識に利用されることが多い。着色粒子はそれ自身の色で、酵素は発色基質との反応によって標的物質を可視化する。サンプル液中の標識抗体と標的物質の抗原抗体複合体は、共にイムノクロマトのメンブレン中に展開されていく。

メンブレンには、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)やニトロセルロースなどの多孔質な構造を持つ膜が利用されており、サンプル液は毛細管現象によってメンブレン中を展開されていく。メンブレンには、標識抗体とは別の抗体(固定抗体)が線状、或いはスポットのテストラインとして固定されており、サンプル液中に標的物質が含まれていた場合、展開中に固定抗体に捕捉される。この時、標的物質が既に標識抗体と反応していた場合は、標識抗

体も固定抗体に標的物質を介して間接的に捕捉されることとなる。標識方法が着色粒子であればそのまま、酵素であれば、更に発色基質を展開させることによって、テストラインが発色し、標的分子の有無を検出することができる。

メンブレンの末端には吸収パッドが連結しており、メンブレンを展開されて吸収パッドに到達したサンプル液が、吸収パッドに吸い上げられることによって、サンプル液がメンブレン中に滞留せず一定方向に展開され続ける。メンブレンを展開される間に、サンプル液中の標的物質が標識抗体、および固定抗体と反応する。サンプル液が多いときや、酵素標識抗体に対して発色基質液の展開が必要な場合には、高容量の吸収パッドが必要となる。メンブレンの孔径や吸収パッドの給水性は、サンプル液の展開速度に影響するため、イムノクロマトによる標的物質の検出に重要である。

上で挙げたような、固定抗体と標識抗体によるサンドイッチで標的物質を検出する方法(サンドイッチ法)は、簡便で迅速に結果を得ることができ、特異性も高いというメリットがあるため、現在広く使われている。

その一方で、抗体が抗原と反応する際の結合部位(エピトープ)は、5~8 アミノ酸残基と書かれている<sup>9)</sup>。ヒスタミン(111.2 Da)と結合するモノクローナル抗体など<sup>10)</sup>、低分子抗原を認識する抗体を調製することは可能であるものの、二分子の抗体分子間の立体障害により、サンドイッチ法による低分子抗原の検出は難しいと考えられる。

低分子抗原をサンドイッチ法で検出した例として、angiotensin II (1048 Da)<sup>11)</sup>やシガテラ食中毒の原因毒素、シガトキシンの一種である CTX3C (1023.2 Da)<sup>12)</sup>、免疫抑制剤の一種である tacrolimus (804 Da)<sup>13)</sup>、かんきつ類に含まれるフラボノイド(フラバノン)の一種である naringin (580 Da)<sup>14)</sup>などが報告されているものの、分子量 1,000 以下の低分子化合物をサンドイッチ法で検出した例は少ない。サンドイッチ法で検出された低分子抗原の構造的な特徴としては、シガトキシンの分子長が約 3 nm<sup>15)</sup>、naringin の二つの抗原認識部位間の距離が約

10.5 Å<sup>14)</sup>などと推定されている。また、二つの抗原認識部位を様々な長さのスペーサーで連結し、サンドイッチ法による検出を試みた結果では、抗原認識部位間の距離が 11.5 Å以下で抗体同士の立体障害による反応障害が生じ始め、5 Å以下では検出できなかつたと報告されており<sup>16)</sup>、サンドイッチ法で検出できる分子の大きさには限界があると考えられる。サンドイッチ法で検出できない低分子化合物に対しては、サンドイッチ法によるイムノクロマトも構築不可能である。

## 1.2 競合法

サンドイッチ法による検出ができない低分子抗原を検出するための方法として、競合法が利用されている<sup>17)</sup>。競合法とは、低分子抗原、またはそのアナログをメンブレンに固定して、サンプル液中の低分子抗原と競合させる方法である(図 1-2)。すなわち、サンプル液中に抗原が多く含まれるときは、標識抗体の結合部位の殆どがサンプル液中の抗原に占有されてしまうため、サンプル液の展開時に、メンブレン上に固定された低分子抗原とは反応せず、そのまま流失してしまうため、テストラインは発色しなくなる。逆に、サンプル液中に抗原が含まれないときは、標識抗体はメンブレン上に固定された低分子抗原と反応し、発色を生じる。

競合法を用いることで、抗原抗体反応を利用して低分子抗原を検出することが可能となる。イムノクロマトグラフィーの分野でも、カビ毒<sup>18, 19)</sup>や農薬<sup>18, 20)</sup>、抗生物質<sup>21, 22)</sup>などの低分子化合物を競合法イムノクロマトによって検出できることが示されている。

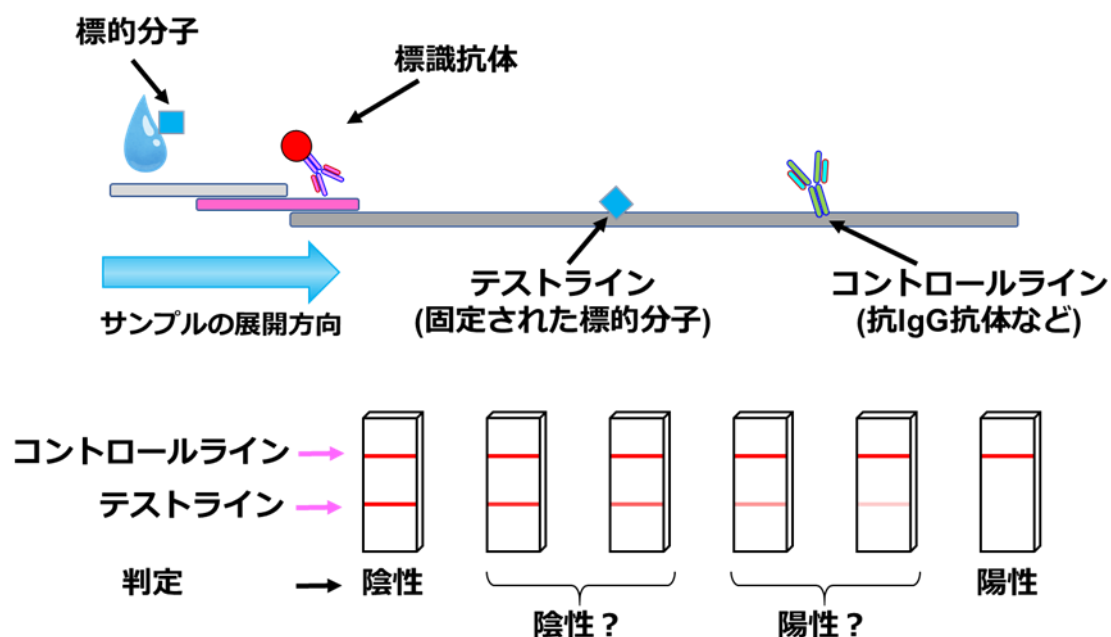


図 1-2. 競合法イムノクロマトグラフィー

競合法は、その検出原理から、サンドイッチ法と異なり、一種類の抗体があれば抗原の検出が可能になるというメリットがある。一方で、従来のサンドイッチ法による検出では、抗原の量に従ってテストラインの発色も強くなるが、競合法には抗原の量が増えるとテストラインの発色が弱くなる特徴もある。このため、競合法を用いたイムノクロマトグラフィーでは、十分量の抗原が存在し、明らかなシグナルの低下が認められたときは、目視でも陽性と判定することができる。一方で、目視でテストラインの発色低下が認められないとき、実際には低濃度の抗原が存在している可能性は排除できないため、完全に陰性と判断することも難しい。目視で判定しづらい低濃度の抗原に対しては、吸光光度計などの装置でテストラインの発色を定量することで陽性と判定できるが、キットさえあれば電源も装置も不要で標的物質を検出できるというイムノクロマトグラフィーのメリットが一つ失われてしまうこととなる。

### 1.3 オープンサンドイッチ免疫アッセイ(OS-IA)

免疫クロマトにおいて、低分子抗原をより簡便に検出できるようにするためには、競合法のように、一つの抗体で検出することができ、かつサンドイッチ法のように抗原量に従ってシグナルが増加していく検出法が必要である。その方法として、オープンサンドイッチ免疫アッセイ(OS-IA)が挙げられる<sup>23)</sup>。

OS-IA は、抗体のサブユニットである重鎖(Heavy chain)と軽鎖(Light chain)から、抗原結合能を有する可変領域(Variable region)である、V<sub>H</sub>(重鎖可変領域)、V<sub>L</sub>(軽鎖可変領域)をそれぞれ調製し、一方を固定し、もう一方を標識することで、サンドイッチ法における二種類の抗体のように、抗原をサンドイッチする形で検出することができる方法である(図 1-3)。オープンサンドイッチによる ELISA では、ニワトリ卵白リゾチームや 11-デオキシコルチゾール<sup>24)</sup>、オステオカルシン(Bone Gla Protein)由来ペプチド<sup>25,26)</sup>などの検出が報告されている。

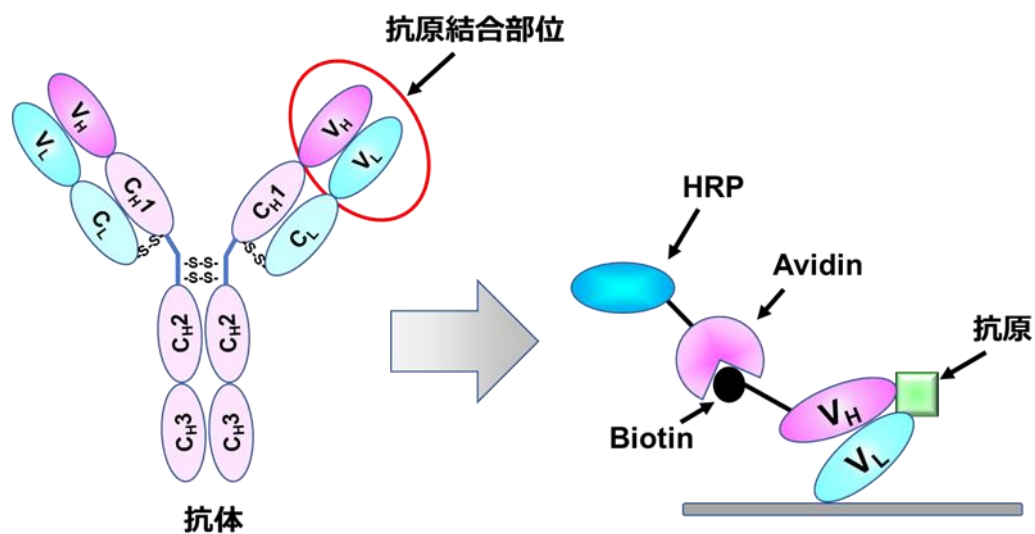


図 1-3. オープンサンドイッチ法による抗原の検出

OS-IA は、元が一つの抗体である  $V_H$ 、 $V_L$  を用いるため、抗原に対して一種類の抗体があれば成立する。さらに、低分子の抗原に対しても、従来のサンドイッチ法のように抗体同士の間で立体障害が起こらず、低分子抗原を検出することができる。したがって、競合法のように、抗原濃度が増えるほど発色の低下する検出系ではなく、抗原濃度の増加に伴って発色の強くなる検出系が構築できる。

#### 1.4 オステオカルシン

オステオカルシンは、骨の基質に含まれる 49 残基のアミノ酸からなるカルシウム結合性タンパク質である<sup>27,28)</sup>。ビタミン K 依存的なカルボキシル化によって、分子内に  $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸(Gla)を含むオステオカルシンは、Bone Gla Protein (BGP)とも呼ばれる。血中の BGP は、骨形成マーカーとしても知られ<sup>29)</sup>、BGP 測定用の ELISA キットも市販されている<sup>30)</sup>。

#### 1.5 オープンサンドイッチイムノクロマトグラフィー(OS-IC)

従来のサンドイッチ法によるイムノクロマトグラフィーでは低分子抗原の検出が難しいことは、1.1 で述べたとおりである。また、低分子抗原を検出するために、競合法によるイムノクロマトが利用されているが、1.2 の通り、低濃度の抗原を目視で検出することが難しい。1.3 の OS-IA は、一分子の抗体の重鎖と軽鎖の可変領域、 $V_H$  と  $V_L$  を用いて抗原をサンドイッチすることにより抗原を検出することから、非競合的に低分子化合物を検出できる手法であるが、イムノクロマトグラフィーへの応用例はこれまでにない。

本研究は、イムノクロマトグラフィーと OS-IA を組み合わせた、オープンサンドイッチイムノクロマトグラフィー(OS-IC)の開発を目的とした。すなわち、抗体可変領域である  $V_H$

または  $V_L$  を固定したメンブレンを作製し、標識した  $V_L$  または  $V_H$  を抗原と共に展開し、低分子化合物を検出するシステムの構築を行った(図 1-4)。

最初の検出対象としては、既に OS-ELISA による検出が行われており、OS 系のデータが蓄積されていること、抗体 Fab の立体構造が既知(Protein Data Bank: 5X5X)であることから、オステオカルシンの C 末端側 7 残基のペプチドである、BGP-C7(配列:  $\text{NH}_2\text{-Arg-Arg-Phe-Tyr-Gly-Pro-Val-COOH}$ 、Mr: 894.03)、およびその抗体を用いて、OS-IC による検出系の構築を行った。また、BGP-C7 以外の低分子抗原に対するモノクローナル抗体を作製、評価し、これらに対する OS-IC の構築に向けた検討を行った。

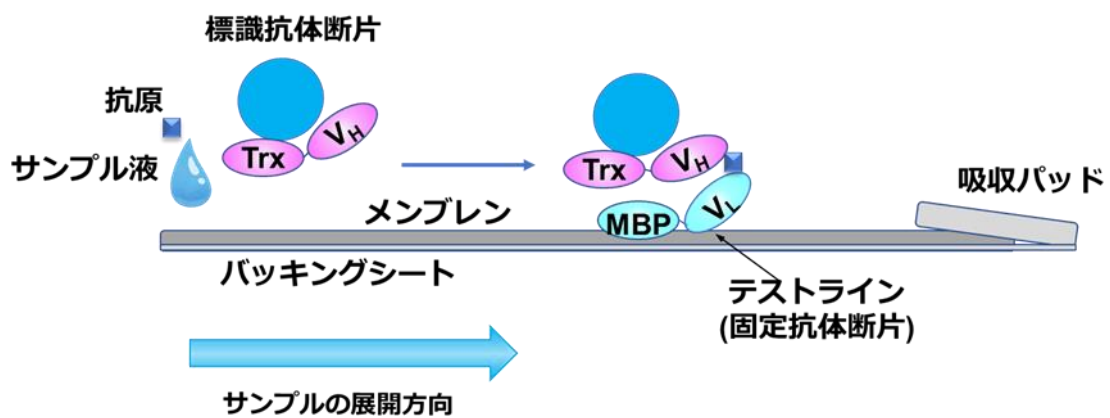


図 1-4. オープンサンドイッチ免疫クロマトグラフィー(OS-IC)の模式図

## 第2章 金コロイド標識による OS-IC 構築の検討

## 2.1 緒言

イムノクロマトグラフィーでは、標識された抗体を用いて抗原を検出する。その中でも、汎用されている標識方法は、金コロイドを用いたものである。

金コロイドによる標識の特徴としては、金コロイド自体の表面電荷により、前処理なしでタンパク質が吸着するため、標識処理が簡単であること、金コロイド自体が赤色を呈しているため、酵素標識のように発色基質が不要であること、安価に標識ができること、などが挙げられる。

OS-IC 構築においても、金コロイドによる抗体可変領域断片の標識を検討した。

## 2.2 金コロイド標識による OS-IC の作製と検討

金コロイドによる抗体可変領域断片の標識を行った。金コロイドによる標識は、表面電荷による吸着であるため、抗体可変領域断片と金コロイド液を混合して、標識を行った。また、もう一方の抗体可変領域をメンブレンに塗布し、テストストリップを作製した。

### 2.2.1 金コロイド標識 Trx-V<sub>H</sub> と固定 MBP-V<sub>L</sub> による OS-IC の検討

MBP-V<sub>L</sub> を塗布したメンブレンと、金コロイド標識した Trx-V<sub>H</sub> を用いて OS-IC の作製を試みた。

#### 【試薬】

抗 BGP-C7 抗体(R4A10)<sup>26)</sup>の可変領域、V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>にそれぞれチオレドキシシン(Trx)、マルトー

ス結合タンパク質(MBP)タグを付与した Trx-V<sub>H</sub><sup>31</sup>、および MBP-V<sub>L</sub><sup>25</sup>は組換えタンパク質、及び発現用プラスミドを大室博士より譲渡いただき、既報の方法にて大腸菌を用いた組み換え発現で調製されたものを使用した。

またその他の試薬については以下の通り。

ニトロセルロースメンブレン(Hi-Flow Plus HF 120)(Merck Millipore)、吸収パッド(Merck)、バックグシート(ニッポンエンジニアリング)、金コロイド(BBI solutions)、bovine serum albumin (BSA) (Merck)、カゼイン(関東化学)、Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)(ナカライテスク)、96穴プレート(Greiner)、その他の試薬は富士フイルム和光純薬から購入した。

## 【方法】

### (1) 金コロイド標識 Trx-V<sub>H</sub>液の調製

2 mL 容チューブに 3.6 mL の金コロイド(粒径 20 nm)と、400  $\mu$ L の 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.5) を混合した。別の 1.5 mL 容チューブに、13.4  $\mu$ L の Trx-V<sub>H</sub> 溶液(2.1 mg/mL)と 386.6  $\mu$ L の 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.5)を混合した。これら二種類の溶液を混合し、10 分間室温で静置した。混合液に 220  $\mu$ L の 1% PEG 20,000 を添加し、混合後、さらに 440  $\mu$ L の 10% BSA 溶液(目開き 0.2  $\mu$ m フィルターでろ過したもの)を加え、混合し、8,000xg、25°C、15 分遠心分離した。上清をマイクロピペットで除去し、保存バッファー(0.05% PEG 20,000、150 mM NaCl、1% BSA、0.1% NaN<sub>3</sub>、20 mM Tris-HCl, pH 9.0)を加えた。超音波処理によって、沈殿している標識金コロイドを保存バッファー中に拡散させた。再度、8,000 g、25°C、15 分遠心分離し、上清を除去、保存バッファーの添加を繰り返した。遠心分離後に添加する保存バッファーの液量を、遠心分離ごとに減らしていき、標識金コロイドを濃縮した。金コロイド液の波長 530

nm における吸光度( $OD_{530}$ )を、10 倍希釈液で測定し、 $OD_{530}$  が 1.0 (原液の  $OD_{530}$  が 10.0)となるように、保存バッファー添加量を調整し、標識金コロイド液とした。調製後、標識金コロイド液は冷蔵条件で保存した。

## (2) テストストリップの調製

メンブレン(HF120、ミリポア社)に MBP-V<sub>L</sub> 溶液(0.8 mg/mL)をライン状にスポット(0.35  $\mu$ L/spot)塗布し、50°Cで 30 分静置して乾燥させた後、ブロッキングバッファー(0.5%カゼインを含む 50 mM ホウ酸ナトリウム溶液, pH 8.5)、または Immunoblock<sup>®</sup>に 30 分浸漬してブロッキングを行った。ブロッキングしたメンブレンは洗浄バッファー(0.5%スクロース、0.05% コール酸ナトリウムを含む 350 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4)中でゆっくりと 30 分以上シェーカーで振盪して洗浄の後、一晚室温で乾燥させた。バックリングシート上で、メンブレンと吸収パッドを連結した。続いて、コンパクトカッターで 5 mm幅に裁断し、テストストリップとした。

## (3) テストストリップの評価

96 穴プレートのウェルに、サンプル溶液(15  $\mu$ L の標識金コロイド液、10  $\mu$ L の 1  $\mu$ g/mL BGP-C7 溶液、75  $\mu$ L の PBS, pH 7.4)を加えた (BGP-C7 の終濃度 100 ng/mL)。このとき、ネガティブコントロールのウェルには、BGP-C7 溶液の代わりに、PBS を同量加えた。サンプル溶液の入ったウェルにテストストリップを挿入し、反応を開始した。サンプル液がテストストリップに吸い上げられ、ウェルから完全に液がなくなったのち 15 分ほど放置した後、目視で結果を判定した。

## 【結果・考察】

試験の結果、テストストリップは BGP-C7 の有無に関わらず陽性の結果を示した(図 2-1)。この結果から、金コロイド標識した Trx-V<sub>H</sub>と固定した MBP-V<sub>L</sub>の間で、非特異的な結合が生じていると思われた。また、メンブレンのブロッキング剤の違いによる反応の差は見られなかった。

固定した MBP-V<sub>L</sub>が、Trx-V<sub>H</sub>または標識に用いた金コロイドと抗原なしで結合しているということは、MBP-V<sub>L</sub>自身がこの二つのどちらか(あるいは両方)と相互作用するという事である。相互作用しているのが Trx-V<sub>H</sub>であれば、抗体の選択や展開条件で反応を調整できる可能性がある。また、標識に用いた金コロイドであれば、固定する抗体断片と標識する抗体断片を入れ替えることによって、非特異反応を低減できる可能性がある。そこで、まずは固定した MBP-V<sub>L</sub>と、標識した Trx-V<sub>H</sub>を入れ替えた OS-IC を検討することとした。

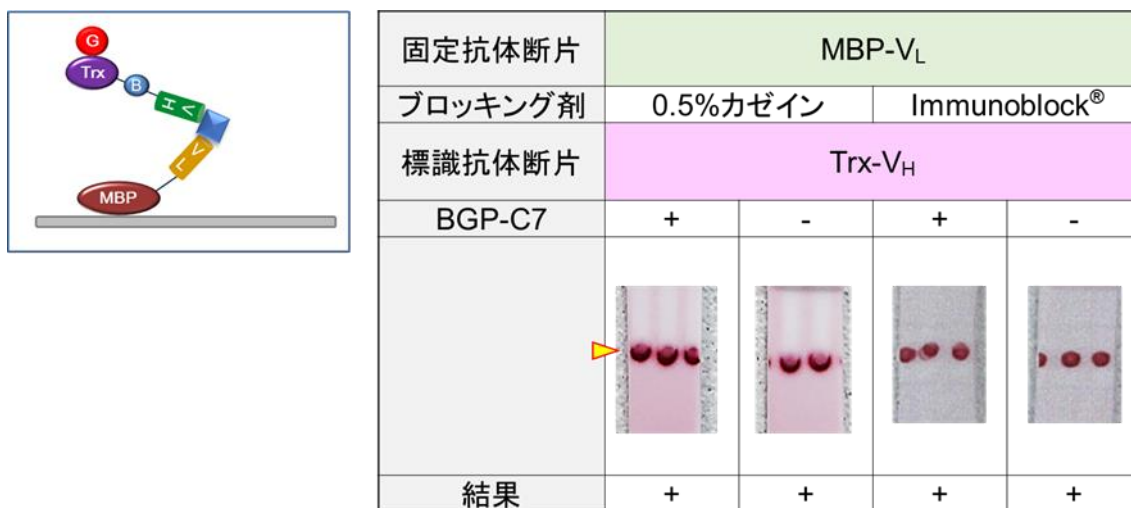


図 2.1 標識 Trx-V<sub>H</sub>および固定 MBP-V<sub>L</sub>を用いた OS-IC の模式図(左)と結果(右)

## 2.2.2 金コロイド標識 MBP-V<sub>L</sub>と固定 Trx-V<sub>H</sub>による OS-IC の検討

MBP-V<sub>L</sub>を塗布したメンブレンと、金コロイド標識した Trx-V<sub>H</sub>を用いた OS-IC において非特異的な反応が見られたため、固定する抗体断片と金コロイド標識する抗体断片を入れ替えて試験を行った。Trx-V<sub>H</sub>を塗布したメンブレンと、金コロイド標識した MBP-V<sub>L</sub>を用いて OS-IC の作製を試みた。

### 【試薬】

2.2.1 と同様。

### 【方法】

#### (1)金コロイド標識 MBP-V<sub>L</sub>液の調製

2.2.1 (1)と同様に調製した。ただし、Trx-V<sub>H</sub>溶液の代わりに、MBP-V<sub>L</sub>溶液(0.8 mg/mL)をタンパク質の量が同じになるように使用した。また、金コロイドは粒径 40 nm のものを使用した。

#### (2) テストストリップの調製

2.2.1 (2)と同様に調製した。ただし、MBP-V<sub>L</sub>溶液の代わりに、Trx-V<sub>H</sub>溶液(2.1 mg/mL)を使用した。メンブレンへの滴下量は、MBP-V<sub>L</sub>と同様の 0.35  $\mu$ L/spot とした。

#### (3) テストストリップの評価

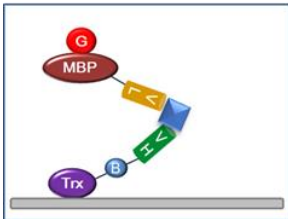
2.2.1 (3)と同様に実施した。

【結果・考察】

実験の結果、100 ng/mL の BGP-C7 ペプチドを加えても、テストスポットが現れなかった(図 2-2)。2.2.1 と同様に、メンブレンのブロッキング剤の違いによる反応の差は見られなかった。

100 ng/mL の BGP-C7 濃度は、OS-ELISA 法での結果を考えると反応に十分な濃度であるため<sup>25)</sup>、この濃度でテストスポットが現れないことは、メンブレン上で抗原抗体反応が起こっていないものと考えられる。金コロイドと MBP-V<sub>L</sub> の結合が静電的なものであるため、MBP-V<sub>L</sub> の配向性は不明であるが、MBP-V<sub>L</sub> の抗原結合部位が金コロイドに吸着している可能性や、Trx-V<sub>H</sub> の抗原結合部位がメンブレンに固定する際にニトロセルロースと結合している可能性が考えられる。

2.2.1 の金コロイド標識 Trx-V<sub>H</sub>、固定 MBP-V<sub>L</sub> を用いた試験では抗原なしでも非特異反応が見られたが、少なくともテストライン上での反応が見られたことから、本項の方法よりも改善できる可能性が高いと考え、以降では金コロイド標識 Trx-V<sub>H</sub> と固定 MBP-V<sub>L</sub> を用いた試験を行った。





固定抗体断片	Trx-V <sub>H</sub>	
ブロッキング剤	0.5% casein	Immunoblock <sup>®</sup>
標識抗体断片	MBP-V <sub>L</sub>	
BGP-C7 (100 ng/mL)	+	+
		
結果	-	-

図 2-2. 標識 MBP-V<sub>L</sub> および固定 Trx-V<sub>H</sub> を用いた OS-IC の模式図(左)と結果(右)

## 2.3 非特異反応に対する条件検討

金コロイド標識した Trx-V<sub>H</sub> と固定 MBP-V<sub>L</sub> を用いた OS-IC で見られた非特異反応を軽減するための条件検討を行った。非特異反応がそれぞれの金コロイドやタンパク質のどの部分によって生じているのかを評価した。

### 2.3.1 金コロイド標識アビジンを用いた非特異反応の検証

金コロイド標識 Trx-V<sub>H</sub> と固定した MBP-V<sub>L</sub> の非特異反応について、MBP-V<sub>L</sub> が金コロイドと Trx-V<sub>H</sub> のどちらと非特異反応をしているかを確認するため、金コロイド標識したアビジンと、標識していない Trx-V<sub>H</sub> を用いて、非特異反応の有無を評価した。なお本実験で用いている Trx-V<sub>H</sub> にはビオチンが含まれているため、アビジンと結合する。

#### 【試薬】

2.2.1 と同様の試薬、およびアビジン(卵自由来)、NeutrAvidin は富士フイルム和光純薬より購入して使用した。

#### 【方法】

##### (1)金コロイド標識アビジン液の調製

2.2.1 (1)と同様に調製した。ただし、Trx-V<sub>H</sub> 溶液の代わりに、アビジン溶液 (2 mg/mL)、NeutrAvidin (2 mg/mL)をタンパク質の量が同じになるように使用した。また、アビジン、NeutrAvidin 共に粒径 20 nm および 40 nm の二種類の金コロイドを用いて標識を行った。

## (2) テストストリップの調製

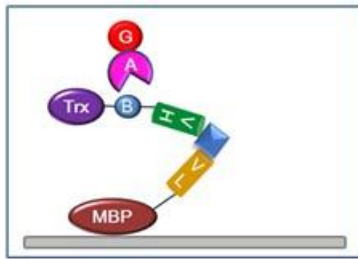
2.2.1 (2)と同様に調製した。ただし、ブロッキング剤は Immunoblock<sup>®</sup>とした。

## (3) テストストリップの評価

2.2.1 (3)と同様に実施した。ただし、サンプル溶液の組成を 10  $\mu$ L の金コロイド標識アビジン液又は金コロイド標識 NeutrAvidin 液、1.9  $\mu$ L の Trx-V<sub>H</sub> 溶液(2.1 mg/mL)、10  $\mu$ L の BGP-C7 溶液(1  $\mu$ g/mL)、78.1  $\mu$ L の 10 mM PBS (pH 7.4)とした。また、サンプル溶液に Trx-V<sub>H</sub> 溶液、BGP-C7 溶液を加えず、同量の PBS (pH 7.4)を加えた組成でも実験を行った。

### 【結果・考察】

実験の結果、金コロイド標識アビジン、金コロイド標識 NeutrAvidin の両方で、BGP-C7、Trx-V<sub>H</sub> の有無にかかわらず、全ての反応系においてテストスポットが確認された(図 2-3)。この結果から、メンブレンに固定された MBP-V<sub>L</sub>は、金コロイドまたはアビジン、NeutrAvidin と非特異的に結合しているものと思われた。



	1	2	3	4
固定抗体断片	MBP-V <sub>L</sub>			
ブロッキング剤	Immunoblock <sup>®</sup>			
標識タンパク質	Avidin		NeutrAvidin	
金コロイドの大きさ	20 nm	40 nm	20 nm	40 nm

	1			2			3			4		
BGP-C7 (100 ng/mL)	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Trx-V <sub>H</sub> (40 µg/mL)	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
結果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

図 2-3. 金コロイドアビジンを用いた非特異反応の評価

### 2.3.2 金コロイド標識 IgG を用いた非特異反応の検証

金コロイド標識アビジンでも MBP-V<sub>L</sub> との非特異反応が見られたことから、金コロイドとアビジンのいずれかが非特異反応の原因と思われた。そこで、抗 BGP-C7 抗体と全く特異性の異なる抗 BWp16(ソバのアレルゲン)抗体を金コロイド標識し、メンブレンに固定した MBP-V<sub>L</sub> との非特異反応の有無を評価した。

#### 【試薬】

2.2.1 と同様、ただし抗 BWp16 抗体は日本製粉株式会社内で調製したものを使用した。

## 【方法】

### (1) 金コロイド標識抗 BWp16 抗体液の調製

2.2.1 (1)と同様に調製した。ただし、Trx-V<sub>H</sub>溶液の代わりに 7.4  $\mu$ L の抗 BWp16 抗体溶液 (1.6 mg/mL)を用いた。また、粒径 40 nm の金コロイドを用いた。

### (2) テストストリップの調製

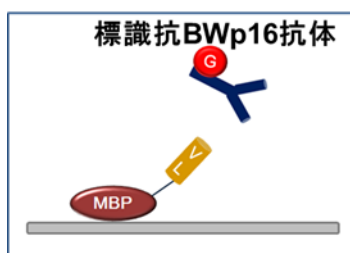
2.2.1 (2)と同様に調製した。ただし、ブロッキング剤は Immunoblock<sup>®</sup>とした。

### (3) テストストリップの評価

2.2.1 (3)と同様に実施した。ただし、サンプル溶液には Trx-V<sub>H</sub>、BGP-C7 を加えず、15  $\mu$ L の金コロイド標識抗 BWp16 抗体液、85  $\mu$ L の 10 mM PBS(pH 7.4)の混合液を使用した。

## 【結果・考察】

実験の結果、Trx-V<sub>H</sub>、および BGP-C7 を加えていないにも関わらず、非特異反応が見られた(図 2-4)。これまでの結果から、MBP-V<sub>L</sub>は、非特異反応の生じた条件に共通して使用されていると金コロイド、または金コロイドのブロッキング剤である BSA と非特異反応を起こしているものと考えられた。



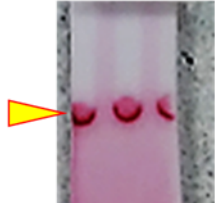
固定抗体断片	MBP-V <sub>L</sub>
ブロッキング剤	Immunoblock <sup>®</sup>
標識抗体	抗BWp16抗体 (IgG)
BGP-C7	-
	
結果	+

図 2-4. 抗 BWp16 抗体を用いた非特異反応の評価

### 2.3.3 ブロッキング剤の検討

金コロイドのブロッキング剤として BSA を使用しているが、MBP-V<sub>L</sub> と金コロイドとの非特異反応の原因が BSA であれば、ブロッキング剤を変更することで非特異反応が発生しなくなると思われる。そこで、金コロイドのブロッキング剤を変更して、非特異反応の有無を評価した。

#### 【試薬】

2.2.1 と同様。

## 【方法】

### (1)金コロイド液の調製

2.2.1 (1)と同様に調製した。ただし、金コロイドのブロッキング剤に、BSA またはカゼインを使用した。

### (2) テストストリップの調製

2.2.1 (2)と同様に調製した。

### (3) テストストリップの評価

2.2.1 (3)と同様に実施した。

## 【結果・考察】

金コロイドのブロッキング剤をカゼインに変えたところ、非特異反応の減少が見られた(図 2-5)。この結果から、金コロイドをブロッキングしている BSA が、固定した MBP-V<sub>L</sub>と反応している可能性が示唆された。しかし、カゼインを用いた金コロイド標識 Trx-V<sub>H</sub>を用いた場合でも、BGP-C7 添加によるテストスポットの濃さに違いは見られなかった。すなわち、非特異反応が生じていなくても、BGP-C7 に特異的な OS-IC の反応は生じていないと思われた。本実験の結果より、金コロイドのブロッキング剤変更では、OS-IC による BGP-C7 の検出には至らないと考えられた。

ブロッキング剤 (メンブレン)	0.5%カゼイン		Immunoblock <sup>®</sup>		0.5%カゼイン		Immunoblock <sup>®</sup>	
ブロッキング剤 (金コロイド)	BSA				カゼイン			
BGP-C7	+	-	+	-	+	-	+	-
結果	+	+	+	+	+	+	-	-

図 2-5. 金コロイドのブロッキング剤検討結果

#### 2.4 MBP と金コロイド標識 Trx-V<sub>H</sub> との反応の検討

前項までの実験結果より、BSA でブロッキングされた金コロイドと MBP-V<sub>L</sub> が非特異的に反応していると考えられた。本項では、メンブレンに固定されている MBP-V<sub>L</sub> を構成する MBP と V<sub>L</sub> のどちらが非特異的な反応を起こしているのかを検討するために、MBP のみをメンブレンに固定して評価を行った。

##### 【試薬】

2.2.1 と同様、ただし MBP は ATGen より購入した。

##### 【方法】

##### (1) 金コロイド標識液の調製

2.2.1 (1)と同様に調製した。

(2) テストストリップの調製

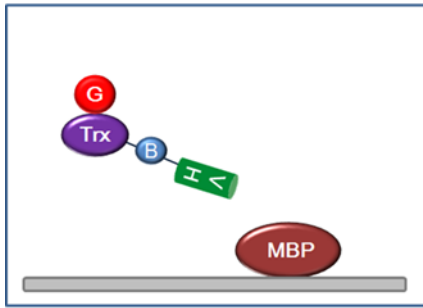
2.2.1 (2)と同様に調製した。ただし、メンブレンに MBP-V<sub>L</sub>の代わりに MBP (1 mg/mL)をライン状に 0.35 μL/spot 滴下した。

(3) テストストリップの評価

2.2.1 (3)と同様に実施した。ただし、サンプル液として 10 μL の金コロイド標識 Trx-V<sub>H</sub>液と 90 μL の PBS (pH 7.4)の混合液を使用した。

**【結果・考察】**

実験の結果、MBP と金コロイド標識 Trx-V<sub>H</sub> との間に非特異反応は起こらなかった(図 2-6)。この結果より、MBP-V<sub>L</sub>のうち、MBP 領域は非特異反応の原因ではないと考えられる。すなわち、MBP-V<sub>L</sub>を構成する MBP 領域と V<sub>L</sub> 領域では、V<sub>L</sub> 領域が非特異反応の原因である可能性が示唆された。V<sub>L</sub> は抗体の可変領域であるため、抗体の種類が変わればアミノ酸配列も変わり、金コロイドに対する非特異反応が低減する可能性も考えられる。




固定タンパク質	MBP
ブロッキング剤	Immunoblock <sup>®</sup>
標識抗体断片	Trx-V <sub>H</sub>
BGP-C7	-
	
結果	-

図 2-6. 固定 MBP に対する金コロイド標識 Trx-V<sub>H</sub> の反応評価結果

## 2.5 血清による金コロイドブロッキングの検討

前項の実験より、MBP-V<sub>L</sub> の V<sub>L</sub> 領域が非特異反応の原因である可能性が示唆された。V<sub>L</sub> 領域がブロッキングに使用している BSA より金コロイドと高い親和性を持っているために、この非特異反応が生じているとした場合、抗体可変領域を含むブロッキング剤を用いることで、V<sub>L</sub> 領域による非特異反応を抑えることができると考え、血清による金コロイドのブロッキングを試みた。

### 【試薬】

2.2.1 と同様、ウシ血清とウサギ血清は Thermo Fisher Scientific より購入した。

## 【方法】

### (1)金コロイド標識液の調製

2.2.1 (1)と同様に調製した。ただし、Trx-V<sub>H</sub>は使用せず、ブロッキングに牛血清、ウサギ血清を用いた。血清は、金コロイドのブロッキングに用いている 10%BSA 溶液とタンパク質濃度を合わせて使用した。

### (2) テストストリップの調製

2.2.1 (2)と同様に調製した。

### (3) テストストリップの評価

2.2.1 (3)と同様に実施した。ただし、非特異反応のみを評価するため、BGP-C7 は加えなかった。

## 【結果・考察】

実験の結果、血清でブロッキングした金コロイドも、MBP-V<sub>L</sub>との非特異反応を示した(図 2-7)。今回使用した抗 BGP 抗体の V<sub>L</sub> 領域が特別に金コロイドと高い親和性を持っていた、またはブロッキングに使用した BSA や血清中に含まれるタンパク質との親和性が高かった、などの理由が考えられるが、非特異反応の原因の確定には至らなかった。

また、今回ブロッキングに用いた血清に含まれる抗体は、V<sub>L</sub> を含むものの、重鎖と軽鎖が結合した状態で存在しており、V<sub>L</sub> は完全に露出せず一部は抗体分子の内側を向いている

と考えられる。このため、メンブレンに固定されている MBP-V<sub>L</sub>とは表面の状態が異なっていた可能性が考えられる。



図 2-7. 血清でブロッキングした金コロイドと固定 MBP-V<sub>L</sub>との反応評価結果

## 2.6 小括

金コロイドを用いた IC は、標識が安価かつ簡便であることから広く利用されている。従来のサンドイッチ型の IC では、金コロイドによる標識方法がある程度パターン化されており、ブロッキング試薬などは標準試薬として購入も可能なほど、普及している。しかし、OS-IC において抗体可変領域を金コロイドで標識するという試みは初めてのものであり、従来のサンドイッチ型 IC と同様に標識と検出を行うことはできなかった。

金コロイドで標識した Trx-V<sub>H</sub>とメンブレンに固定した MBP-V<sub>L</sub>の間では、抗原である BGP-C7 を加えていない条件でも非特異反応が見られた。逆に、金コロイド標識した MBP-V<sub>L</sub>とメンブレンに固定した Trx-V<sub>H</sub>の間では、100 ng/mL の BGP-C7 を加えても反応が見られなかった。さらに、金コロイドで標識した Trx-V<sub>H</sub>とメンブレンに固定した MBP-V<sub>L</sub>との間の非特異反応の原因を調べるために、金コロイド標識したアビジンや抗 BWp16 抗体を用いた実験を行ったが、Trx-V<sub>H</sub>すら反応系に添加していない条件でも、金コロイドと MBP-

V<sub>L</sub> との非特異反応が確認された。一方で、ブロッキング剤にカゼインを用いると非特異反応が低減したことから、BSA が非特異反応に関わっている可能性がある。

また、MBP-V<sub>L</sub> でタグとして使用されている MBP と金コロイド標識 Trx-V<sub>H</sub> との間に非特異反応が見られなかったことから、メンブレン側では MBP-V<sub>L</sub> のうち、V<sub>L</sub> 領域が非特異反応にかかわっている可能性が高いと考えられた。抗体の可変領域と金コロイドの親和性が高いために非特異反応が生じている可能性から、血清でブロッキングした金コロイドでも、MBP-V<sub>L</sub> に対する非特異反応が見られたことから、全ての抗体の V<sub>L</sub> 領域が金コロイドと強い親和性を示すわけではなく、抗 BGP-C7 抗体の V<sub>L</sub> に特有な非特異反応である可能性も考えられた。

ここまでの実験結果から、金コロイド標識を用いた OS-IC において、BSA と V<sub>L</sub> 領域が非特異的な反応を生じていることが推察された。一方で、BSA をカゼインに変更して、非特異的な反応を低減させても、BGP-C7 に特異的なテストラインの発色が見られなかったことから、金コロイド標識を用いて BGP-C7 に対する OS-IC を構築することは困難であると考えられた。

### 第3章 アルカリホスファターゼ(AP)標識による OS-IC 構築の検討

### 3.1 緒言

二章では、金コロイド標識による OS-IC の構築を検討したが、非特異反応によって抗原である BGP-C7 と Trx-V<sub>H</sub>、MBP-V<sub>L</sub> による抗原抗体反応を確認することができなかった。

本章では、共有結合を介してアルカリホスファターゼ(AP)で標識を行い、OS-IC の構築を検討した。市販のイムノクロマトの中には、AP 標識を用いたキットも多く存在する。酵素を用いるメリットとしては、基質との反応で発色することで、抗原抗体反応を増幅してより高感度にできること、電荷の影響で金コロイドが凝集しやすい高塩濃度条件でも利用できることなどがある。一方で、抗原抗体反応の後に発色基質溶液を展開させなければならぬことや、酵素反応を利用するため、温度の影響を受けることがあることなどは、デメリットであると考えられる。また、一般的に酵素による標識は抗体分子との共有結合を介して行われ、ブロッキング剤を用いないことから、金コロイドによる標識と比べて、標識に用いた AP が非特異的に固定抗体断片と反応する可能性は低いと考えられる。

### 3.2 AP 標識 OS-IC の検討

まず、AP による Trx-V<sub>H</sub> の標識を行い、MBP-V<sub>L</sub> を固定したテストストリップで BGP-C7 の検出を検討した。

#### 【試薬】

本項以降では、抗原として GL Biochem 社が合成した BGP-C7 を DMSO 溶液として使用した。その他の試薬は以下の通り。

Glass filter (GE Healthcare)、Tris(ナカライテスク)、*N*-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid

(CAPS)(ナカライテスク)、吸収パッド(Merck)、バックグシート(ニッポンエンジニアリング)、96 穴プレート(Greiner)、Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH<sub>2</sub> (同仁化学研究所)、3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-propanesulfonate (CHAPS)(同仁化学研究所)、5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate *p*-toluidine salt (BCIP)(Roche)、PhosphoBLOCKER™ (Cell Biolabs)、その他の試薬は富士フイルム和光純薬より購入した。

## 【方法】

### (1) AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> の調製

Trx-V<sub>H</sub> の AP 標識には、市販のキットである Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH<sub>2</sub>(同仁化学研究所)を用いた。標識方法は、キットの説明書に従った。すなわち、96 μL の Trx-V<sub>H</sub> 溶液(2.1 mg/mL)と 100 μL の Washing Buffer を混合し、Filtration Tube に加え、ピペッティングで混合したのち、8,000xg、室温、10 分遠心分離を行った。更に、Washing Buffer を 100 μL 加え、同条件で遠心分離を行い、Trx-V<sub>H</sub> のバッファ置換および濃縮を行った。

10 μL の Reaction Buffer を NH<sub>2</sub>-Reactive Alkaline Phosphatase のチューブに加え、ピペッティングにより酵素を溶解させた。酵素を溶解させた Reaction Buffer 全量を、先に処理を行った Washing Buffer のフィルター上の Trx-V<sub>H</sub> 溶液に加え、ピペッティングにより混合後、37°C、2 時間静置して AP 標識反応を行った。反応終了後、190 μL の Storage Buffer を加え、ピペッティングにより混合したのち、スクリューキャップ付きのチューブに回収し、AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> 溶液とした。AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> 溶液は冷蔵にて保存した。

### (2) テストストリップの調製

2.2.1 (2)と同様に調製した。ただし、ブロッキング剤として 0.5%カゼイン含有 50 mM ホウ酸ナトリウム水溶液(pH 8.5)、Immunoblock®、2% PhosphoBLOCKER™ を用いた。

### (3) 基質パッドの調製

予備検討において、テストストリップへサンプル溶液を展開させた後、96 穴プレート別のウェルに入れておいた BCIP 溶液にテストストリップの下端を浸漬させることで、テストストリップに BCIP を展開させようとしたが、テストストリップ下部に残留する AP により、ウェル中の BCIP が展開前に反応して不溶性となってしまう、展開されなかった。このため、グラスファイバーに BCIP 溶液を塗布した基質パッドを作製し、サンプル溶液展開後のテストストリップ下端に連結して、展開液に浸漬させることで、テストストリップへの展開前の BCIP の反応を抑えることとした。

Glass Fiber Conjugate Pad (Merck Millipore)を 5 mm 幅に切り、BCIP 水溶液(20 mg/mL)を 5  $\mu$ L/枚、マイクロピペットでライン状に塗布し、37°Cで 10 分乾燥させ、基質パッドとした。基質パッドはテストストリップと連結できるように、バックキングシートに貼付した。

### (4) テストストリップの評価

96 穴プレートのウェルに、サンプル溶液(1  $\mu$ L の BGP-C7 の DMSO 溶液(1 mg/mL)、2.5  $\mu$ L の AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> 溶液、46.5  $\mu$ L の 2% CHAPS 含有 10 mM PBS (pH 7.4))を加えた(BGP-C7 の濃度 20  $\mu$ g/mL)。このとき、ネガティブコントロールのウェルには、BGP-C7 溶液の代わりに、DMSO を同容量加えた。サンプル溶液の入ったウェルにテストストリップを挿入し、展開を開始した。サンプル液がテストストリップに吸い上げられ、ウェルから完全に液がなくなったことを確認し、テストストリップと基質パッドを連結させ、200  $\mu$ L の展開液(0.1%(w/v) CHAPS、100 mM CAPS、1 mM MgCl<sub>2</sub>)の入ったウェルに挿入した。40 分ほど展開した後、目視で結果を判定した。

### (5) サンプル溶液の検討

上記(4)の方法において、サンプル溶液の組成の2% CHAPS 含有 10 mM PBS (pH 7.4)の代わりに、超純水、市販の AP を使用したイムノクロマトキットであるエスプライン(富士レビオ)に付属していた展開液、100 mM Tris-HCl (pH 7.4)、175 mM リン酸バッファー (pH 7.4)、10 mM PBS (pH 7.4)をそれぞれ使用し、BGP-C7 添加によるテストラインの検出を評価した。

#### 【結果・考察】

実験の結果、BGP-C7 ペプチドを含まないサンプル溶液でも、弱い反応が生じたが、BGP-C7 を含むサンプル液を展開させたテストストリップで、より強い AP の反応による発色が見られた(図 3-1)。この結果は、AP 標識 Trx-V<sub>H</sub>を用いた OS-IC で BGP-C7 の検出が可能であることを示唆している。

一方で、ネガティブコントロールでも非特異的な反応が見られたことから、非特異反応を低減するために、サンプル溶液に添加するバッファーを検討した(図 3-2)。しかし、今回試したすべての条件で非特異反応が見られたため、最も非特異反応が弱かった最初の組成 2% CHAPS 含有 10 mM PBS (pH 7.4)を用いて今後の検討を行うこととした。

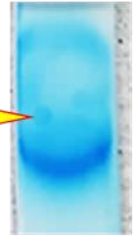
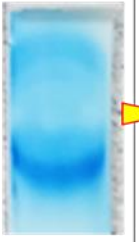
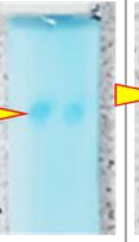



固定抗体断片	MBP-V <sub>L</sub>					
ブロッキング剤	0.5%カゼイン		Immunoblock <sup>®</sup>		2% Phospha-blocker	
標識抗体断片	Trx-V <sub>H</sub>					
標識	アルカリホスファターゼ					
基質	BCIP					
BGP-C7	+	-	+	-	+	-
						
結果	+	-	+	±	-	-

図 3-1. アルカリホスファターゼ標識 Trx-V<sub>H</sub>を用いた OS-IC の評価結果

矢印の箇所は MBP-V<sub>L</sub> のテストスポットに発色が見られた箇所。











バッファー	超純水		Espline <sup>®</sup> の バッファー		100 mM Tris-HCl (pH 7.4)		175 mM リン酸バッファー (pH 7.4)		1xPBS (pH 7.4)	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
BGP-C7 (20 µg/mL)	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
										
結果	+	±	+	+	+	±	+	+	+	±

図 3-2. アルカリホスファターゼ標識 Trx-V<sub>H</sub>を用いた OS-IC のバッファー検討結果

### 3.3 OS-IC 用メンブレンの検討

ここまでの試験において、テストストリップ用のメンブレンとして Hi-Flow Plus HF 120 (Merck millipore) を使用してきたが、当該メンブレンの日本への輸入が無くなってしまい、入手が困難となってしまったため、代替のメンブレンを検討した。

#### 3.3.1 メンブレンの検討

Hi-Flow Plus HF 120 (Merck millipore) 代替メンブレンの候補として、GE Healthcare、MBD、ADVANTEC の三社のメンブレンを評価した。

##### 【試薬】

3.2 と同様。

##### 【方法】

#### (1) テストストリップの調製

2.2.1 (2) と同様に調製した。ただし、メンブレンとして 70 CNPH-N-SS40、90 CNPH-N-SS40、150 CNPH-N-SS40、200 CNPH-N-SS40 の MBD 社製 4 種、IAB 090、IAB 120、IAB 135、IAB 180 の ADVANTEC 社製 4 種、FF80 HP、FF80 HP Plus、FP120 HP、FP120 HP Plus、Immunopore RP、Immunopore FP の GE Healthcare 社製 6 種を使用した。また、ブロッキング剤として Immunoblock<sup>®</sup> を使用した。

#### (2) テストストリップの評価

3.2 (4)と同様。

#### 【結果・考察】

BGP-C7 添加時の反応、及び非特異反応の強さは、メンブレンの種類によって異なっていた(図 3-3)。また、サンプル液の展開速度の速いメンブレンでは、非特異反応が非常に小さいものも見られたものの、これらのメンブレンでは、BGP-C7 を加えたことによるテストラインの発色も弱かった。一方で、展開速度の遅いメンブレンでは、BGP-C7 を加えた時の発色が強く、同時に非特異反応も強くなる傾向が見られた。

評価の結果、BGP-C7 による反応が強く、また、ネガティブコントロールでの反応が比較的小さい FP120 HP を選択し、今後の検討を進めていくこととした。

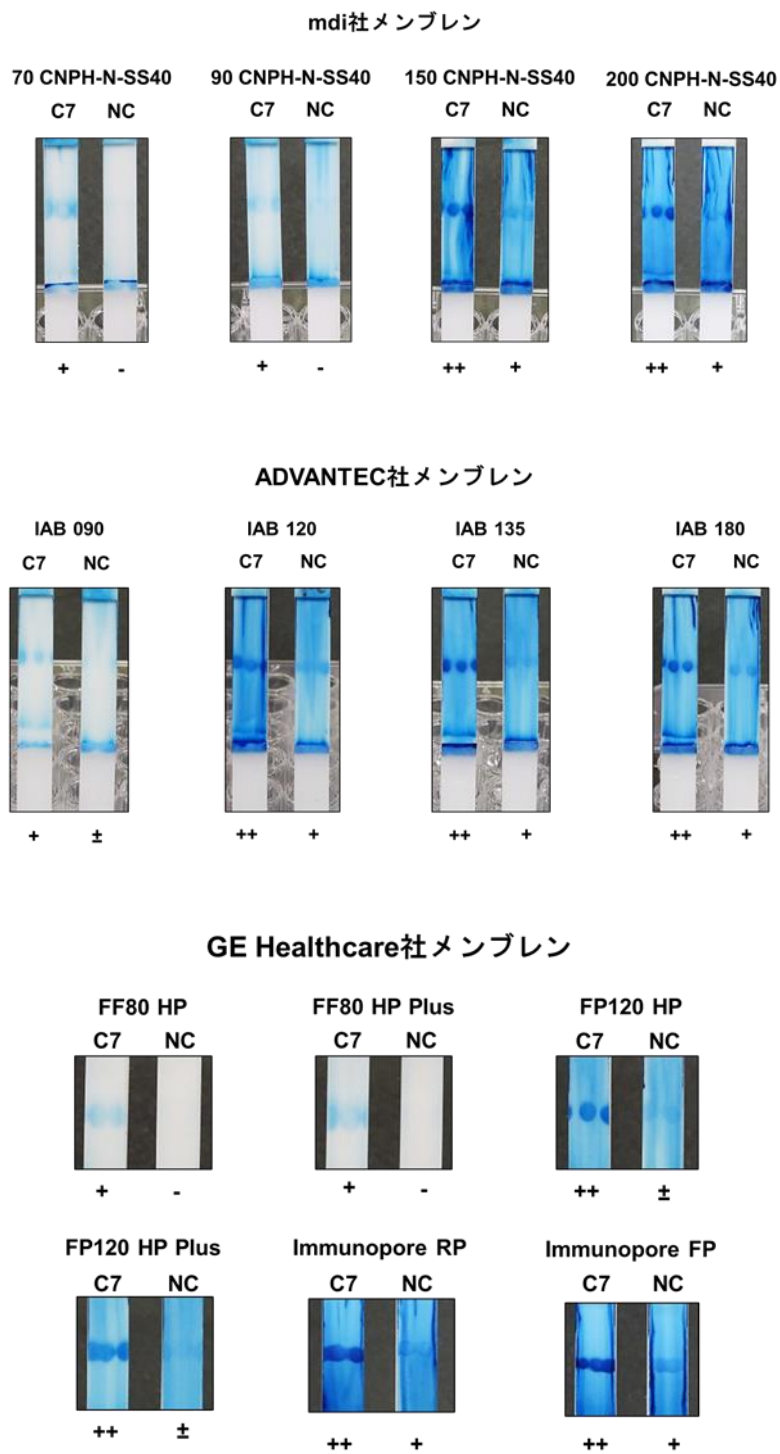


図 3-3. AP 標識 Trx-V<sub>H</sub>を用いた OS-IC におけるメンブレンの検討

### 3.3.2 FP120 HP を使用した AP 標識による OS-IC の評価

前項での検討結果より、FP120 HP (GE Healthcare)を使用したメンブレンで、AP 標識 Trx-V<sub>H</sub>による OS-IC の評価を行った。

#### 【試薬】

3.2 と同様。

#### 【方法】

##### (1) テストストリップの調製

本項より、テストストリップに使用するメンブレンへの MBP-V<sub>L</sub> の塗布を、ディスペンサー(武蔵エンジニアリング)を使用して行った。塗布後のテストストリップ作成方法は 2.2.1 (2)と同様であるが、以下に一連の流れを示す。また、ブロッキング剤として Immunoblock<sup>®</sup>を使用した。

メンブレン(FP120 HP、GE Healthcare)に MBP-V<sub>L</sub> 溶液(2.3 mg/mL)に終濃度 10%(v/v)のエタノールを加えた溶液 25  $\mu$ L を、2.5 x 30 cm のメンブレンに対してライン状に塗布した。(以下、2.2.1 (2)と同様)メンブレンを 50°C で 30 分静置して乾燥させた後、ブロッキングバッファー(0.5%カゼインを含む 50 mM ホウ酸ナトリウム溶液(pH 8.5))に 30 分浸漬してブロッキングを行った。ブロッキングしたメンブレンは洗浄バッファー(0.5%スクロース、0.05%コーラル酸ナトリウムを含む 350 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4))中でゆっくりと 30 分以上シェーカーで振盪して洗浄後、一晚室温で乾燥させた。バックグシートの接着面上で、メンブレンと

吸収パッドを連結した。続いて、コンパクトカッターで 5 mm 幅に裁断し、テストストリップとした。

## (2) テストストリップの評価

3.2 (4)と同様。ただし、BGP-C7/DMSO 溶液の濃度を 500、50、5  $\mu\text{g/mL}$  とした(サンプル溶液中の終濃度 10、1、0.1  $\mu\text{g/mL}$ )。

### 【結果・考察】

実験の結果、濃度依存的と思われるテストラインの発色が見られた(図 3-4)。しかし、BGP-C7 を含まないサンプル溶液でも、弱いテストラインの発色が見られた。OS-ELISA の結果から<sup>25)</sup>、今回用いた濃度(0.1  $\mu\text{g/mL}$ )は BGP-C7 の検出感度としては改善の余地があると思われた。更に低濃度の BGP-C7 の検出を行うため、AP 標識 OS-IC の条件検討を行うこととした。

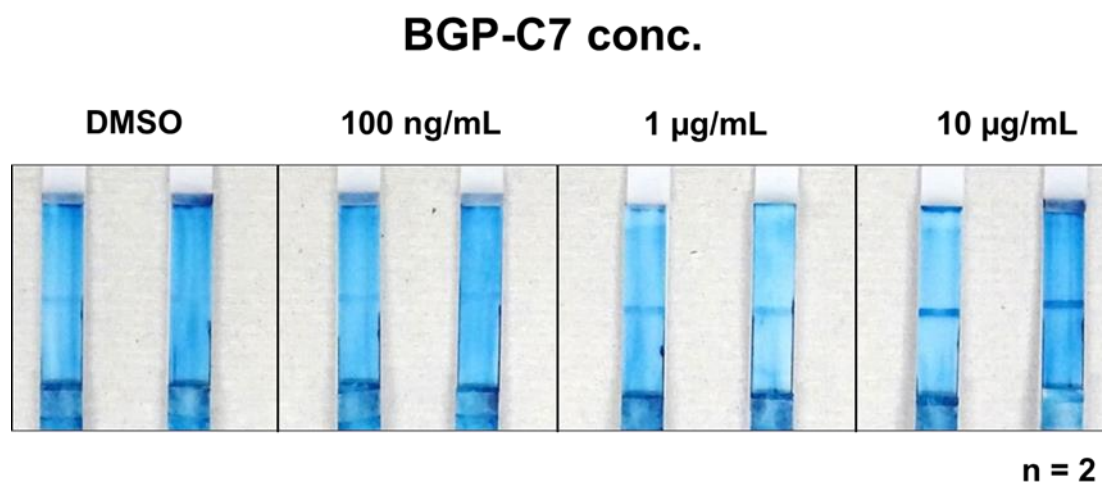


図 3-4. FP120HP を用いた OS-IC の評価結果

### 3.4 AP 標識による OS-IC の条件検討

AP 標識による OS-IC の検出感度の向上、および非特異反応を生じない条件の探索を目的とした条件検討を行った。

#### 3.4.1 AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> 量の検討

より低濃度の BGP-C7 を検出するために、AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> の添加量を検討した。

##### 【試薬】

3.2 と同様。

##### 【方法】

##### (1) テストストリップの調製

3.3.2 (1) と同様。

##### (2) テストストリップの評価

3.2 (4) と同様。ただし、Trx-V<sub>H</sub> の添加量(2.5  $\mu$ L)を 5.0  $\mu$ L とした。

##### 【結果・考察】

実験の結果、AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> の量を増やしたことによる、テストラインの発色への影響は見られなかった(図 3-5)。この結果は、テストライン上での抗原抗体反応における発色反応における律速は AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> の量ではないことを示している。また、展開液中の AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> が増えても、テストライン以外のメンブレン上におけるバックグラウンドの発色が強まることもなかった。これらのことから、AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> の量は、今回評価した OS-IC の系においては既に十分量添加されており、これ以上テストラインやバックグラウンドの発色強化に寄与しないと考えられる。

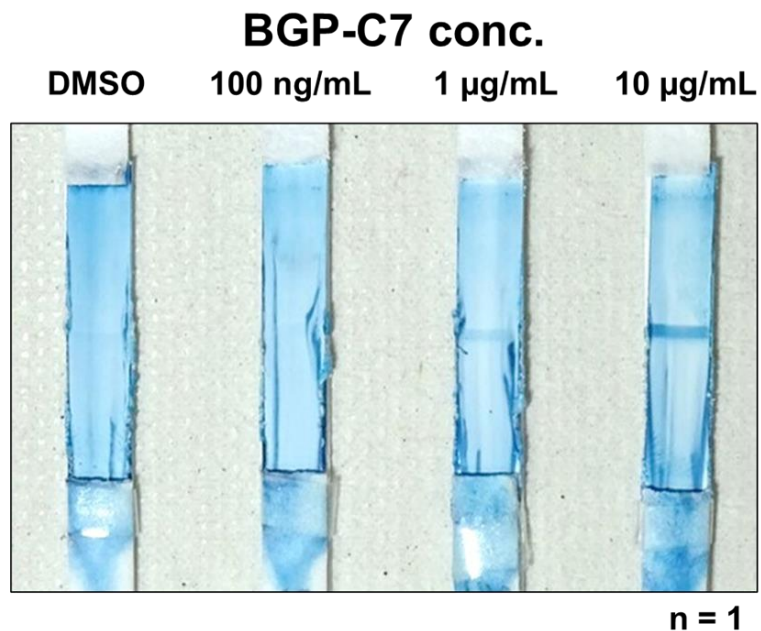


図 3-5. AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> を増やした OS-IC の評価結果

### 3.4.2 発色基質量の検討

APの基質であるBCIPの展開量を増やすことで、APによる発色反応が増え、テストラインの発色が濃くなると考え、基質パッドを二枚連結して実験を行った。

#### 【試薬】

3.2と同様。

#### 【方法】

##### (1) テストストリップの調製

3.3.2 (1)と同様。

##### (2) テストストリップの評価

3.2 (4)と同様。ただし、テストストリップに基質パッドを二枚連結した。

#### 【結果・考察】

実験の結果、基質量を増やしても検出感度の向上は見られなかった(図 3-6)。一方で、基質パッドを増やしたOS-ICでは、全体的にバックグラウンドの発色も強くなっていた。これは、メンブレン上に非特異的に残存したAP、またはAP標識Trx-V<sub>H</sub>の発色が強められた結果と思われる。AP標識Trx-V<sub>H</sub>の量を増やした際には、このような現象は生じなかったため、バックグラウンドの原因となるAP、またはAP標識Trx-V<sub>H</sub>は、サンプル液に含まれるAP標識Trx-V<sub>H</sub>の量依存的に増加するわけではなく、一定量がメンブレン上に保持されてい

るものと思われた。3.4.1の結果と合わせて、酵素や基質の量を増やしても、BGP-C7の検出感度は向上しないと考えられた。

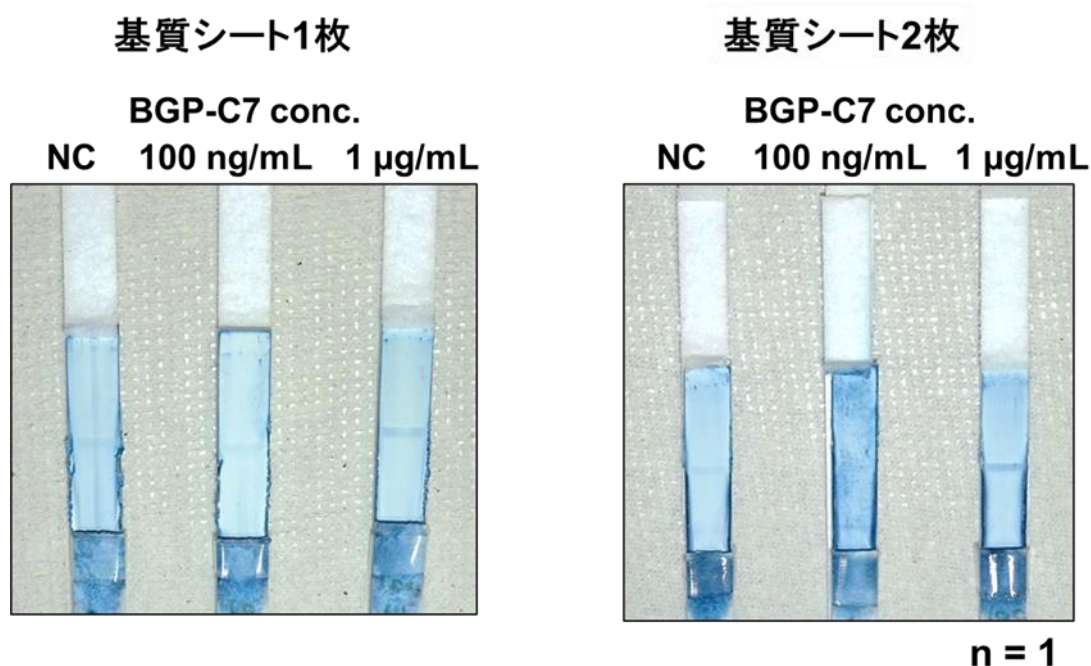


図 3-6. 基質パッド数の違いによる OS-IC の評価結果

### 3.4.3 洗浄工程の検討

AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> を展開したテストストリップは、基質を展開するとメンブレンが全体的に青くなり、また、所々で濃い青のまだら模様が生じている。これは、メンブレン中に AP、または AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> が残存し、テストライン以外の場所でも基質が発色してしまうためと思われた。そこで、基質を展開する前にメンブレンの洗浄を行うことで、バックグラウンドでの基質の発色を抑えられないか検討を行った。また、同時に非特異的なテストラインの発色を低減できないかを評価した。

## 【試薬】

3.2 と同様。

## 【方法】

### (1) テストストリップの調製

3.3.2 (1)と同様。

### (2) テストストリップの評価

3.2 (4)と同様。ただし、テストストリップがサンプル溶液を吸い上げたのち、展開液 100  $\mu\text{L}$  を展開させてメンブレンを洗浄したのち、基質パッドとの連結、展開を行った。

## 【結果・考察】

実験の結果、バックグラウンドの大きな減少は見られず、非特異反応も消えなかった(図 3-7)。この結果から、メンブレン上に残留している AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> は、メンブレン上に単に滞留しているわけではなく、何らかの作用によってメンブレン上に保持されていると考えられる。一方で、3.3.1 の結果より、サンプル液の展開速度が速いメンブレンでは、バックグラウンドの発色が非常に少なかったことから、最初のサンプル液の展開速度が、メンブレン中での AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> の保持に影響している可能性がある。

イムノクロマトに使用するメンブレンは、乾固させたタンパク質を保持する性質があり、テストラインがサンプル液に展開によって流失しないのも、この性質によるものである。こ

のため、展開速度の遅いメンブレンでは、展開中にサンプル液の一部が蒸発し、AP、または AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> がメンブレンに吸着した可能性も考えられる。

また、今回の結果においても、目視でネガティブコントロールの非特異反応より強い発色が見られた BGP-C7 濃度は、100 ng/mL であった。また、それぞれの濃度で 2 回ずつの測定においても、テストラインの発色程度にややばらつきが見られた。

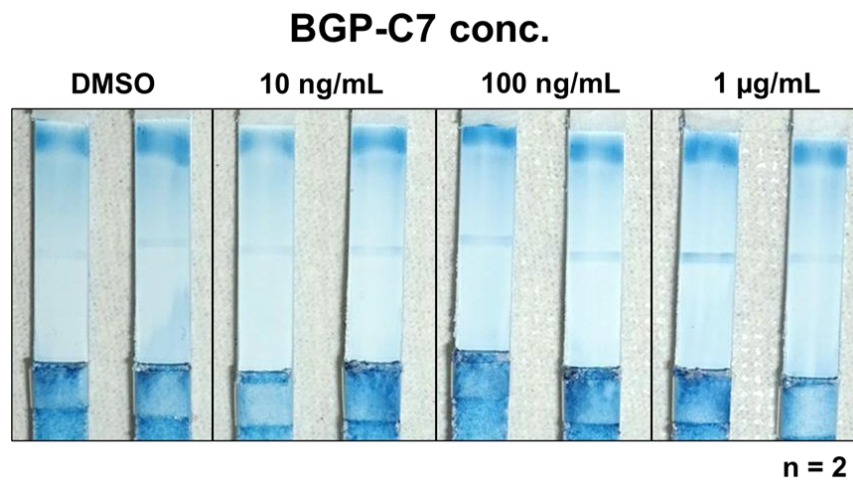


図 3-7. 洗浄工程を追加した OS-IC の評価結果

### 3.5 小括

本章では、AP 標識 Trx-V<sub>H</sub>を用いた OS-IC の構築を試みたが、今回行った実験条件では、非特異反応を完全に抑えることはできなかった。OS-ELISA では、わずかではあるものの、V<sub>H</sub>と V<sub>L</sub>間に相互作用があることから<sup>25)</sup>、OS-IC でもネガティブコントロールにおいても、わずかにテストライン上の MBP-V<sub>L</sub>と AP 標識 Trx-V<sub>H</sub>が相互作用している可能性がある。AP による発色反応は非常に高感度であるため、微量の AP 標識 Trx-V<sub>H</sub>が非特異反応を示してしまったと考えられる。非特異反応によるテストラインは、定性的な結果を求める IC においては偽陽性にとられるため、大きな問題となる。このため、AP 標識による OS-IC を行うためには、わずかな V<sub>H</sub>と V<sub>L</sub>間の相互作用も障害となってしまう。

3.3.1 で実施したメンブレンの検討結果から、サンプル液の展開速度が速いメンブレンにおいては、非特異反応やバックグラウンドの発色が現れないメンブレンも見られた。これらのメンブレンでは、非特異反応だけでなく、BGP-C7 を加えた系での反応も弱かったため、以降の検討には用いなかったが、高濃度の BGP-C7 に対しては、非特異反応のない OS-IC による検出が可能と思われる。

テストラインの発色が強かったメンブレン、FP120HP において、バックグラウンドやまだら状の発色は、洗浄工程を追加しても改善しなかった。このことは、最初のサンプル液展開時に、AP、または AP 標識 Trx-V<sub>H</sub>がメンブレンに吸着したためと考えられる。展開した酵素や抗体のメンブレンへの吸着は、メンブレンのブロッキング剤の変更や、展開液の組成に界面活性剤を加える、メンブレン表面に水分の蒸発を防ぐフィルム(トップフィルム)を貼るなどの方法で低減する可能性もあるが、今回はこれ以上バックグラウンドを抑えたとしても、テストライン上の非特異反応を抑えることが難しいと考え、更なる条件検討は行わなかった。

一方で、AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> を用いた OS-IC では、明らかな BGP-C7 濃度依存的なテストラインの発色が現れた。ネガティブコントロールと目視で比較して、明らかに差があるのは 100 ng/mL 以上であり、OS-ELISA での BGP-C7 の検出と比較すると低感度ではあるものの、メンブレン上で MBP-V<sub>L</sub> と展開液中の Trx-V<sub>H</sub>、BGP-C7 による抗原抗体反応が実際に起こっていることを確認することができた。このことは、標識方法や展開条件によっては、非特異反応を抑えた形で BGP-C7 を検出する OS-IC の構築が可能であることを示唆すると考えらえる。

以上のように、AP 標識を用いた OS-IC では、第二章で行った金コロイド標識の OS-IC と異なり、OS-IC により BGP-C7 を検出することが可能であった。

## 第4章 着色セルロース粒子による OS-IC 構築の検討

## 4.1 緒言

第三章では、アルカリホスファターゼ(AP)で Trx-V<sub>H</sub> を標識した OS-IC の構築を試みた。結果として、100 ng/mL 以上の高濃度域では AP-Trx-V<sub>H</sub>、MBP-V<sub>L</sub>、BGP-C7 の抗原抗体反応によるテストラインの発色増加を確認することができた。一方で、ネガティブコントロールでも発生する非特異反応を完全に抑制することはできず、OS-IC の確立までには至らなかった。酵素発色は高感度であるため、V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> のわずかな非特異反応も検出してしまうことから、酵素反応を用いた系では非特異反応の改善は難しいと考えた。

本章では、改めて着色粒子を用いた OS-IC の構築を検討した。第二章では、着色粒子である金コロイドが MBP-V<sub>L</sub> と非特異反応を生じてしまったため、BGP-C7 の検出には至らなかった。金コロイドによる標識は、金コロイド粒子の表面電荷による静電的な吸着によって行われているが、それ以外にも金元素にはシステイン残基<sup>32)</sup>や特定の配列<sup>33)</sup>を含むペプチドとも結合しやすいことが知られており、コロイドを構成している金粒子自体がメンブレンに固定されている MBP-V<sub>L</sub> と相互作用してしまった可能性もある。そこで、本章では、着色粒子として金コロイドではなく、セルロース粒子を用いた OS-IC の構築を試みた。

## 4.2 着色セルロース粒子の標識法の検討

着色セルロース粒子として、NanoAct®(旭化成)を使用した。着色セルロース粒子には、二種類の標識方法があり、一つは金コロイドと同様の表面電荷による静電的な吸着により標識を行う受動結合型、もう一つは表面の官能基を介して、共有結合により標的分子の標識を行う共有結合型である。本章では、受動結合型と共有結合型の二種類を用いて評価を行った。

#### 4.2.1 受動結合型着色セルロース粒子標識の検討

受動結合型の着色セルロース粒子は、金コロイド同様に負の表面電荷をもっている。このため、金コロイドとほぼ同様の方法によって、タンパク質の標識が可能である。本項では、Trx-V<sub>H</sub>を受動結合型の着色セルロース粒子で標識し、BGP-C7と混合して、MBP-V<sub>L</sub>を固定したメンブレンに展開し、検出が可能かを評価した。

##### 【試薬】

本項で使用した試薬は以下の通り。

FP120 HP (GE Healthcare)、Glass filter (GE Healthcare)、カゼイン(関東化学)、バックグシート(ニッポンエンジニアリング)、96 穴プレート(Greiner)、Tris (ナカライテスク)、CHAPS (同仁化学研究所)、2-morpholinoethanesulfonic acid (MES)(同仁化学研究所)、着色セルロース粒子(NanoAct<sup>®</sup>) (旭化成)

その他の試薬は、富士フイルム和光純薬より購入した。

##### 【方法】

###### (1) 着色セルロース粒子標識 Trx-V<sub>H</sub>の調製

まず、5  $\mu$ L の着色セルロース粒子(1 wt%)と 45  $\mu$ L のバッファー、1.0  $\mu$ L の Trx-V<sub>H</sub> (4.8 mg/mL)を混合し、室温で 2 時間反応させた。着色セルロース粒子には、赤色、緑色の 2 色を用い、バッファーは 100 mM MES (pH 5.0)、100 mM Tris-HCl (pH 6.8)、100 mM ホウ酸 (pH 8.5)を用い、計 6 通りの条件で反応を行った。

続いて、600  $\mu\text{L}$  のブロッキングバッファー(1%カゼイン含有 100 mM ホウ酸(pH 8.5))を加え、室温で一時間静置し、着色セルロース粒子のブロッキングを行った。その後、13,000 xg、20°C、20 分遠心分離を行い、上清を除去後 600  $\mu\text{L}$  の 50 mM ホウ酸(pH 8.5)を添加し、超音波で着色セルロース粒子を液中に分散させ、洗浄した。さらに遠心分離、洗浄の手順をもう一度繰り返した。洗浄した着色セルロース粒子を、再度 13,000 xg、20°C、20 分遠心分離し、上清を除去後、300  $\mu\text{L}$  の保存バッファーに懸濁し、着色セルロース粒子標識 Trx-V<sub>H</sub>とした。保存バッファーには、4.2 mL の 50 mM ホウ酸(pH 8.5)、0.1 mL のブロッキングバッファーの混合液に 0.75 g のスクロースを溶解させたものを使用した。調製した着色セルロース粒子標識 Trx-V<sub>H</sub>は冷蔵保存した。

## (2) テストストリップの調製

3.3.2 (1)と同様。

## (3) テストストリップによる評価

96 穴プレートのウェルに、9  $\mu\text{L}$  の着色セルロース粒子標識 Trx-V<sub>H</sub>、1  $\mu\text{L}$  の BGP-C7(1 mg/mL)または DMSO、2%CHAPS 含有 PBS(pH 7.4)の展開液を調製し、テストストリップに展開させた。展開後のテストラインの色調を目視で確認し、評価した。

### 【結果・考察】

評価の結果、BGP-C7 を加えていない展開液からも、非特異的なテストラインの発色が確認された(図 4-1)。また、この結果は、着色セルロース粒子の色や標識時に使用した三種類のバッファーの違いによっても変わらなかった。さらに、Trx-V<sub>H</sub>で標識していない、着色セルロースのみを添加していない系でも生じていることから、ここでの非特異反応は、Trx-V<sub>H</sub>と MBP-V<sub>L</sub>の相互作用によるものではなく、ブロッキングを逃れて僅かに残った標識粒子

の表面電荷や、ブロッキングに使用したカゼインに対してメンブレン上の MBP-V<sub>L</sub> が反応することによって生じている可能性もある。

また、BGP-C7 を加えた展開液の方が強く発色しているように見える条件も見られたが、今回の実験だけでは発色の差が BGP-C7 によるものと確定することはできなかった。

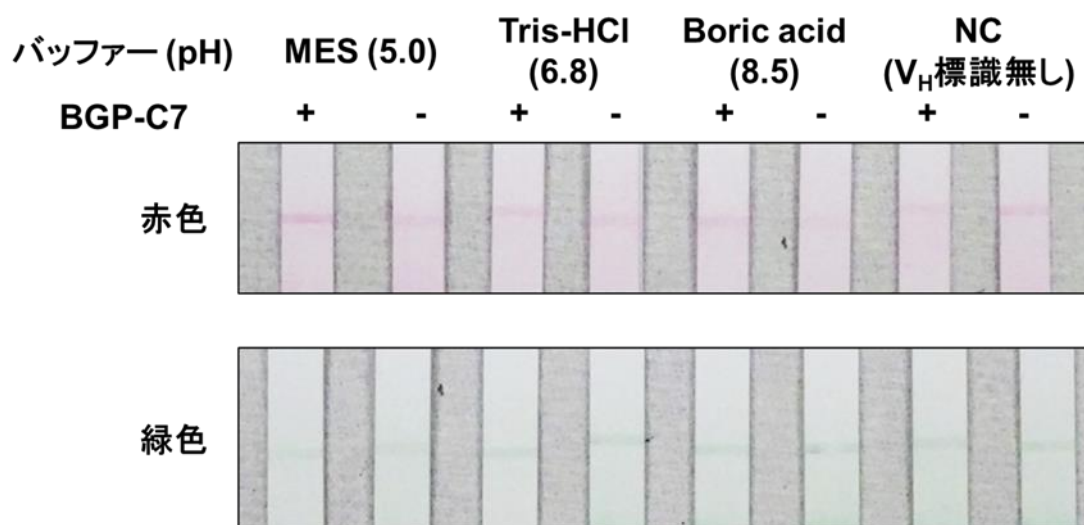


図 4-1. 受動結合型着色セルロース粒子で標識した OS-IC の評価結果

#### 4.2.2 共有結合型着色セルロース粒子標識の検討

これまで、金コロイド、および着色セルロース粒子の表面電荷を利用して Trx-V<sub>H</sub> を標識する系では非特異反応が見られてきた。本項では、表面電荷ではなく、着色セルロース粒子表面のカルボキシル基と、Trx-V<sub>H</sub> のアミノ基を、EDC と NHS を用いたカップリング反応による架橋で共有結合を形成させて、Trx-V<sub>H</sub> の標識を行った。

また、着色セルロース粒子標識 Trx-V<sub>H</sub> とメンブレンの種類や、展開バッファーによる影響も評価した。

##### 【試薬】

メンブレンとして、IAB 090、IAB 120(ADVANTEC)、FF80 HP、FF80 HP Plus、FP120 HP、FP120 HP Plus (GE Healthcare)の計 6 種を使用した。

また、4.2.1 で使用した試薬と 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC)、*N*-hydroxysuccinimide (NHS) (GE Healthcare)を使用した。

##### 【方法】

###### (1) 着色セルロース粒子標識 Trx-V<sub>H</sub> の調製

まず、5  $\mu$ L の着色セルロース粒子(1 wt%)、45  $\mu$ L の 100 mM MES バッファー(pH 5.0)、50  $\mu$ L の 7.5% NHS、50  $\mu$ L の 1.15% EDC を混合し、室温で 15 分間静置し、着色セルロース粒子表面のカルボキシル基を活性化させた。反応液を 13,000 xg、20°C、20 分遠心し、上清を除いたのち、50  $\mu$ L の 100 mM MES バッファーと 2.1  $\mu$ L の Trx-V<sub>H</sub> (4.8 mg/mL)を加え、超音

波で着色セルロース粒子を液中に分散させた後、室温に 2 時間静置してカップリング反応を行った。着色セルロース粒子は、赤色、緑色、青色の三色を用いた。

これ以降は、受動結合型の着色セルロース粒子の標識と同様であり、反応液に 600  $\mu$ L のブロッキングバッファー(1%カゼイン含有 100 mM ホウ酸(pH 8.5))を加え、室温で一時間静置し、着色セルロース粒子のブロッキングを行った。その後、13,000 xg、20°C、20 分遠心分離を行い、上清を除去後 600  $\mu$ L の 50 mM ホウ酸(pH 8.5)を添加し、超音波で着色セルロース粒子を液中に分散させ、洗浄した。さらに遠心分離、洗浄の手順をもう一度繰り返した。洗浄した着色セルロース粒子を、再度 13,000 xg、20°C、20 分遠心分離し、上清を除去後、300  $\mu$ L の保存バッファーに懸濁し、着色セルロース粒子標識 Trx-V<sub>H</sub>とした。保存バッファーには、4.2 mL の 50 mM ホウ酸(pH 8.5)、0.1 mL のブロッキングバッファーの混合液に 0.75 g のスクロースを溶解させたものを使用した。調製した着色セルロース粒子標識 Trx-V<sub>H</sub>は冷蔵保存した。

## (2) テストストリップの調製

3.3.2 (1)と同様。ただし、メンブレンとして、IAB 090、IAB 120(ADVANTEC)、FF80 HP、FF80 HP Plus、FP120 HP、FP120 HP Plus(GE Healthcare)の計 6 種を使用した。

## (3) テストストリップによる評価

4.2.1 (3)と同様。

## (4) 展開バッファーの検討

展開バッファーの種類や pH を変更したときの BGP-C7 の検出や非特異反応に対する影響を評価するため、(3)で最も非特異反応が小さいと思われるメンブレンを使用したテストストリップについて、展開液の 2%CHAPS 含有 PBS (pH 7.4)の代わりに、これまで別種の IC

で使用しているクエン酸ナトリウム(pH 6.5 または pH 7.2)、リン酸カリウム(pH 6.5 または pH 7.2)を用いた際の、テストラインの発色を評価した。

更に、それぞれの色の着色セルロース粒子について、非特異反応が出ず、かつ BGP-C7 添加によるテストラインの発色が強かった条件において、BGP-C7 濃度依存的な発色が生じているか評価した。

この項よりテストラインの検出にイムノクロマトリーダー(浜松ホトニクス)を用いた。イムノクロマトリーダーを使用することにより、テストラインの濃さをミリ吸光度(mABS)として定量することができる。

#### 【結果・考察】

評価の結果、共有結合型の着色セルロース粒子で標識した Trx-V<sub>H</sub> においても、AP 標識 Trx-V<sub>H</sub> と同様に、メンブレンの違いによりテストラインの発色に違いが見られた(図 4-2)。また、何種類かのメンブレンでは非特異反応が見られなかったが、バックグラウンドの着色が強く、BGP-C7 を加えた時のテストラインの発色は識別が困難であった。そこで、経験的に金コロイドを用いたイムノクロマトで、バックグラウンドが薄く、テストラインが鮮明になりやすいクエン酸ナトリウム、およびリン酸カリウムバッファーを用いて試験を行い、イムノクロマトリーダーによりテストラインの発色を定量した。その結果、いくつかの条件ではネガティブコントロールで検出無し(<5 mABS)のまま、非特異反応の少ない状態で、Trx-V<sub>H</sub>、MBP-V<sub>L</sub>、BGP-C7 による抗原抗体反応によるテストラインの発色が検出された(図 4-3)。

さらに、BGP-C7 濃度を段階的に変化させた展開液によるテストラインの発色は、BGP-C7 の濃度依存的に変化していたことから(図 4-4)、今回選択した条件において、OS-IC により BGP-C7 を検出できたものと考えられた。

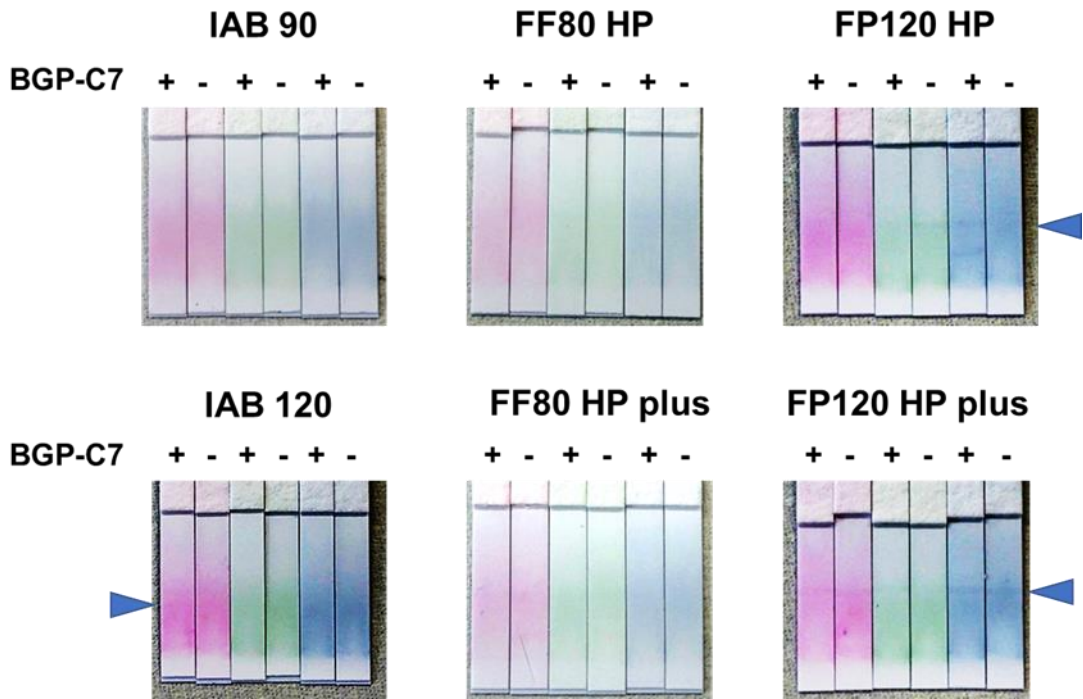


図 4-2. 共有結合型着色セルロース粒子による OS-IC の評価

6 種類のメンブレン、および 3 色の着色セルロース粒子を評価した。矢印の箇所は、テストラインの発色が見られた部分。

メンブレン	IAB120				メンブレン	FF80 HP				
バッファー	100 mM クエン酸Na		100 mM リン酸K		バッファー	100 mM クエン酸Na		100 mM リン酸K		
pH	6.5	7.2	6.5	7.2	pH	6.5	7.2	6.5	7.2	
BGP-C7	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
mABS	ND	ND	26.3	ND	ND	ND	20.3	ND	ND	ND

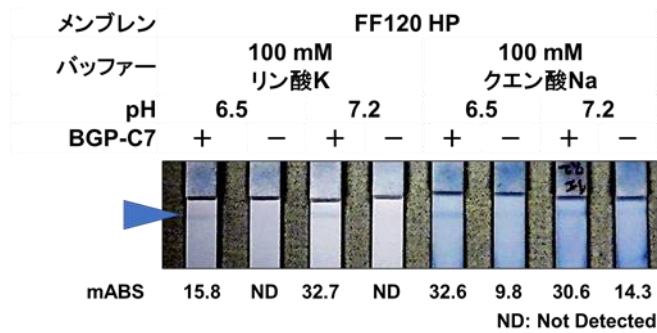


図 4-3. クエン酸ナトリウム、およびリン酸カリウムバッファー組成を用いた OS-IC  
mABS は免疫クロマトリーダーを用いて測定した吸光度、矢印はテストラインの位置を示す。

a) 赤色着色セルロース粒子

b) 緑色着色セルロース粒子

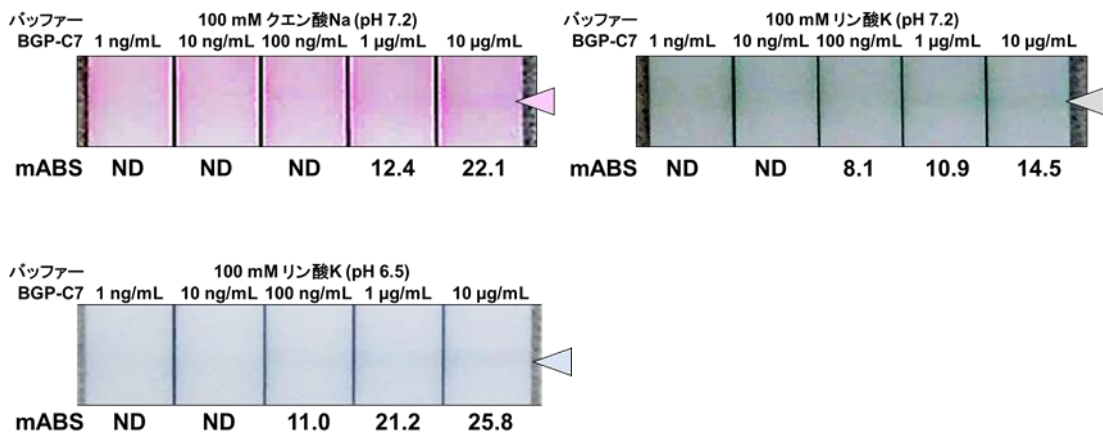


図 4-4. 着色セルロース粒子を用いたテストストリップにおける、

#### BGP-C7 濃度とテストラインの発色測定結果

mABS は免疫クロマトリーダーを用いて測定した吸光度、矢印はテストラインの位置を示す。

### 4.3 着色セルロース粒子標識による OS-IC の検討

4.2.2 の結果から、着色セルロース粒子標識 Trx-V<sub>H</sub>を用いた OS-IC によって BGP-C7 の検出ができることが分かった。本項では、BGP-C7 濃度とテストラインの発色との相関性を評価するため、3 色の着色セルロース粒子のうち、最も BGP-C7 による強い発色が見られた青色の着色セルロース粒子を用いた系で、段階的に濃度を調整した BGP-C7 を展開し、テストラインの発色を測定して濃度依存性を評価した。

#### 【試薬】

4.2.1 と同様。

#### 【方法】

##### (1) 着色セルロース粒子標識 Trx-V<sub>H</sub> の調製

4.2.2 (1) と同様。

##### (2) テストストリップの調製

3.3.2 (1) と同様。ただし、メンブレンとして FP120 HP を使用した。

##### (3) テストストリップによる評価

96 穴プレートのウェルに、9  $\mu$ L の青色着色セルロース粒子標識 Trx-V<sub>H</sub>、1  $\mu$ L の BGP-C7 の DMSO 溶液(1000、100、10、1、0.1  $\mu$ g/mL)または DMSO、90  $\mu$ L の 100 mM リン酸カリウム(pH 7.2)の展開液を調製した。このとき、展開液中の BGP-C7 の濃度は、10、1  $\mu$ g/mL、

100、10、1、0 ng/mL となる。各濃度 3 本ずつのテストストリップに展開させ、展開後のテストラインの色調をイムノクロマトリーダーで測定した。

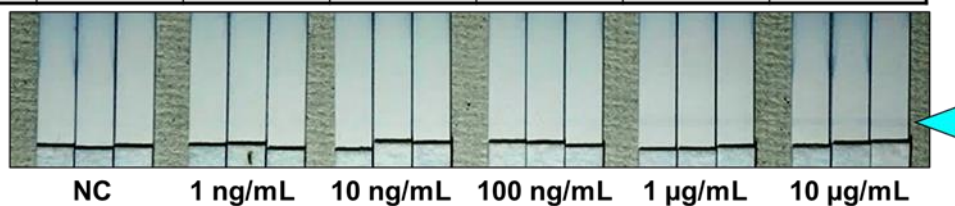
#### 【結果・考察】

実験の結果、青色着色セルロース粒子標識 Trx-V<sub>H</sub>によるテストラインの発色は、展開液に含まれる BGP-C7 の濃度依存的に増加していた(図 4-5)。また、DMSO のみを加えたネガティブコントロールでは、実験を行った 3 本全てがイムノクロマトリーダーで検出されず(5 mABS 以下)であり、非特異反応も見られなかった。また、10 ng/mL でのテストラインの測定結果(mABS)は  $8.6 \pm 0.9$  であり、少なくとも 10 ng/mL 以上の BGP-C7 を検出できることが分かった<sup>34)</sup>。

1 ng/mL では、3 本の測定結果(mABS)が 6.2、6.2、検出されず(ND)であり、値を得ることはできなかった。濃度によってばらつきがあるものの、各濃度の標準偏差が平均値の約 10% 前後であること、イムノクロマトリーダーの検出限界が 5 mABS であることから、標識 Trx-V<sub>H</sub>や固定 MBP-V<sub>L</sub>の量など、展開条件のさらなる検討によって 1 ng/mL の BGP-C7 が測定できるようになる可能性がある。

a) テストストリップ

バッファー	リン酸K (pH 7.2)					
BGP-C7	NC	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	1 µg/mL	10 µg/mL
mABS (n = 3)	ND	6.2	9.3	10.6	16.8	32.8
	ND	ND	9.0	13.6	18.3	23.7
	ND	6.2	7.6	14.6	20.4	22.0
平均±SD	ND		8.6±0.9	12.9±2.1	18.5±1.8	26.2±5.8



b) BGP-C7 濃度とテストライン吸光度

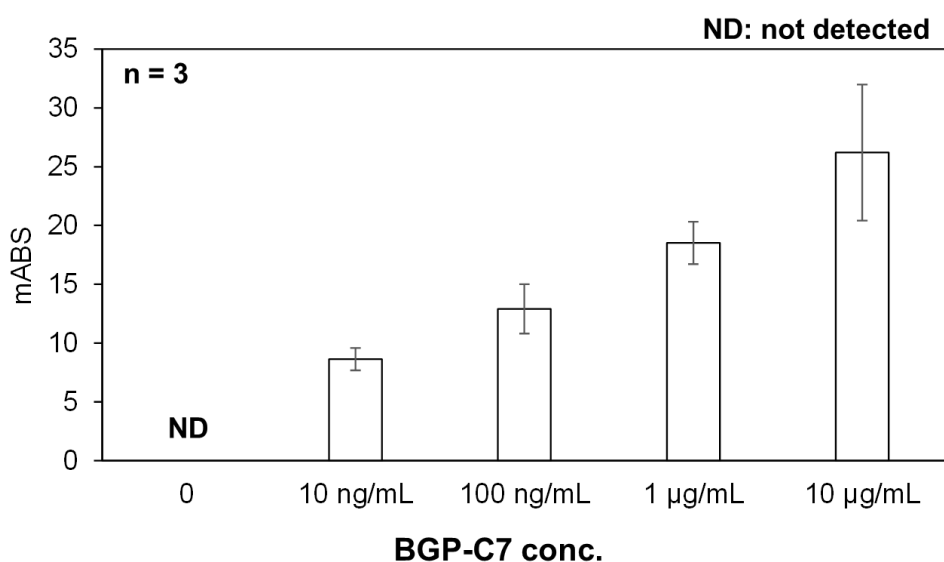


図 4-5. 青色セルローズ着色粒子における BGP-C7 濃度と発色測定結果

青色着色セルローズ粒子は、各濃度 3 本のテストストリップで測定を行い、平均±SD(標準偏差)を求めた。a)はテストラインの吸光度および写真を示し、b)は BGP-C7 濃度(横軸)とテストラインの吸光度(縦軸)との関係のグラフ。

#### 4.4 小括

第四章では、着色セルロース粒子で標識した Trx-V<sub>H</sub>を用いた BGP-C7の検出を検討した。最初に用いた受動結合型の着色セルロース粒子では、非特異反応が生じてしまい、BGP-C7の検出には使用できなかった。これは、金コロイドを用いた系と似た現象であるが、今回はブロッキング剤として BSA でなくカゼインを用いていた。受動結合型の着色セルロース粒子は負の表面電荷をもっており、これが非特異反応の原因である場合は、使用する抗体断片の pI 値や、標識する際のバッファの pH を調整するなどの手法が有効であるかもしれない。

共有結合型の着色セルロース粒子を用いた実験では、OS-IC により非特異反応なしで BGP-C7 を検出できた。また、段階的に希釈した BGP-C7 を用いた実験から、今回の OS-IC の系では 10 ng/mL 以上の BGP-C7 を検出できた。OS-ELISA の方が BGP-C7 の検出感度は高いため<sup>25)</sup>、OS-IC でも更なる条件検討により感度が向上する可能性もある。

一方で、メンブレンの種類や展開バッファの違いによって非特異反応が現れる条件もあった。今回は、V<sub>H</sub>と V<sub>L</sub>のアミノ酸配列までは検討を行っていないが、両者の相互作用を抑えられれば、OS-IC の条件設定はより汎用的なものとなると考えられる。

本章の実験結果は、初めて OS-IC により標的分子である低分子化合物(BGP-C7)を、非競合的に、かつ非特異反応なしで 10 ng/mL まで検出した例である。各抗原や抗体に合わせた条件検討が必要と思われるが、本システムを応用することで、低分子化合物でも非競合的に検出する OS-IC を構築できるようになることが期待される。

## 第5章 ヒスタミン、グリアジン由来ペプチド検出 用 OS-IC 作製への取り組み

## 5.1 緒言

第4章では、BGP-C7を検出するOS-ICを構築した。OS-ICによる低分子化合物の検出が可能であることが分かったため、新たな低分子抗原を検出するOS-ICの構築を検討した。新たな抗原には、食品業界で問題となっている、ヒスタミンと小麦に含まれるタンパク質であるグリアジン由来の7残基のペプチド(PQPQLPY)の2種を選定した。本章では、これらの抗原に対するモノクローナル抗体を調製し、抗体の活性や特性を評価するとともに、V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>領域をそれぞれ組み換えタンパク質として発現するために、抗体遺伝子の解析を行った。

### 5.1.1 ヒスタミン

ヒスタミンは、分子量111.1の化合物であり、ヒスチジンデカルボキシラーゼにより、ヒスチジンから合成される<sup>35)</sup>。ヒスタミンはヒトの体内では血圧降下、血管透過性亢進、平滑筋収縮、血管拡張、腺分泌促進、蕁麻疹などを誘導する<sup>36)</sup>。

ヒトのアレルギー反応では、マスト細胞などから放出されたヒスタミンによって、上記のような症状を引き起こされる、という一連の反応により症状が発現し、時にはアナフィラキシーショックのような命に関わる症状を引き起こすこともある<sup>37)</sup>。

ヒスタミンは自然界にも分布しており、ヒスタミンを含む食品を摂取することによって、アレルギーと類似した症状を特徴とする食中毒(アレルギー様食中毒)を引き起こす。アレルギー様食中毒は、ヒスタミンの原料となるヒスチジンを多く含むマグロ、ブリ、サンマなどの赤身魚に、ヒスチジンデカルボキシラーゼを持つ微生物が付着し、ヒスタミンを生成することによって引き起こされる<sup>38)</sup>。ヒスチジンデカルボキシラーゼを持つ微生物としては、海洋性の *Photobacterium phosphoreum* や *Photobacterium damsela*、腸管性の *Morganella*

*morganii* や *Raoultella planticola* などが知られている<sup>39-41)</sup>。アレルギー様食中毒は、原因物質であるヒスタミンが加熱しても分解されないため<sup>42)</sup>、細菌性の食中毒や、タンパク質性毒素(黄色ブドウ球菌の産生するエンテロトキシン等<sup>43)</sup>、耐熱性毒素を除く)による食中毒と異なり、加熱調理済みの食品でも発生する。このため、ヒスタミンが蓄積された食品を加熱調理した場合、最終製品からはヒスタミン生成菌が検出されないにもかかわらず、アレルギー様食中毒が発生する。従って、アレルギー様食中毒を予防するためには、微生物検査だけでは難しく、ヒスタミン自体を検出する必要がある。

日本国内では、年度によりばらつきはあるものの、平成 27 年以降は、年間のアレルギー様食中毒の患者数が 200 人を超えることが多くなっている<sup>44)</sup>。また、事件数と患者数に相関が小さいことは、一度の事件によって発生する患者数にばらつきが多いためである。ヒスタミンによる食中毒は学校給食などの集合調理による大規模な発生が目立っており、最近では 2020 年 11 月 11 日に、東京都墨田区の保育園において、給食のきつねうどんを喫食した園児 28 名がヒスタミンによる発疹などのアレルギー様食中毒を発症した<sup>45)</sup>。

アレルギー様食中毒を引き起こすヒスタミン摂取量は、個人差はあるものの、22~320 mg とされている。食品中におけるヒスタミンの含有量について、日本国内では基準値はないが、アメリカ(FDA)では 50 mg/kg が基準値とされている<sup>46)</sup>。このため、検査キットも 50 mg/kg のヒスタミンを検出する必要がある。現在、ヒスタミン検出キットとしては、酵素による比色法<sup>47)</sup>や、競合法<sup>48)</sup>を用いたイムノクロマトグラフィーが市販されている。特に、競合法イムノクロマトグラフィーは Neogen 社の「Reveal ヒスタミン」などが知られているが、競合法のためテストラインが薄くなった度合いを目視で判定する必要があり、低濃度では目視による判定が難しい。一方、OS-IC は、低濃度のヒスタミンの検出に非常に有効であると考えられる。そこで、ヒスタミンを検出する OS-IC の作製を検討した。

### 5.1.2 グリアジン由来ペプチド

小麦に含まれるタンパク質のグリアジンは、グルテニンと一緒に混和されることによって、グルテンを形成する。グルテンは、パンや麺の生地に粘弾性を与え、パンのボリュームや麺のコシなど食品の物性に影響する。グルテンを形成する性質は小麦に特有のものであり、コメや大麦など、他の穀物では小麦のような生地や食品を作ることは難しい。このグルテンの性質から、小麦は世界中で栽培され、様々な料理に利用されている。

小麦は多くの食品に含まれる一方、小麦アレルギーやセリアック病など、小麦タンパクを原因とする疾病も知られている。

小麦アレルギーは小児に多く、大人になるに従い寛解することが多い。しかし、大人に対しても小麦アレルギーが発症することがある。過去には、石鹼に保湿剤として添加された小麦タンパク質の加水分解物が、目や鼻などの粘膜に長期間暴露されることによって、小麦アレルギーを発症した事例もある<sup>49)</sup>。この場合の小麦アレルギーは、患者が小麦を含む食品を喫食したのち、運動によって蕁麻疹や呼吸器の異常、重症の場合はアナフィラキシーを発症するため、食物依存性運動誘発性アナフィラキシーと呼ばれる<sup>50)</sup>。

セリアック病は自己免疫疾患の一つであり、グリアジン由来のペプチドに含まれるグルタミンがトランスグルタミナーゼによって脱アミノ化され、腸管内で Human Leukocyte Antigen (HLA) DQ-2、および DQ-8 を持つ樹状細胞と結合することによって免疫反応を誘発することにより、炎症や栄養吸収障害が発生すると考えられている<sup>51)</sup>。一方で、遺伝的に HLA DQ-2、DQ-8 を持つ人が必ずしもセリアック病を発症するわけではなく、セリアック病を発症するメカニズムは、完全には解明されていない。また、日本には現在のところセリアック病の患者は少なく、2006年に最初の報告<sup>52)</sup>がなされたのちも、発症例は多くない。しかしながら、世界的には人口の1%が罹患していると言われていること<sup>53)</sup>、同じく自己免疫

疾患であるアレルギーも、元々少なかった症例が近年になって増加していることから、今後日本でもセリアック病の患者が増える恐れもある。

小麦アレルギーやセリアック病の患者は、症状を抑えるためにグルテンフリーの食生活をする必要がある。このため、これらの患者向けの食事や、食事の製造工程では小麦由来タンパク質が残っていないことを確認する必要がある。小麦タンパク質の検出には、サンドイッチ型の ELISA やイムノクロマトが用いられるが、加熱された食品に含まれるタンパク質は変性、分解されることが知られており、低分子化したタンパク質は必ずしもサンドイッチ型の検出法で検出できるとは限らない。そこで、タンパク質の分解が進んだ発酵製品(ビールなど)では、競合 ELISA 法によりグリアジン由来ペプチドを検出する方法が使用されているが、ELISA 法であるため、簡便さに欠け、現場で使用することが難しい。

グリアジン由来のペプチドを OS-IC で検出できれば、あらゆる食品から簡便に、その場でグリアジンの有無を検査することが可能になると考えられる。

## 5.2 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

本項のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの調製は、株式会社 ITM に委託した。すなわち、こちらから送付した抗原を使用して ITM 社にてマウスへの免疫を行い、腸骨リンパ節、または脾臓をミエローマと融合させ、ハイブリドーマを構築した。クローニングしたハイブリドーマの培養上清に含まれる抗体活性を基にスクリーニングを行い、今後の実験に使用するクローンを選択した。

### 5.2.1 抗ヒスタミン抗体産生ハイブリドーマの作製

ヒスタミンを BSA と 1,4-ベンゾキノンで互いのアミノ基を介して結合<sup>10)</sup>させたものを抗

原とし、マウスの免疫を行った。一次スクリーニングとして、作製したハイブリドーマをヒスタミンとの抗原抗体反応により 40 クローン選択した。また、二次スクリーニングとして構造の似たヒスチジンとの反応の有無を競合法で評価し、10 クローンの候補を選抜した。

### 【試薬】

ヒスタミン (ナカライテスク)、ヒスチジン (ナカライテスク)、また、以下の試薬は ITM 社の試薬を使用。BSA、HRP、96 穴プレート、GIT 培地<sup>54)</sup>、ウサギ抗マウス IgG 抗体、ラット抗マウス Igs 抗体 (抗 IgG1 抗体、抗 IgG2a 抗体、抗 IgG2b 抗体、抗 IgG3 抗体、抗 IgA 抗体)、PBS-T (0.1%Tween 20、137 mM NaCl、3.7 mM KCl、10 mM リン酸、pH 7.4)、o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) 、1 M リン酸

### 【方法】

#### (1) 抗原の準備

ヒスタミンは市販の試薬を購入した。また、ITM 社にてヒスタミンのアミノ基を介し、BSA とコンジュゲート化してマウスの免疫を行った。

#### (2) ハイブリドーマのスクリーニング

ITM にて作製したハイブリドーマを 96 穴プレートで培養し、ELISA で各クローンの培養上清に含まれる抗体活性を評価した。まず、96 穴プレートに 50  $\mu$ L のウサギ抗マウス IgG 抗体(2.5  $\mu$ g/mL)をコートした。そこに、50  $\mu$ L のハイブリドーマの培養上清、または培地を添加し、50  $\mu$ L の HRP 標識したヒスタミンを添加した。HRP 標識には、1,4-ベンゾキノンをを用い、HRP とヒスタミンのアミノ基を用いて標識した。室温に 1 時間静置したのち、PBS-

T で 3 回洗浄し、50  $\mu\text{L}$  の o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) 溶液を添加して室温で 30 分暗所に静置して、492 nm の吸光度を測定した。一次スクリーニングとして、抗原と反応したクローンから 40 ウェルを選択した。

### (3) 競合 ELISA

96 穴プレートに 50  $\mu\text{L}$  のウサギ抗マウス IgG 抗体(2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )をコートした。そこに、50  $\mu\text{L}$  のハイブリドーマの培養上清(5 倍希釈物)を加えた。続いて、50  $\mu\text{L}$  の PBS-T、またはヒスタミン(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、またはヒスチジン(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を加えた。更に、各ウェルに 50  $\mu\text{L}$  の HRP 標識ヒスタミン(1/10000 希釈物)を加え、室温で 30 分振盪した。PBS-T で 3 回洗浄し、50  $\mu\text{L}$  の OPD 溶液を添加して室温で 30 分暗所に静置して、100  $\mu\text{L}$  の 1 M リン酸を加え、492 nm の吸光度を測定した。二次スクリーニングとして、ヒスタミンとの反応が強く、ヒスチジンとの反応が弱い 10 クローンを選抜した。

### (4) 抗体サブクラスの評価

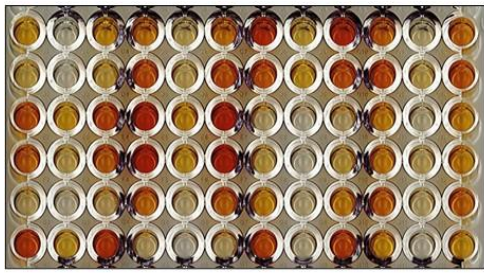
ラット抗マウス Igs 抗体 (抗 IgG1 抗体、抗 IgG2a 抗体、抗 IgG2b 抗体、抗 IgG3 抗体、抗 IgA 抗体) (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )をそれぞれ固相化した 96 穴プレートに 50  $\mu\text{L}$  の培養上清、および 50  $\mu\text{L}$  の HRP 標識ヒスタミン(1/100,000 希釈)加え、室温で 60 分反応させた。PBS-T で 3 回洗浄し、50  $\mu\text{L}$  の OPD 溶液を添加して室温で 30 分暗所に静置して、100  $\mu\text{L}$  の 1 M リン酸を加え、492 nm の吸光度を測定した。

## 【結果・考察】

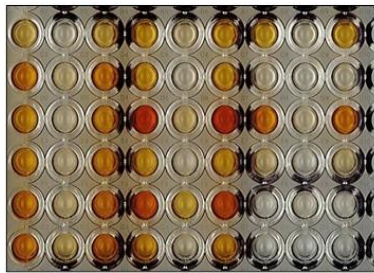
ハイブリドーマの調製、およびスクリーニングの結果から、10 クローンを選択した。選択したクローンは、二次スクリーニングの際の通し番号から、H6、H7、H8、H9、H10、H13、H18、H33、H35、H39 と命名した。抗体を用いてヒスタミンを検出するにあたり、

前提としてヒスタミンを合成するヒスチジンデカルボキシラーゼの基質であり、アミノ酸として自然界に広く存在しているヒスチジンと反応しない抗体を得る必要がある。このため、二次スクリーニングではヒスタミン、ヒスチジンをを用いた競合 ELISA を行った(図 5-1)。ヒスタミンとヒスチジンは構造が似ているため、これらを識別する抗体を得ることは難しいと思われたが、意外にも抗ヒスタミン抗体の活性が高かったハイブリドーマでは、ヒスチジンとの反応を示さないクローンが多かった。

また、低分子抗原に対する抗体は、通常の抗体と比べて可変領域の選択肢が少ないと思われるため、異なるクローンでも同じ抗体を産生している可能性がある。そこで、抗体のサブクラスを確認した結果(図 5-2)から、IgG1 以外のサブクラスの抗体を産生するクローンも選択することで、配列の異なるクローンをより得やすくなるのではと考え、G2a、G2b のサブタイプのクローンも選択した。



B	Hm	Hd	B	Hm	Hd	B	Hm	Hd	B	Hm	Hd
1			7			13			19		
2			8			14			20		
3			9			15			21		
4			10			16			22		
5			11			17			23		
6			12			18			24		



B	Hm	Hd	B	Hm	Hd	B	Hm	Hd
25			31			37		
26			32			38		
27			33			39		
28			34			40		
29			35					
30			36					

図 5-1. 競合法による抗ヒスタミン抗体の評価結果

各プレート写真のウェルは、右上のクローン番号と対応している。また、各クローンの3つのウェルは、それぞれB(バッファー)、Hm(ヒスタミン)、Hd(ヒスチジン)を加えたウェルを示す。

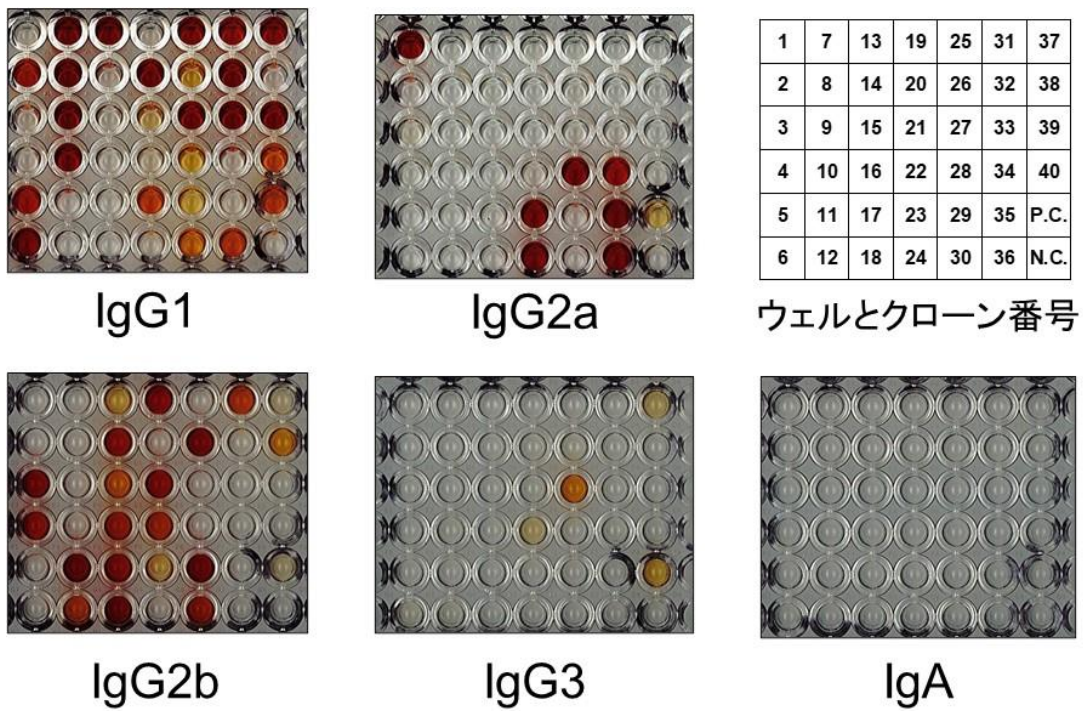


図 5-2. 抗体のサブタイプ評価結果

各プレート写真のウェルは、右上のクローン番号と対応している。また、各写真下のサブタイプは、固定した抗 Igs 抗体が結合するサブタイプを示す。今回選択したクローンはそれぞれ、H7(IgG1)、H9(IgG1)、H18(IgG2b)、H33(IgG1)、H35(IgG2a)、H39(IgG1)であった。

## 5.2.2 抗グリアジン由来ペプチド抗体産生ハイブリドーマの作製

グリアジン由来ペプチド(PQPQLPY)を BSA と結合させ、マウスの免疫を行った。一次スクリーニングとして、作製したハイブリドーマから、抗原ペプチド、およびグリアジンとの抗原抗体反応により 40 クローンを選択した。また、二次スクリーニングとして再度同様の方法で評価し、5 クローンのハイブリドーマを得た。

### 【試薬】

抗原のペプチド、CPQPQLPY、および PQPQLPYC は、GL Biochem から購入した。また、グリアジンは Sigma より購入した。

以下の試薬は ITM 社の試薬を使用した。BSA、HRP、96 穴プレート、GIT 培地<sup>54)</sup>、ウサギ抗マウス IgG 抗体、ラット抗マウス Igs 抗体 (抗 IgG1 抗体、抗 IgG2a 抗体、抗 IgG2b 抗体、抗 IgG3 抗体、抗 IgA 抗体、抗 IgM 抗体)、HRP-ウサギ抗マウス IgG-Fc、PBS-T、OPD、1 M リン酸。

### 【方法】

#### (1) 抗原の準備

グリアジン由来ペプチドについては、文献からセリアック病の原因と考えられるペプチド群に多く見られる配列として、PQPQLPY の 7 残基のペプチドを抗原とした<sup>51)</sup>。ただし、BSA とコンジュゲートさせるために、N 末端、または C 末端にシステイン残基を付与した、CPQPQLPY、PQPQLPYC の二種類のペプチドを合成した。この二種類のペプチドのシステ

イン残基を介して BSA に含まれるアミノ基とコンジュゲート化し、混合してマウスの免疫を行った。

#### (2) HRP 標識抗原を用いた ELISA によるハイブリドーマのスクリーニング

ITM にて調製したハイブリドーマを 96 穴プレートで培養し、ELISA で各クローンの培養上清に含まれる抗体活性を評価した。まず、96 穴プレートに 50  $\mu$ L のウサギ抗マウス IgG 抗体(2.5  $\mu$ g/mL) (ITM)をコートした。そこに、50  $\mu$ L のハイブリドーマの培養上清、または GIT 培地を添加し、50  $\mu$ L の HRP 標識した抗原を添加した。室温に 1 時間静置したのち、PBS-T で 3 回洗浄し、50  $\mu$ L の OPD 溶液を添加して室温で 30 分暗所に静置して、100  $\mu$ L の 1 M リン酸を加え、492 nm の吸光度を測定した。

#### (3) 抗原固相化 ELISA によるハイブリドーマのスクリーニング

96 穴プレートに 50  $\mu$ L の CPQPQLPY (1  $\mu$ g/mL)、PQPQLPYC (1  $\mu$ g/mL)、グリアジン(5  $\mu$ g/mL)のいずれかをそれぞれ加え、室温で一晩固相化した。ウェルをブロッキング後、PBS-T で 3 回洗浄し、50  $\mu$ L の培養上清を加え、室温で 1 時間静置した。PBS-T で 3 回洗浄し、50  $\mu$ L の HRP-ウサギ抗マウス IgG-Fc (1/5000 希釈)を加え、室温で 30 分静置した。PBS-T で 3 回洗浄し、50  $\mu$ L の OPD 溶液を添加して室温で 30 分暗所に静置して、100  $\mu$ L の 1 M リン酸を加え、492 nm の吸光度を測定した。

(2)、(3)の結果より、一次スクリーニングとして 40 クローンを選抜した。また、選抜した 40 クローンに対して再度(2)、(3)の ELISA を行い、二次スクリーニングとして 6 クローンを選択した。

#### (4) 抗体サブクラスの評価

96 穴プレートに 50  $\mu$ L のグリアジン(5  $\mu$ g/mL)をそれぞれ加え、室温で一晩固相化した。ウェルをブロッキング後、PBS-T で 3 回洗浄し、50  $\mu$ L の培養上清を加え、室温で 1 時間

静置した。PBS-T で 3 回洗浄し、50  $\mu$ L の HRP-ラット抗マウス Igs (抗 IgG1 抗体、抗 IgG2a 抗体、抗 IgG2b 抗体、抗 IgG3 抗体、抗 IgM 抗体、抗 IgA 抗体) (1/1000 希釈) を加え、室温で 30 分静置した。PBS-T で 3 回洗浄し、50  $\mu$ L の OPD 溶液を添加して室温で 30 分暗所に静置して、100  $\mu$ L の 1 M リン酸を加え、492 nm の吸光度を測定した。

#### 【結果・考察】

ハイブリドーマの調製、およびスクリーニングの結果から、6 クローンを選択した(図 5-3)。しかし、1 クローンについては培養中に死滅してしまったため、最終的には 5 クローンを ITM より受領した。各クローンは、二次スクリーニングに使用した 40 クローンに付与した通し番号から、GL7、GL18、GL25、GL31、GL38 と命名した。今回得られたハイブリドーマのうち、GL25、GL38 は小麦由来のグリアジン全長タンパクとも強く反応が見られるため、抗原とした 7 残基(PQPQLPY)を基に小麦を高感度に検出することが期待される。ただし、ここまではハイブリドーマの培養上清での評価であるため、抗体活性のほかに、ハイブリドーマの細胞数や抗体産生量などの要因で ELISA の反応が強くなっている可能性もある。各抗体の抗原との親和性を評価するためには、精製した抗体を用いて活性評価を行う必要がある。



### 5.3 モノクローナル抗体の活性、特異性評価

スクリーニングしたハイブリドーマの抗体の評価を行った。抗ヒスタミン抗体については、ハイブリドーマの培養上清を用いてヒスチジンとの特異性を評価した。また、抗グリアジン由来ペプチド抗体については、ハイブリドーマの培養上清と精製した抗体を用いて、特異性と抗体活性の評価を行った。

#### 5.3.1 抗ヒスタミン抗体の競合法 ELISA による特異性評価

先のスクリーニングで選抜した 10 株のクローンについて、ハイブリドーマの培養上清を用いて、競合 ELISA による評価を実施した。実験結果より、10 クローンを 6 クローンに絞り込んで、今後の実験に使用するハイブリドーマとした。

#### 【試薬】

使用した試薬は以下の通り。

ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Goat Anti-Mouse IgG's (Immunochromatography grade))(ニッポンエンジニアリング)、HRP 標識ヒスタミン(ITM)、スキムミルク(森永乳業)、ヒスタミン(ナカライテスク)、ヒスチジン(ナカライテスク)、その他の試薬は、富士フイルム和光純薬より購入した。

#### 【方法】

96 穴プレート各ウェルに 100  $\mu\text{L}$  のヤギ抗マウス IgG 抗体(1/1000 希釈物)を加え、4 $^{\circ}\text{C}$  で一晩固相化した。液を除き、300  $\mu\text{L}$  の 2%スキムミルク含有 PBS を加え、常温で 2 時間ブロッキングした。PBS-T でプレートを 3 回洗浄し、ハイブリドーマの培養上清を 50  $\mu\text{L}$  ずつ加え、室温で 1 時間振盪した。PBS-T でプレートを 5 回洗浄し、50  $\mu\text{L}$  のヒスタミン(10、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、またはヒスチジン(10、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を加え、室温で 1 時間振盪した。PBS-T で 5 回洗浄し、50  $\mu\text{L}$  の HRP 標識ヒスタミン(1/100,000 希釈物)を加え、室温で 1 時間振盪した。PBS-T で 5 回洗浄し、50  $\mu\text{L}$  の 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)発色液を添加し、室温で 15 分振盪して反応させた後、100  $\mu\text{L}$  の 1 N 塩酸を加えて 450 nm の吸光度を測定した。

#### 【結果・考察】

競合 ELISA の結果から、抗ヒスタミン抗体産生ハイブリドーマ 10 クローンから、6 クローンを選抜した(図 5-4)。ヒスチジンで競合が起こらず、かつヒスタミンで競合が起こっているクローンとして、H7、H9、H18、H33、H25、H39 を選抜した。また、今回の競合 ELISA では、各ウェルの発色が弱いように感じられた。この結果は、手順に洗浄が多すぎたことによる恐れがある。すなわち、低分子抗原と抗体の反応では、通常の抗原抗体反応よりも、抗原と抗体の接触面積が小さいため、洗浄工程で特異的な抗原抗体反応まで洗い流される可能性がある。今回の実験では、ネガティブコントロールにおけるバックグラウンドも小さいため、執拗に洗浄を行う必要性は小さかったと思われる。

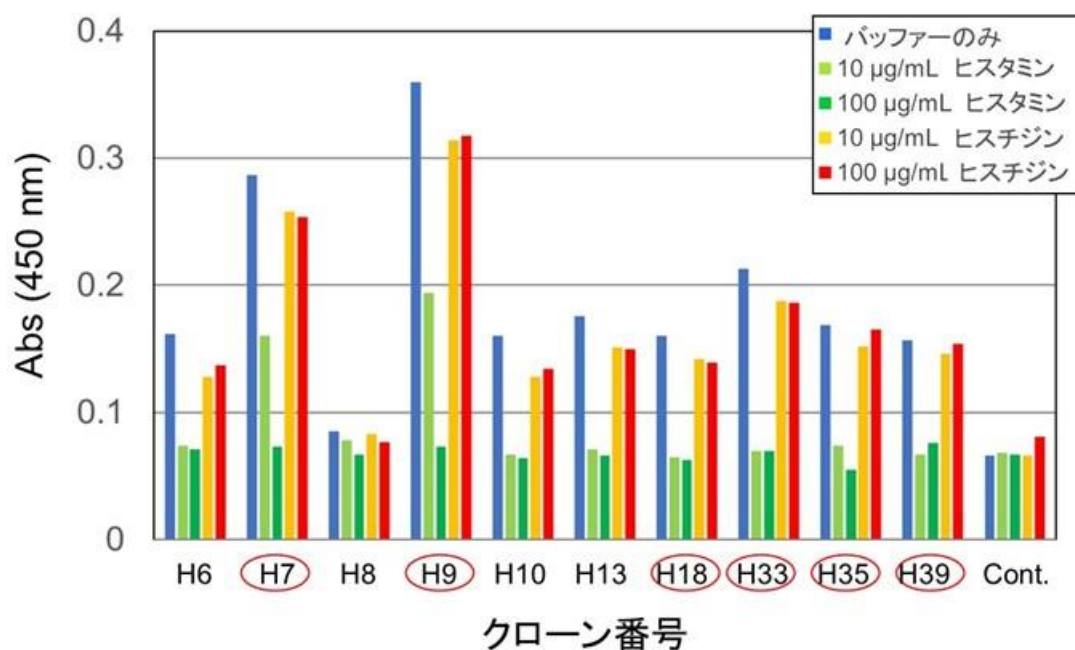


図 5-4. 競合法による抗ヒスタミン抗体の評価結果

縦軸は、ELISA における波長 450 nm の吸光度。丸を付けたクローンを選択した。

### 5.3.2 抗グリアジン由来ペプチド抗体のウェスタンブロットによる特異性評価

小麦や他の穀物からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットを用いて抗グリアジン由来ペプチド抗体の特異性を評価した。また、小麦との反応について、小麦の銘柄ごとの反応についても評価した。

#### 【試薬】

抗グリアジン由来ペプチド抗体産生ハイブリドーマの培養上清(GL7、GL18、GL25、GL31、GL38)。トランスブロット® Turbo™ ミニ PVDF 転写パック(Bio-Rad Laboratories)、スキム

ミルク(森永乳業)、Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)、その他の試薬は富士フイルム和光純薬より購入した。

## 【方法】

小麦、ライ麦、大麦、ソバの種子を、それぞれ液体窒素で冷却しながら乳鉢と乳棒で粉碎した。各穀物の粉末 0.05 g にそれぞれ 1 mL の抽出バッファー(0.6% SDS、0.1 M 亜硫酸ナトリウム、0.1 M Tris-HCl、pH 8.0)を加え、室温で一晩転倒攪拌し、タンパク質を抽出した。抽出液を SDS-PAGE 用の Loading dye と混合し、100°C で 5 分加熱し、Super Sep Ace 5-20% 13well に 20  $\mu$ L/well アプライして電気泳動した。泳動後のゲルから、PVDF 膜にタンパク質をブロッティングし、5%スキムミルク含有 TBS-T (0.1% Tween 20、500 mM NaCl、20 mM Tris)に浸漬して 4°C で一晩ブロッッキングを行った。メンブレンをビニールに挟み、一次抗体液として各ハイブリドーマの培養上清 7 mL を加えてヒートシールでパックし、室温で一時間振盪した。その後、TBS-T に浸漬して室温で 10 分間振盪し、洗浄した。TBS-T を交換して、計 3 回洗浄を行った。再度メンブレンをビニールに挟み、5%スキムミルク含有 TBS-T で 1/1000 希釈した HRP-Goat anti-Mouse IgG (H+L)を 7 mL 加え、ヒートシールでパックし、室温で一時間振盪した。再度、TBS-T で 3 回洗浄し、Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents の溶液 A と溶液 B を等量混合し、メンブレンに加えたのち、Amersham Imager 680 を用いて HRP のシグナルを検出した。

また、国内産麦、外国産麦の各銘柄(表 5-1)に対する反応性を評価した。ウェスタンブロットの手法については上記の通りだが、一次抗体液として 1 mL のハイブリドーマの培養上清に、9 mL の 5%スキムミルク含有 TBS-T を加えたものを使用した。

## 【結果・考察】

小麦、ライ麦、大麦、ソバを用いたウェスタンブロットの結果、全てのクローンにおいて小麦、ライ麦に対するシグナルが見られた(図 5-5)。ライ麦には、小麦と同様にグリアジンが含まれるため、抗体と反応したと考えられる。一方で、大麦は、GL7、GL18 で弱い反応が見られた。大麦にグリアジンは存在しないが、主要なたんぱく質としてホルデインが含まれる<sup>55)</sup>。大麦のホルデインにはBホルデイン(GenBank: AAZ76368.1)、Cホルデイン(GenBank: AAA92333.1)、Dホルデイン(GenBank: BAA11642.1)などが知られており、いずれも今回抗原としたPQPQLPYの配列を含まない。しかし、グリアジンと同様にグルタミンやプロリンを多く含み、Bホルデイン、CホルデインにはPQPQの配列が含まれるなど、一部抗原配列と似たアミノ酸配列を持っており、このような個所がGL7、GL18と反応した可能性がある。また、GL38はわずかにソバと反応しているが、ソバにもグリアジンは含まれておらず、小麦のシグナルと比べて非常に弱いシグナルであるため、非特異反応の原因タンパク質は不明であるものの、小麦の検出の際には非特異反応に注意する必要がある。

また、現在日本で流通する主要な小麦の銘柄に対してウェスタンブロットを行った結果、全ての抗体で今回評価した小麦の銘柄すべてに反応することを確認した(図 5-6)。グリアジンのシグナルの位置や強さは銘柄によって異なっていた。特に、ゲノムが6倍体である普通小麦と、4倍体であるデュラム小麦では、25~37 kDaのシグナルパターンが異なっていた<sup>56)</sup>。一方で、ASWでは4つのレーンのうち3つだけで37 kDaほどのシグナルが見られた。ASWなどの外国産の小麦は、複数の品種を混合してタンパク質の量などを調整し、一つの銘柄としている。このため、同じ銘柄でも同じ品種とは限らず、今回実施したようなウェスタンブロットのシグナルパターンから銘柄を判定することは難しい可能性と考えられた。一方で、国内産小麦は、銘柄と品種は同一であるため、グリアジンのシグナルパターンから、ある程度の銘柄の識別が可能になるかもしれない。

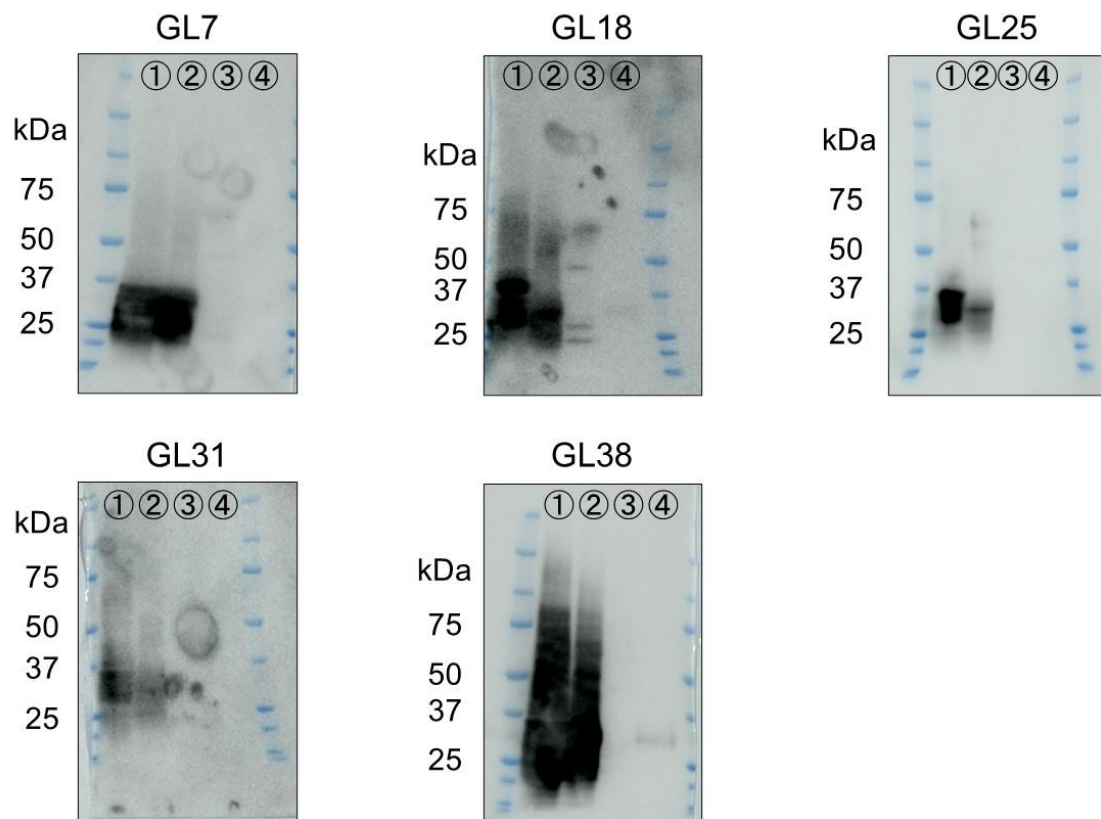


図 5-5. 抗グリアジン由来ペプチド抗体のウェスタンブロットによる評価

各レーンは、①小麦、②ライ麦、③大麦、④ソバ。写真左の数字はタンパク質マーカーの分子量。

表 5-1. ウェスタンブロットに用いた小麦銘柄

1	国内産麦	強力小麦	農林小麦1号
2			せんきらら
3			キタノカオリ
4			ゆめちから
5			春よ恋
6			キタホナミ
7			ミナミノカオリ
8		薄～中力小麦	ふくさやか
9			にしのやわら
10			みなみのやわら
11		デュラム小麦	セトデュール
12	外国産麦	Dark Northern Spring (DNS) アメリカ産	
13			
14			
15		Australian Standard White (ASW) オーストリア産	
16			
17			
18			
19		デュラム小麦	トルコ産
20			
21		デュラム小麦	カナダ産
22			
23			

外国産麦の複数レーン泳動したものは、ロット(輸入時に使用された船)の異なる小麦を使用した。

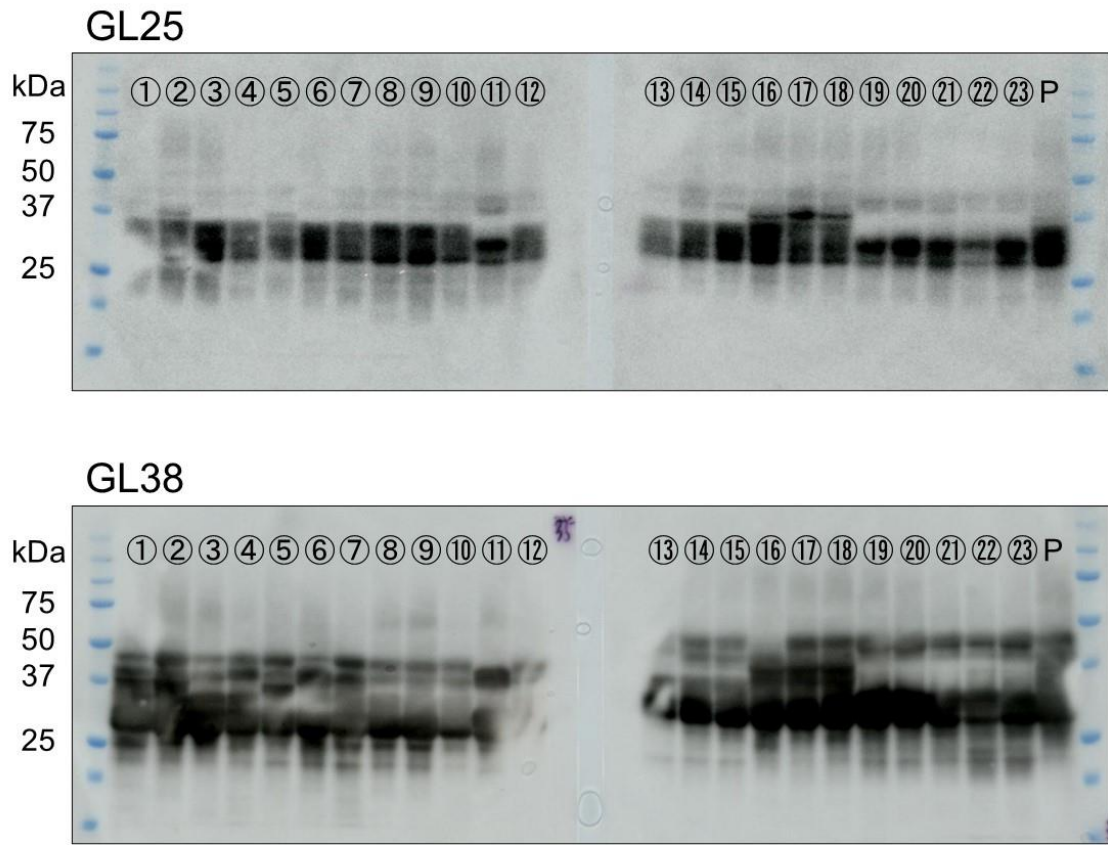


図 5-6. 小麦銘柄に対する抗グリアジン由来ペプチド抗体の反応

①～⑳のレーンに泳動した小麦銘柄は、表 5-1 の通り。P はポジティブコントロールで、予備実験ですべての抗体と反応することを確認した小麦抽出液を用いた。

### 5.3.3 抗グリアジン由来ペプチド抗体の ELISA による活性評価

先のスクリーニングで選抜した抗グリアジン由来ペプチド抗体について、マウス腹水から精製した抗体の活性を ELISA で評価した。

## 【試薬】

抗グリアジン由来ペプチド抗体(GL7、GL18、GL25、GL31、GL38)、HRP 標識グリアジン由来ペプチド(ITM)、その他の試薬は、5.3.1 と同様。

## 【方法】

96 穴プレートに初発濃度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の抗グリアジン由来ペプチド抗体を、2 倍ずつ段階希釈しながら液量を 100  $\mu\text{L}$  として添加し、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩固相化した。ウェルの液を捨て、300  $\mu\text{L}$  の 3%スキムミルク含有 PBS を加え、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩ブロッキングを行った。プレートを PBS-T で 3 回洗浄し、100  $\mu\text{L}$  の HRP 標識グリアジン由来ペプチド(HRP 標識 PQQQLPYC(1/1000)、または HRP 標識 CPQQQLPY(1/1000))を加え、室温で 1 時間静置した。プレートを PBS-T で 5 回洗浄し、100  $\mu\text{L}$  の TMB 溶液を加え、室温で 15 分振盪し、650 nm の吸光度を測定した。

## 【結果・考察】

実験の結果、抗体のクローンによって大きく抗体活性が異なっていた(図 5-7)。HRP 標識が N 末端側、または C 末端側に付与されたグリアジン由来ペプチドの両方に対して反応を示したのは、GL25 と GL38 であった。これら 2 クローンは、先のスクリーニングの際にもグリアジン全長タンパク質に対しても強い活性を示していたことから、グリアジンの PQQQLPY というアミノ酸配列をエピトープとして強く認識していると考えられる。

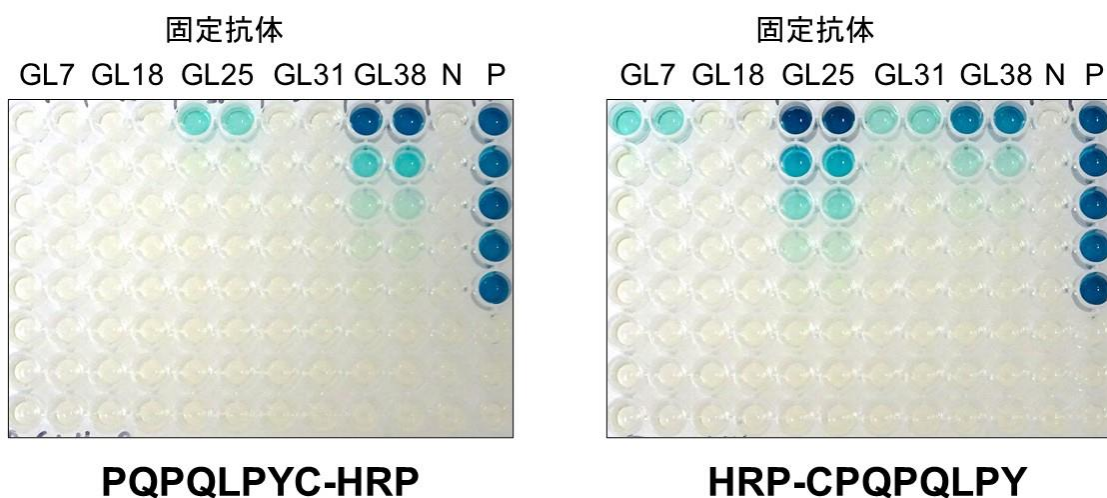


図 5-7. 抗グリアジン由来ペプチド抗体のグリアジンとの反応

写真の N はネガティブコントロール、P はポジティブコントロールを示す。n=2。

#### 5.3.4 抗グリアジン由来ペプチド抗体の SPR による親和性評価

表面プラズモン共鳴 (SPR) 原理に基づく相互作用検出装置 (Reichert 社 SR7000DC)を用いて、抗グリアジン由来ペプチド抗体とグリアジンの親和性を評価した。

##### 【試薬】

抗グリアジン由来ペプチド抗体(GL7、GL18、GL25、GL31、GL38)、500,000 Da Carboxymethyl Dextran (Reichert)、HEPES (同仁化学研究所)、EDTA・2Na (同仁化学研究所)、0.05% Surfactant P20 (GE Healthcare)、EDC (GE Healthcare)、NHS (GE Healthcare)。その他の試薬は富士フィルム和光純薬より購入した。

また、SPR に用いたバッファーは以下の通り。HBS バッファー(20 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA・2Na を調製し、pH7.4 に調整後脱気し、終濃度 0.05%の Surfactant P20 を添加)、固定バッファー(10 mM 酢酸・酢酸 Na、pH 5.0)、2 M Tris-HCl (pH 8.0)、解離バッファー(10 mM グリシン-HCl、pH 1.5)。

#### 【方法】

まず、SPR シグナルが安定するまで、500,000 Da Carboxymethyl Dextran センサチップに 20  $\mu$ L/分の HBS バッファーを流した。1.15%の EDC と 7.5%の NHS を等量混合し、20  $\mu$ L/分の流速で 10 分流し、センサチップのカルボキシル基を活性化した。固定バッファーに溶解したグリアジン(2 mg/mL)を 0.2  $\mu$ m のフィルターでろ過して調製したグリアジン溶液を、流速 10  $\mu$ L/分で 20 分加え、グリアジンをセンサチップ上に固定した。流速を 20  $\mu$ L/分に戻し、2 M Tris-HCl (pH 8.0)を 10 分流し、余剰の活性化されたカルボキシル基と反応させた。

抗体を HBS バッファーで希釈し、200 nM に調製した。それぞれの抗体液を、20  $\mu$ L/分の流速で 10 分間センサチップ上に流し、次いで HBS バッファーを 20  $\mu$ L/分の流速で 15 分間センサチップの洗浄を行い、この間 SPR シグナルを測定した。その後、解離バッファーを 20  $\mu$ L/分で 10 分流し、抗体抗原結合を解離させ、センサチップを再生した。その後、10 分間 HBS バッファーを流して平衡化させた。

また、SPR シグナルが確認された抗体(GL38)について、100、50、25、12.5 nM の抗体液を調製し、それぞれの SPR シグナルを測定した。Scrubber2 (BioLogic software)を用いて SPR シグナルから結合解離定数を計算した。

#### 【結果・考察】

200 nM の抗体液を、グリアジンを固定したセンサチップ上に流加したところ、SPR シグナルを生じたのは GL38 のみであった(図 5-7)。GL38 の結合や、解離液の添加によって、センサチップ上のグリアジンが抗体と反応できなくなった可能性が考えられたため、全ての抗体で測定を行った後、再度 GL38 を流加したところ、一回目と同等の SPR シグナルを生じた。この結果から、GL38 以外の抗体が反応を示さなかったのは、センサチップ上のグリアジンの異常によるものではないと思われた。今回の SPR では、これまでのウェスタンブロットや ELISA と異なり、抗原のグリアジンはアミノ基を介した共有結合でセンサチップ上に固定されており、固定方法の違いがセンサチップ上での GL38 以外の抗体との結合に影響した可能性がある。このため、違う官能基を用いたカップリング法でセンサチップ上にグリアジンを固定することにより、GL38 以外の抗体とグリアジンの SPR シグナルを得ることができる可能性がある。

また、GL38 について抗体濃度を 100、50、25、12.5 nM として SPR シグナルを測定し、Scrubber2 を用いて結合解離定数を計算した(図 5-8)。その結果、 $K_D$  値は 7.2 nM であり、イムノクロマト用抗体としては、親和性が十分と思われた。また、 $k_a$  値は  $4.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であった。イムノクロマトでは、ELISA やウェスタンブロットと比較して、抗原と抗体の反応時間が短い。このため、より  $k_a$  値が大きい抗体がイムノクロマトでの抗原の検出に有効であると考えられる。筆者らが過去にソバのアレルゲンタンパク質である BWp16 をイムノクロマトで検出するために用いた抗体の  $k_a$  値は  $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  程度であり、GL38 と同等であった。

一方で、今回 SPR に供した抗体は全長抗体であるため、抗原結合部位が 1 分子につき 2 か所存在する。このため、2 か所の抗原結合部位が両方抗原と結合することにより、高い結合速度や親和性を示している可能性もある。オープンサンドイッチの反応系では 1 か所の抗原結合部位で抗原を検出するため、各抗体の Fab や Fv と抗原との親和性が、実際の OS-IC での反応に近い数値であると思われる。本研究で用いた抗 BGP-C7 抗体である R4A10 の Fv としての抗原との  $K_D$  値は 17.2 nM、 $k_a$  値は  $4.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であった<sup>26)</sup>。よって、GL38 抗

体の Fab、または Fv としたときの抗原との  $K_D$  値、 $k_a$  値が R4A10 と同等以上であれば、BGP-C7 の OS-IC 以上の検出感度を期待できる。

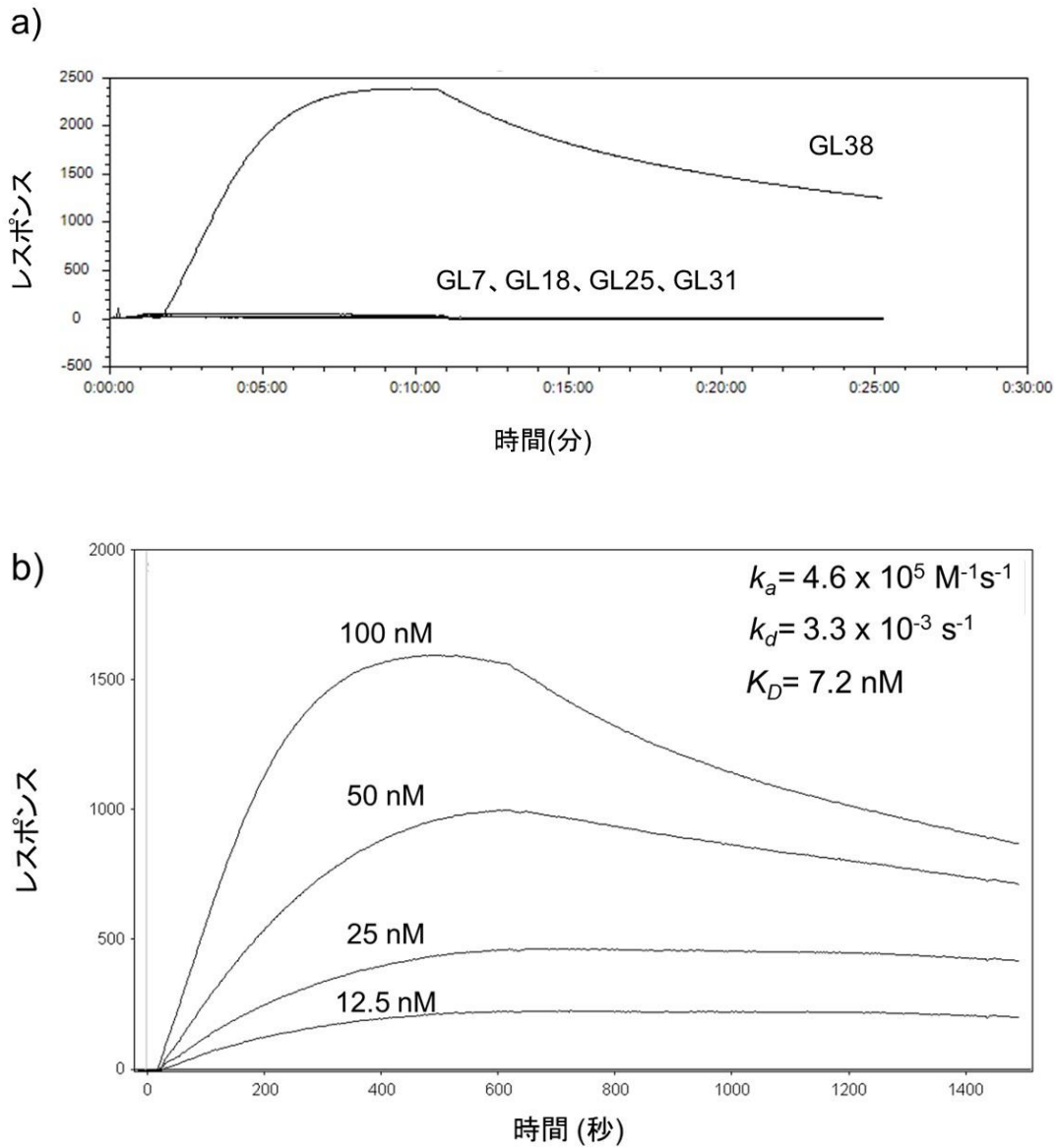


図 5-8. SPR による抗グリアジン由来ペプチド抗体の活性評価

a) 抗グリアジン由来ペプチド抗体(200 nM)の各クローンの評価。b) 抗グリアジン由来抗体 GL38 の結合解離定数の測定結果。

## 5.4 モノクローナル抗体の遺伝子解析

各モノクローナル抗体の遺伝子解析を行った。

### 【試薬】

BM condimed H1 (Roche Life Science)、25 cm<sup>2</sup>、75 cm<sup>2</sup> フラスコ(Thermo Fisher Scientific)、TRIzol (Sigma)、SuperScript III (Thermo Fisher Scientific)、*ExTaq* DNA polymerase (タカラバイオ)、KOD plus DNA polymerase (東洋紡)、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (プロメガ)、Mouse Ig-Primer Set (Merck)、その他の試薬は富士フイルム和光純薬より購入した。

### 【方法】

#### (1) ハイブリドーマの培養

ITM 社より受領したハイブリドーマを GIT 培地にて培養した。

まず、25 cm<sup>2</sup> フラスコに 10 mL の GIT 培地(1/10 量の BM condimed H1 添加)を加え、37°C に保温した。37°C の温浴でバイアルに入ったハイブリドーマを加温融解し、12 mL の GIT 培地(BM condimed H1 添加無し)を入れておいた 15 mL 遠心管にバイアルの内容物全量を加え、500xg、25°C、5 分遠心し、上清を除去した。25 cm<sup>2</sup> フラスコに入れておいた GIT 培地 2 mL を遠心管のハイブリドーマに加えて分散させ、25 cm<sup>2</sup> フラスコに戻した。37°C の CO<sub>2</sub> インキュベータでコンフルエントになるまで培養し、20 mL の GIT 培地(サプリメント添加)を加えた 75 cm<sup>2</sup> フラスコに継代、培養した。

#### (2) RNA の抽出

75 cm<sup>2</sup> フラスコにコンフルエントまで培養したハイブリドーマを 15 mL 遠心管に集め、500xg、25°C、5 分の遠心後、上清を除去した。タッピングして沈殿をほぐし、2 mL の TRIzol を加え、室温で 5 分静置してハイブリドーマを溶解させた後、1.5 mL チューブに 1 mL ずつ分注した。各チューブに 0.2 mL のクロロフォルムを加え、30 秒転倒攪拌した。12,000xg、4°C、15 分遠心し、上層(水相)を別の 1.5 mL チューブに回収した。各チューブに 0.5 mL のイソプロパノールを加え、ボルテックスで攪拌し、10 分静置した。12,000xg、4°C、15 分遠心後、上清を除去したのち、沈殿に 1 mL の 70%エタノールを加えてボルテックスで攪拌して、7,500xg、4°C、5 分遠心し、上清を除去した。10 分程度沈殿を風乾させ、各チューブに 10 µL の RNase free water を加え、ピペッティングしたのち、ヒートブロックを用いて 60°C で 10 分加熱し、RNA を溶解させた。吸光度から RNA の濃度を求め、実験に用いるまで 80°C で保存した。

### (3) cDNA の合成

まず cDNA を合成するための反応液を調製した。反応液は、2 µg の RNA、0.5 µL の 100 mM Oligo dT(20)、4 µL の 2.5 µM each dNTPs に、全量が 13 µL となるように RNase free water を加えた。反応液を 65°C で 5 分インキュベートした後、反応液に 4 µL の 5xFirst strand buffer、1 µL の 0.1 M DTT、1 µL の RNase OUT、1 µL の Super Script III RT を加え、25°C で 5 分、50°C で 60 分、70°C で 15 分インキュベートしたのち、80 µL の RNase free water を加えたものを、cDNA 溶液とした。

### (4) PCR による抗体遺伝子の増幅とシーケンス反応

Mouse Ig-primer set を用いて、抗体可変領域の遺伝子の増幅を試みた。まず、それぞれのハイブリドーマの cDNA がどのプライマーセットで増幅されるかを評価した。PCR 反応液として、1 µL の cDNA、2.5 µL の 10xEx Taq buffer、2 µL の 2.5 µM each dNTPs、0.5 µL の 10 µM 3'プライマー、0.5 µL の 10 µM 5'プライマー、18 µL の超純水、0.5 µL の Ex Taq

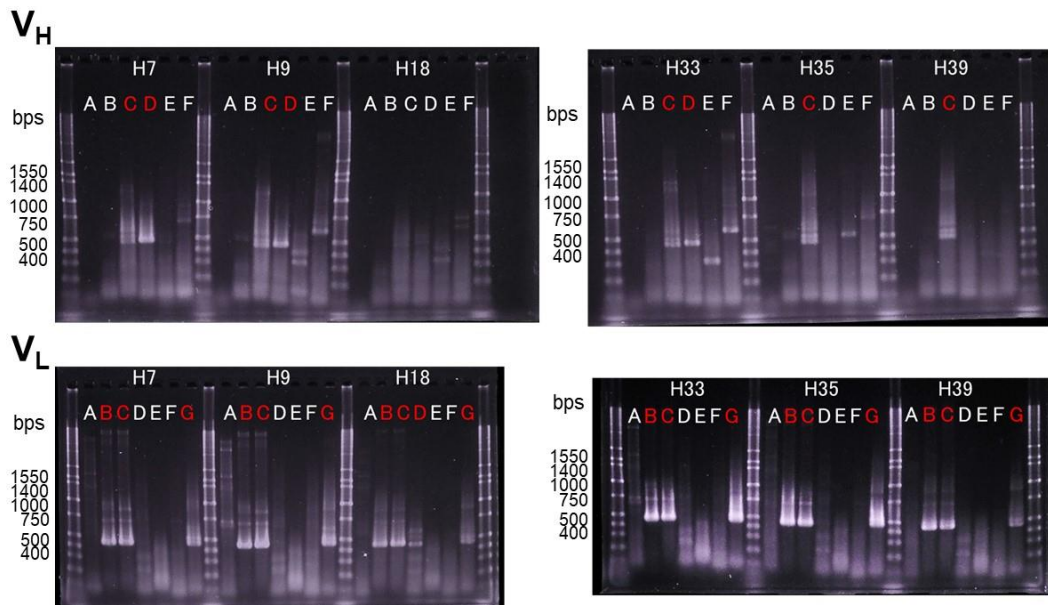
DNA polymerase を加えた。5'プライマーは、V<sub>H</sub>については A~F の 6 種、V<sub>L</sub>については A~G の 7 種について、それぞれ PCR 反応を行った。PCR 反応は、94°C3 分の熱変性後、94°C1 分、60°C1 分、72°C1 分を 35 サイクル行い、反応後は 4°C で保存した。各反応液に 3 μL ずつ 10x Loading dye を加えて混合後、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、450 bp の増幅断片の有無を確認した。

450 bp の増幅断片が見られた PCR 反応液について、DNA ポリメラーゼを KOD plus に置き換えて、再度 PCR 反応を行ったのち、アガロースゲルに電気泳動した DNA 増幅断片を切り出し、Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (プロメガ)を用いて DNA を精製した。

#### 【結果・考察】

抗体産生ハイブリドーマの mRNA を抽出し、cDNA の合成、抗体遺伝子の増幅を試みた (図 5-9)。しかし、いくつかのクローンでは、抗体遺伝子の増幅が見られなかった。また、抗体によっては複数のプライマーセットで、450 bp 付近の増幅断片が見られた。これら増幅断片のシーケンス解析において、終止コドンを含まない配列が目的の抗体の配列であると考えられる。現在、シーケンスの解析を進めているが、抗体遺伝子の増幅が見られなかったハイブリドーマや、全ての増幅断片が終止コドンを含んでいたハイブリドーマでは、再度 cDNA の調製を行う必要がある。

a) 抗ヒスタミン抗体



b) 抗グリアジン由来ペプチド抗体

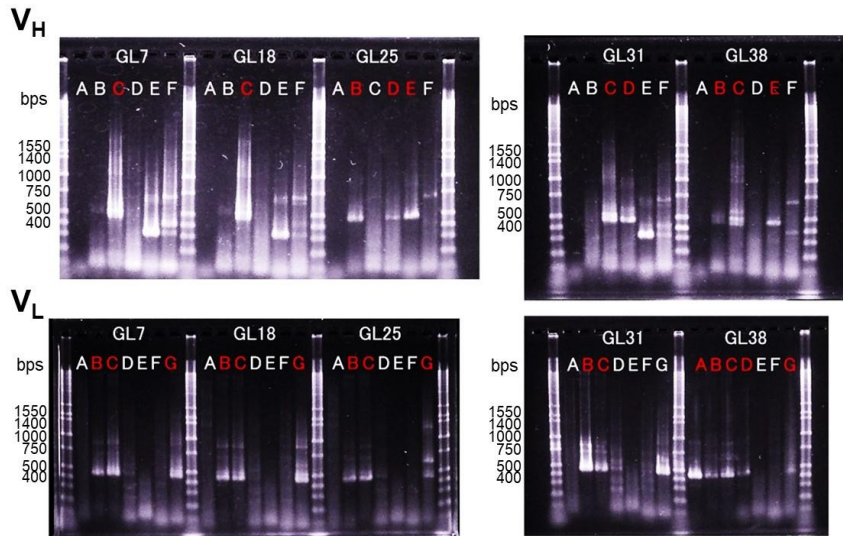


図 5-9. ハイブリドーマ cDNA を鋳型とした抗体遺伝子増幅 PCR の結果

アガロースゲルのレーンのアルファベットは、PCR に使用した 3'プライマーの種類を示す。抗体可変領域の増幅断片はおよそ 450 bps。

## 5.5 小括

本章では、BGP-C7に続く低分子抗原として、ヒスタミン、及びグリアジン由来の7残基のペプチドを検出する OS-IC の構築を目指して、抗体を取得して抗原との反応を評価し、遺伝子解析を進めた。

抗ヒスタミン抗体は、類似した構造を持つヒスチジンとヒスタミンを識別できる抗体を得ることができた。また、抗グリアジン抗体については、今回取得した抗体がウェスタンブロットにおいては、グリアジンを有する小麦とライ麦に対して全て反応していることを確認できた。さらに、全ての抗体で、現在日本で流通している主要な小麦の銘柄を検出できることが分かった。一方で、いくつかの抗体は大麦やソバとの交差性を示しており、偽陽性反応に注意して開発を進めていく必要がある。また、ELISA や SPR では反応しない抗体もあり、活性の評価方法については今後も検討する必要がある。特に SPR では、グリアジンのアミノ基を利用してセンサチップに固定したところ、GL38 のみが反応を示した。GL38 とグリアジンと  $K_D$  値は、7.2 nM であった。ELISA やウェスタンブロットでのシグナルの強さを比較すると、その他の抗体は、GL38 よりもグリアジンに対する親和性が低い可能性が考えられる。また、GL38 は今回実施したすべての評価系でグリアジンと反応しており、今後の OS-IC の開発にも有用であると考えられる。

抗体遺伝子の解析では、ハイブリドーマからの抗体産生があるにもかかわらず、抗体遺伝子を得ることのできなかつたクローンも存在した。有望な抗体については、OS-IC で検出するための組み替え体の調製について、汎用性の高い方法の確立も重要であると考えている。例えば、組み換え発現時の安定発現や、標識を行いやすいタグ、免疫クロマトにした後の安定性などに適した手法が確立されれば、より効率的な OS-IC の作製が可能となる。

## 第 6 章 結論

本研究では、競合法に代わる低分子抗原の迅速、簡便な検出法として、BGP-C7を検出する OS-IC の開発を行った。また、BGP-C7 に続く新しい低分子抗原を検出する OS-IC の開発に向けて、抗体の調製と活性評価、遺伝子解析を進めた。

第2章では、金コロイド標識による OS-IC の検討を行った。しかし、メンブレンに固定した MBP-V<sub>L</sub> と BSA でブロッキングした金コロイドの間で非特異的な反応が生じていたこと、また、ブロッキング剤をカゼインに変更して、非特異的な反応を抑えた際にも、抗原である BGP-C7 の添加によるテストラインの発色強化は見られなかったことから、金コロイド標識による BGP-C7 検出用 OS-IC の確立は困難であると考えられた。ただし、今回非特異的な反応が見られたのは抗 BGP-C7 抗体を用いた系であり、他の抗体を用いた場合では、金コロイド標識による非特異反応にも違いがある可能性もある。現在検討を進めているヒスタミンや、グリアジン由来の 7 残基ペプチドを検出する OS-IC の開発においても、金コロイドでの評価は行っていきたい。

第3章では、AP 標識による OS-IC の検討を行った。AP 標識では、金コロイド標識とは異なり、100 ng/mL 以上では BGP-C7 濃度に応じてテストラインの発色が強くなっており、OS-IC の開発が可能であることを示唆した。一方で、BGP-C7 を加えていない系でもわずかに非特異的なテストラインの発色が見られ、目視だけで結果を判定する OS-IC としての利用は難しいと思われた。非特異反応の低減化や BGP-C7 添加によるテストラインの発色強化を目的に、展開液の検討を行ったが、改善することはできなかった。今回の実験結果から、流速の速いメンブレンを用いて試験を行うことで、バックグラウンドと非特異的なテストラインの発色を抑えることができる可能性があり、今後 AP による検出系を再度検討する際には、展開液の展開速度も評価する価値があると考えられる。

第4章では、着色セルロース粒子標識による OS-IC を検討した。表面電荷を利用して標識を行った系では、金コロイド同様に非特異的な反応が見られた。一方、粒子表面のカルボキシル基を利用して共有結合で標識を行った系では、非特異反応が検出されず、かつ BGP-

C7 添加濃度依存的なテストラインの発色を示した。この反応系では、10 ng/mL 以上の BGP-C7 を検出できることを確認した。本実験より、低分子抗原を非競合的に検出する OS-IC の開発が可能であることが示された。

第 5 章では、BGP-C7 に続く新しい低分子抗原として、ヒスタミンとグリアジン由来のペプチド(PQPQLPY)を選定し、OS-IC 開発に向けた抗体の取得を行った。その結果、抗ヒスタミン抗体においては、ヒスタミンと構造の類似したヒスチジンとの識別が可能である抗体を得た。また、抗グリアジン抗体においては、小麦と、同じくグリアジンを含むライ麦を検出できた。その一方、グリアジンを持たない大麦やソバに対する反応性を示す抗体も見られた。抗グリアジン抗体の GL38 については、グリアジンとの親和性を測定した結果、 $K_D$  値が 7.2 nM だった。今後は、抗体遺伝子から  $V_H$ 、 $V_L$  領域を調製し、OS-IC の開発を進めていきたい。

OS-IC は低分子化合物を非競合的に検出できる技術であり、簡便、迅速に、その場で検査を行うことができる。加えて、競合法 IC と異なり、低濃度の抗原に対しても目視だけで陽性と陰性の識別ができる。これまでの分析技術では、専用の検査設備や高度な専門知識が必要であった低分子化合物の検出を、サンプル液を加えるだけの簡便さで迅速に行うことのできる OS-IC は、今後、低分子毒素や抗生物質、アレルゲンペプチドなど、様々な分野での活用できると期待される。

## 発表状況

Harada, Y., Ohmuro-Matsuyama, Y., Tsuna, M., Ueda, H., An Open Sandwich Immunochromatography for Non-competitive Detection of Small Antigens. *Anal Sci* 2020, doi:10.2116/analsci.20SCP06.

## 謝辞

本研究の実施にあたり、東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所 上田・北口研究室の上田宏教授より多大な協力、助言をいただきました。また、同研究室の北口哲也准教授にも、多くの助言をいただきました。大室有紀博士には、貴重な Trx-V<sub>H</sub>、MBP-V<sub>L</sub> のタンパクや発現用ベクターをいただきました。上田・北口研究室の学生も皆さんからも、多くの助言をいただきました。

また、日本製粉株式会社 中央研究所 フードリサーチセンター 基礎技術研究所の綱 美香博士、福島 香織氏、杉山 茂大博士にも、多くの協力をいただきました。この場を借りて、皆様にお礼を申し上げます。

## 文献

1. Kozel, T. R., Burnham-Marusich, A. R., Point-of-Care Testing for Infectious Diseases: Past, Present, and Future. *J Clin Microbiol* **2017**, *55* (8), 2313-2320, doi:10.1128/JCM.00476-17.
2. Posthuma-Trumpie, G. A., Korf, J., van Amerongen, A., Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem* **2009**, *393* (2), 569-82, doi:10.1007/s00216-008-2287-2.
3. Ellis, J. S., Zambon, M. C., Molecular diagnosis of influenza. *Rev Med Virol* **2002**, *12* (6), 375-89, doi:10.1002/rmv.370.
4. Vemula, S. V., Zhao, J., Liu, J., Wang, X., Biswas, S., Hewlett, I., Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans. *Viruses* **2016**, *8* (4), 96, doi:10.3390/v8040096.
5. Stimpson, D., Sampedro, S., Richerson, R., Gordon, J., Eck, P., Ching, S., Caplan, D., Brookhart, P., Beggs, M., Osikowicz, G., One-step chromatographic immunoassay for qualitative determination of choriogonadotropin in urine. *Clin Chem* **1990**, *36* (9), 1586-1586, doi:10.1093/clinchem/36.9.1586a.
6. Li, H., Liu, Z., He, Y., Qi, Y., Chen, J., Ma, Y., Liu, F., Lai, K., Zhang, Y., Jiang, L., Wang, X., Ge, J., A new and rapid approach for detecting COVID-19 based on S1 protein fragments. *Clin Transl Med* **2020**, e90, doi:10.1002/ctm2.90.
7. Wang, Q., Du, Q., Guo, B., Mu, D., Lu, X., Ma, Q., Guo, Y., Fang, L., Zhang, B., Zhang, G., Guo, X., A Method To Prevent SARS-CoV-2 IgM False Positives in Gold Immunochromatography and Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *J Clin Microbiol* **2020**, *58* (6), e00375-20, doi:10.1128/JCM.00375-20.
8. De Boer, S. H., Lopez, M. M., New grower-friendly methods for plant pathogen monitoring. *Annu Rev Phytopathol* **2012**, *50*, 197-218, doi:10.1146/annurev-phyto-081211-172942.
9. Mutneja, M., Mohan, C., Long, K. D., Das, C., 抗体ガイドブック 3版. 2017; p 8.
10. Guesdon, J. L., Chevrier, D., Mazié, J. C., David, B., Avrameas, S., Monoclonal anti-histamine antibody Preparation characterization and appl... *J Immunol Methods* **1986**, *87* (1), 69-78, doi:10.1016/0022-1759(86)90345-5.
11. J Grassi, C. C., Y Frobert, E Etienne, E Ezan, H Volland, P Pradelles, Two different approaches for developing immunometric assays of haptens. *Clin Chem* **1996**, *42* (9), 1532-1536, doi.
12. Oguri, H., Hiramata, M., Tsumuraya, T., Fujii, I., Maruyama, M., Uehara, H., Nagumo, Y., Synthesis-based approach toward direct sandwich immunoassay for ciguatoxin CTX3C. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (25), 7608-12, doi:10.1021/ja034990a.

13. Wei, T. Q., Zheng, Y. F., Dubowy, M., Sharma, M., Sandwich assay for tacrolimus using 2 antitacrolimus antibodies. *Clin Chem* **2014**, *60* (4), 621-30, doi:10.1373/clinchem.2013.214023.
14. Qu, H., Wang, X., Qu, B., Kong, H., Zhang, Y., Shan, W., Cheng, J., Wang, Q., Zhao, Y., Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for naringin. *Anal Chim Acta* **2016**, *903*, 149-55, doi:10.1016/j.aca.2015.09.058.
15. Tsumuraya, T., Hiramata, M., Rationally Designed Synthetic Haptens to Generate Anti-Ciguatoxin Monoclonal Antibodies, and Development of a Practical Sandwich ELISA to Detect Ciguatoxins. *Toxins (Basel)* **2019**, *11* (9), doi:10.3390/toxins11090533.
16. Quinton, J., Charruault, L., Nevers, M. C., Volland, H., Dognon, J. P., Creminon, C., Taran, F., Toward the limits of sandwich immunoassay of very low molecular weight molecules. *Anal Chem* **2010**, *82* (6), 2536-40, doi:10.1021/ac100058f.
17. Parolo, C., Sena-Torrallba, A., Bergua, J. F., Calucho, E., Fuentes-Chust, C., Hu, L., Rivas, L., Alvarez-Diduk, R., Nguyen, E. P., Cinti, S., Quesada-Gonzalez, D., Merckoci, A., Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays. *Nat Protoc* **2020**, *15* (12), 3788-3816, doi:10.1038/s41596-020-0357-x.
18. Wang, D., Zhu, J., Zhang, Z., Zhang, Q., Zhang, W., Yu, L., Jiang, J., Chen, X., Wang, X., Li, P., Simultaneous Lateral Flow Immunoassay for Multi-Class Chemical Contaminants in Maize and Peanut with One-Stop Sample Preparation. *Toxins* **2019**, *11* (1), 56, doi:10.3390/toxins11010056.
19. Yu, S., He, L., Yu, F., Liu, L., Qu, C., Qu, L., Liu, J., Wu, Y., Wu, Y., A lateral flow assay for simultaneous detection of Deoxynivalenol, Fumonisin B1 and Aflatoxin B1. *Toxicon* **2018**, *156*, 23-27, doi:10.1016/j.toxicon.2018.10.305.
20. Shim, W. B., Yang, Z. Y., Kim, J. Y., Choi, J. G., Je, J. H., Kang, S. J., Kolosova, A. Y., Eremin, S. A., Chung, D. H., Immunochromatography using colloidal gold-antibody probe for the detection of atrazine in water samples. *J Agric Food Chem* **2006**, *54* (26), 9728-34, doi:10.1021/jf0620057.
21. Li, K., Liu, L., Xu, C., Chu, X., Rapid determination of chloramphenicol residues in aquaculture tissues by immunochromatographic assay. *Anal Sci* **2007**, *23* (11), 1281-4, doi:10.2116/analsci.23.1281.
22. Naik, L., Sharma, R., Mann, B., Lata, K., Rajput, Y. S., Surendra Nath, B., Rapid screening test for detection of oxytetracycline residues in milk using lateral flow assay. *Food Chem* **2017**, *219*, 85-92, doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.090.
23. Ueda, H., Tsumoto, K., Kubota, K., Suzuki, E., Nagamune, T., Nishimura, H., Schueler, P. A., Winter, G., Kumagai, I., Mohoney, W. C., Open sandwich ELISA: a novel immunoassay based

- on the interchain interaction of antibody variable region. *Nat Biotechnol* **1996**, *14* (13), 1714-8, doi:10.1038/nbt1296-1714.
24. Ihara, M., Suzuki, T., Kobayashi, N., Goto, J., Ueda, H., Open-sandwich enzyme immunoassay for one-step noncompetitive detection of corticosteroid 11-deoxycortisol. *Anal Chem* **2009**, *81* (20), 8298-304, doi:10.1021/ac900700a.
25. Lim, S. L., Ichinose, H., Shinoda, T., Ueda, H., Noncompetitive detection of low molecular weight peptides by open sandwich immunoassay. *Anal Chem* **2007**, *79* (16), 6193-200, doi:10.1021/ac070653z.
26. Iwai, H., Ozturk, B., Ihara, M., Ueda, H., Antibody affinity maturation in vitro using unconjugated peptide antigen. *Protein Eng Des Sel* **2010**, *23* (4), 185-93, doi:10.1093/protein/gzp093.
27. Lee, A. J., Hodges, S., Eastell, R., Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* **2000**, *37* (Pt 4), 432-46, doi:10.1177/000456320003700402.
28. Mizokami, A., Kawakubo-Yasukochi, T., Hirata, M., Osteocalcin and its endocrine functions. *Biochem Pharmacol* **2017**, *132*, 1-8, doi:10.1016/j.bcp.2017.02.001.
29. Brown, J. P., Malaval, L., Chapuy, M. C., Delmas, P. D., Edouard, C., Meunier, P. J., Serum Bone Gla-Protein: A Specific Marker for Bone Formation in Postmenopausal Osteoporosis. *The Lancet* **1984**, *323* (8386), 1091-1093, doi:10.1016/s0140-6736(84)92506-6.
30. Bhadracha, H., Khatkhatay, M. I., Desai, M., Development of an in house ELISA for human intact osteocalcin and its utility in diagnosis and management of osteoporosis. *Clin Chim Acta* **2019**, *489*, 117-123, doi:10.1016/j.cca.2018.12.007.
31. Ohmuro-Matsuyama, Y., Yamashita, T., Gomi, K., Yamaji, H., Ueda, H., Evaluation of protein-ligand interactions using the luminescent interaction assay FlimPIA with streptavidin-biotin linkage. *Anal Biochem* **2018**, *563*, 61-66, doi:10.1016/j.ab.2018.10.010.
32. Duschl, C., Liley, M., Corradin, G., Vogel, H., Biologically addressable monolayer structures formed by templates of sulfur-bearing molecules. *Biophys J* **1994**, *67* (3), 1229-1237, doi:10.1016/s0006-3495(94)80592-2.
33. Lee, D. J., Park, H. S., Koo, K., Lee, J. Y., Nam, Y. S., Lee, W., Yang, M. Y., Gold Binding Peptide Identified from Microfluidic Biopanning: An Experimental and Molecular Dynamics Study. *Langmuir* **2019**, *35* (2), 522-528, doi:10.1021/acs.langmuir.8b02563.
34. Harada, Y., Ohmuro-Matsuyama, Y., Tsuna, M., Ueda, H., An Open Sandwich Immunochromatography for Non-competitive Detection of Small Antigens. *Anal Sci* **2020**, doi:10.2116/analsci.20SCP06.
35. Biji, K. B., Ravishankar, C. N., Venkateswarlu, R., Mohan, C. O., Gopal, T. K., Biogenic amines in seafood: a review. *J Food Sci Technol* **2016**, *53* (5), 2210-8, doi:10.1007/s13197-

016-2224-x.

36. Visciano, P., Schirone, M., Paparella, A., An Overview of Histamine and Other Biogenic Amines in Fish and Fish Products. *Foods* **2020**, *9* (12), doi:10.3390/foods9121795.
37. Rutkowski, K., Dua, S., Nasser, S., Anaphylaxis: current state of knowledge for the modern physician. *Postgrad Med J* **2012**, *88* (1042), 458-64, doi:10.1136/postgradmedj-2011-130634.
38. Amani, H., Hassan Kamani, M., Safari, O., Vakilchah, F., Sang Atash, M. M., A Comparative Study on Histamine Levels of Refrigerated Trout Fillets Using Competitive ELISA and HPLC Methods. *J Food Chem Nanotechnol* **2018**, *04* (02), doi:10.17756/jfcn.2018-055.
39. Kanki, M., Yoda, T., Ishibashi, M., Tsukamoto, T., Photobacterium phosphoreum caused a histamine fish poisoning incident. *Int J Food Microbiol* **2004**, *92* (1), 79-87, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.019.
40. Eitenmiller, R. R., Wallis, J. W., Orr, J. H., Phillips, R. D., Production of Histidine Decarboxylase and Histamine by *Proteus morganii*. *J Food Prot* **1981**, *44* (11), 815-820, doi:10.4315/0362-028X-44.11.815.
41. Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T., Shibata, T., *Klebsiella pneumoniae* produces no histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* strains are histamine producers. *Appl Environ Microbiol* **2002**, *68* (7), 3462-6, doi:10.1128/aem.68.7.3462-3466.2002.
42. Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R., Suzzi, G., Histamine poisoning and control measures in fish and fishery products. *Front Microbiol* **2014**, *5*, 500, doi:10.3389/fmicb.2014.00500.
43. Necedova, L., Bursova, S., Harustiaková, D., Bogdanovicova, K., Lacanin, I., Effect of heat treatment on activity of staphylococcal enterotoxins of type A, B, and C in milk. *J Dairy Sci* **2019**, *102* (5), 3924-3932, doi:10.3168/jds.2018-15255.
44. 厚生労働省 ヒスタミンによる食中毒について .  
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000130677.html>.
45. 東京都福祉保健局 食中毒の発生について .  
<https://www.metro.tokyo.lg.jp/tosei/hodohappyo/press/2020/11/17/03.html>.
46. Hwang, C. C., Lee, Y. C., Huang, C. Y., Kung, H. F., Cheng, H. H., Tsai, Y. H., Effect of Brine Concentrations on the Bacteriological and Chemical Quality and Histamine Content of Brined and Dried Milkfish. *Foods* **2020**, *9* (11), doi:10.3390/foods9111597.
47. Lacorn, M., Garrido, G., Reck, B., Sutterluti, M., Lindeke, S., Meinhardt, P., Validation of the R-Biopharm AG RIDASCREEN(R) Histamine (Enzymatic) Kit. *J AOAC Int* **2019**, *102* (5), 1472-1491, doi:10.1093/jaoac/102.5.1472.
48. Hungerford, J., Wu, W.-H., Comparison study of three rapid test kits for histamine in fish:

- BioScientific MaxSignal enzymatic assay, Neogen Veratox ELISA, and the Neogen Reveal Histamine Screening test. *Food Control* **2012**, *25* (2), 448-457, doi:10.1016/j.foodcont.2011.11.007.
49. Yagami, A., Aihara, M., Ikezawa, Z., Hide, M., Kishikawa, R., Morita, E., Chinuki, Y., Fukutomi, Y., Urisu, A., Fukushima, A., Itagaki, Y., Sugiura, S. I., Tanaka, H., Teshima, R., Kato, Z., Noguchi, E., Nakamura, M., Saito, H., Matsunaga, K., Outbreak of immediate-type hydrolyzed wheat protein allergy due to a facial soap in Japan. *J Allergy Clin Immunol* **2017**, *140* (3), 879-881 e7, doi:10.1016/j.jaci.2017.03.019.
  50. Chinuki, Y., Kaneko, S., Sakieda, K., Murata, S., Yoshida, Y., Morita, E., A case of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis sensitized with hydrolysed wheat protein in a soap. *Contact Dermatitis* **2011**, *65* (1), 55-7, doi:10.1111/j.1600-0536.2011.01917.x.
  51. Ciccocioppo, R., Di Sabatino, A., Corazza, G. R., The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* **2005**, *140* (3), 408-16, doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02783.x.
  52. Makishima, H., Ito, T., Kodama, R., Asano, N., Nakazawa, H., Hirabayashi, K., Nakamura, S., Ota, M., Akamatsu, T., Kiyosawa, K., Ishida, F., Intestinal diffuse large B-cell lymphoma associated with celiac disease: a Japanese case. *Int J Hematol* **2006**, *83* (1), 63-5, doi:10.1532/IJH97.05131.
  53. Fukunaga, M., Ishimura, N., Fukuyama, C., Izumi, D., Ishikawa, N., Araki, A., Oka, A., Mishiro, T., Ishihara, S., Maruyama, R., Adachi, K., Kinoshita, Y., Celiac disease in non-clinical populations of Japan. *J Gastroenterol* **2018**, *53* (2), 208-214, doi:10.1007/s00535-017-1339-9.
  54. Kudo, T., Morishita, R., Suzuki, R., Tachibana, T., A great improvement of fusion efficiency in mouse B cell hybridoma production by use of the new culture medium, GIT. *Tohoku J Exp Med* **1987**, *153* (1), 55-66, doi:10.1620/tjem.153.55.
  55. Sikdar, M. S., Bowra, S., Schmidt, D., Dionisio, G., Holm, P. B., Vincze, E., Targeted modification of storage protein content resulting in improved amino acid composition of barley grain. *Transgenic Res* **2016**, *25* (1), 19-31, doi:10.1007/s11248-015-9911-7.
  56. Kerber, E. R., Wheat: Reconstitution of the Tetraploid Component (AABB) of Hexaploids. *Science* **1964**, *143* (3603), 253-5, doi:10.1126/science.143.3603.253.