

29-0336 W127-4

抗フタル酸ジ-2-エチルヘキシル抗体一本鎖 Fv フラグメントの調製と諸性質

○小林 典裕¹, 竹田 久美¹, 加藤 芳徳¹, 富田 昌弘², 郷田 泰弘³, 廣部 将人³, 藤本 茂³ (¹神戸薬大, ²三重大工, ³日本エンバイロケミカルズ)

【目的】可塑剤として汎用されているフタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) は内分泌攪乱作用が疑われる物質で, 簡便かつ迅速なモニタリング法の開発が急務となっている. ELISA 法は簡便性, 汎用性に優れるが, DEHP の超高感度測定を可能とするような高親和力抗体の調製は必ずしも容易でない. 今回, 動物を免疫して得られる天然の抗体を凌ぐ親和力と特異性を備えた抗 DEHP 変異抗体の創製を究極の目標として, マウス抗 DEHP 抗体可変部を連結した一本鎖 Fv フラグメント (scFv) を調製し, その諸性質に検討を加えた.

【方法・結果】DEHP-ウシ血清アルブミン結合体で免疫したマウスの脾細胞とミエロマを電気パルスで抗原特異的に融合させて, モノクローナル抗 DEHP 抗体産生ハイブリドーマ株を樹立した. 本細胞株より総 RNA を単離し, RT-PCR により可変部遺伝子をクローニングした後, DNA 塩基配列を決定し, V_H, V_L 各ドメインのサブグループ [それぞれ III(B), VI] と相補性決定部 (CDR) を特定した. これら遺伝子を overlap extension PCR によりリンカー [(Gly₄Ser)₃] を介して連結し, scFv 遺伝子を構築した. その産物である野生型 scFv#2 クローンを用いて競合 ELISA を行った結果, 遊離 DEHP 添加量 0.5 - 50 µg の範囲で用量作用曲線が得られた. また, V_L 38 番目のアミノ酸に変異 (Gln→Arg) が認められたクローン (scFv#27) を併せて単離したが, その産物は野生型 scFv とは異なる反応性を有することが示唆された.

【考察】現在, 上記 scFv クローンと他のフタル酸エステル類との交差反応性を検討している. 今回得られた scFv 遺伝子にランダム変異を導入することにより, 天然の抗体を上回る結合特性を有し, 簡便かつ超高感度なモニタリング法の開発を可能とする変異抗 DEHP 抗体が得られるものと期待される.