

コルチゾール測定試薬用高性能モノクローナル抗体の単離

小	林	龍	司 ^{*1}
三	谷	俊	介 ^{*2}
堀	田	秀	樹 ^{*2}
宮	内	ゆ	か ^{*1}
松	葉	隆	雄 ^{*1}
新	谷	晃	司 ^{*3}

Isolation of a Novel Monoclonal Antibody for the Detection of Cortisol.

Ryuji KOBAYASHI
Shunsuke MITANI
Hideki HORITA
Yuka MIYAUCHI
Takao MATSUBA
Koji SHINTANI

Cortisol plays an important role in controlling blood sugar and blood pressure in the body. However, the development of tumors in adrenal gland and pituitary gland can cause the disorder of its blood level. To diagnose such diseases, it is necessary to accurately examine the blood level of this hormone. But it is hard to obtain an antibody that can accurately diagnose the blood level of it from market. Then we decided to isolate a monoclonal antibody that can be used for the diagnosis. To isolate the monoclonal antibody, we first examined the linker introduction site of cortisol to make antigens. And we next examined the strains of mouse for immunization. As a result, we found that immunization of balb/c with antigens made from cortisol having linker at 3rd place in the steroid structure made antibodies that specifically bound to cortisol. And we could isolate a monoclonal antibody that met the required performance from this mouse. Then we made AIA-CL reagent using this antibody and evaluated its performance. As a result of this evaluation, we confirmed that this newly developed AIA-CL reagent showed the same sensitivity as the AIA reagents. Furthermore, the AIA-CL reagents showed improved specificity over AIA reagents.

1. 背景

副腎皮質から分泌されるステロイドホルモンの一種にコルチゾールがある。コルチゾールには血糖値や血圧をコントロールする作用があり、生体内で重要な役

割を果たすホルモンとして知られている¹⁾。しかしこのホルモンは、副腎や下垂体での腫瘍の発生など様々な疾患によってその血中濃度が異常になる²⁾。そのためこれらの疾患を診断するためには、このホルモンの血中濃度を正確に調べる必要があるとなる。

コルチゾールの血中濃度は一般的に、抗コルチゾール抗体を用いた競合法³⁾によって測定されている(図1)。この方法ではまず、固相化された抗コルチゾー

*1 バイオサイエンス事業部 第一開発部 技術グループ
*2 バイオサイエンス事業部 第一開発部 試薬グループ
*3 バイオサイエンス事業部 第一開発部

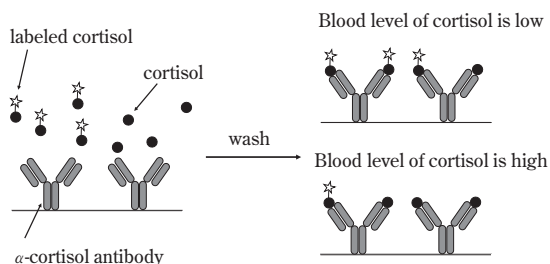


Fig. 1 Assay principle of cortisol measurement

ル抗体をアルカリホスファターゼ（ALP）などの酵素で標識されたコルチゾール（標識コルチゾール）と検体との混合液に加えて反応させる。その後これを洗浄し、固相に結合している標識コルチゾールから出るシグナルを測定する。検体中のコルチゾール濃度が低い時には多くの標識コルチゾールが固相に結合して強いシグナルがでる。しかし検体中のコルチゾール濃度が高い時には固相に結合する標識コルチゾールが減り、弱いシグナルとなる。このシグナル変化の割合を調べることで、血中のコルチゾール濃度が測定される。

このような測定試薬を作る際、その試薬性能に大きな影響を与えるのが、抗体である。抗体とは、標的抗原に対して特異的かつ高い親和性で結合する性質を有する分子である。しかし血中のコルチゾール濃度は非常に低い。またこのホルモンはステロイド骨格を持っているため、血中にはこれとよく似た構造を持つ類似化合物が数多く存在している（図2）。そのためこの測定試薬を作るためには、抗原との親和性のみでなく特異性の点においても高い性能が求められる。しかしこのような要求を満たす抗体を市場から入手することは非常に難しい⁴⁾。そこで我々はAIA-CL試薬用として高性能な抗コルチゾールモノクローナル抗体を自社開発することにした。

なお本研究により、SDG sの掲げる「すべての人の健康と福祉」という社会課題の解決へ向けた貢献が期待できる。

2. 検討内容及び実験結果

[1] 抗原作成時のリンカー導入部位の検討

コルチゾールのように分子量の低い化合物は、それ単独で免疫しても抗体が作られにくい。このような場合、アルブミンなど分子量の大きなキャリアタンパク質へ結合させてから免疫を行うことが必要となる。しかしこの時、コルチゾールのどこへリンカーを導入してキャリアタンパク質へ結合させれば特異性の高い抗体が得られるかは分かっていない。そこでまずこのリンカー導入部位について検討することにした。

コルチゾールとその類似化合物の構造を比較した結果、コルチゾールの3位か21位へリンカーを導入して免疫抗原を作製すると特異性の高い抗体が得られると予想された。そこでこれらの部位へリンカーを導入したコルチゾールをそれぞれ化学合成した。そしてこれらのコルチゾールをキャリアタンパク質へそれぞれ結合させ、免疫抗原とした。用意した実験動物（マウス、balb/c）へこれらの免疫抗原を定法に従い免疫し、抗血清をそれぞれ取得した⁵⁾。そしてこの抗血清に含まれる抗体とコルチゾール類似化合物との交差反応性を全自動酵素免疫アッセイ装置AIA600II（東ソー株式会社製）で調べた。

実験の結果、3位へリンカーを導入したコルチゾールで作製した免疫抗原を用いると、コルチコステロンとの交差反応性が大幅に低く抑えられると分かった（図3）。一方、プレドニゾロンとの交差反応性については、リンカー導入部位に関わらず非常に高い傾向にあると分かった（図3）。

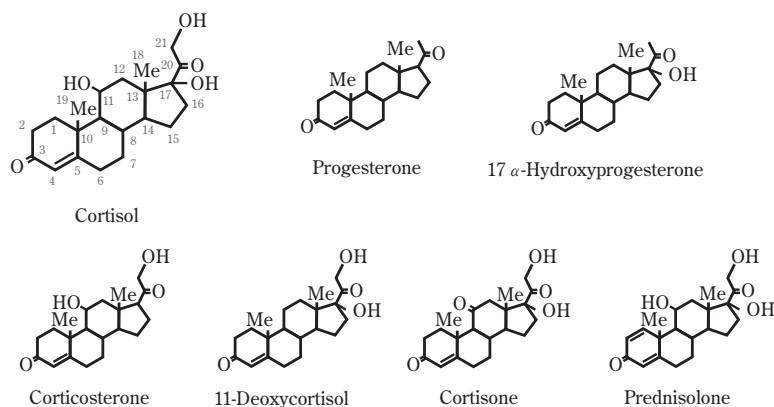


Fig. 2 Structures of cortisol and its analogous compounds

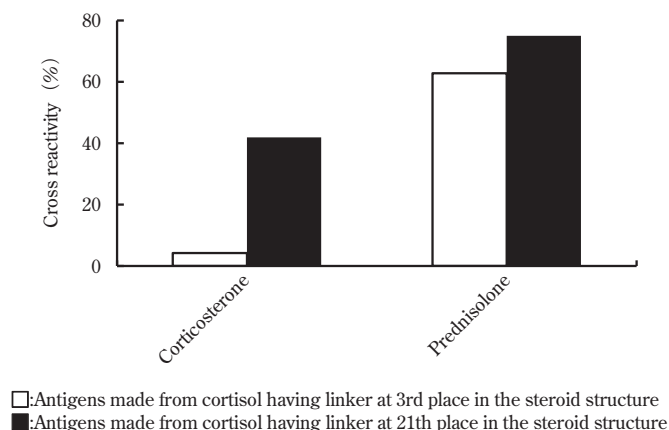


Fig. 3 Results of studies on the linker introduction site

[2] 免疫動物の検討

使用するマウスの系統によってコルチゾール類似化合物との交差反応性に違いが出る可能性もある。そこでマウスの系統を変えて交差反応性にどのような影響がでるか調べることにした。尚ここでは、抗体単離がよく使用されている balb/c と A/J の 2 系統で比較を行った。

3 位からリンカーが導入されているコルチゾールで作成した免疫抗原を定法に従ってそれぞれのマウスへ免疫し、抗血清を取得した⁵⁾。そしてこの抗血清に含まれる抗体とコルチゾール類似化合物との交差反応性を全自動エンザイムイムノアッセイ装置 AIA600II (東ソー株式会社製) でそれぞれ調べた。

実験の結果、コルチゾール類似化合物との交差反応性は A/J よりも balb/c の方が全体的に低く抑えられる傾向にあると分かった (図 4)。

[3] 抗体のスクリーニング

これまでの検討から、3 位からリンカーが導入されているコルチゾールで免疫抗原を作成して balb/c へ

免疫するとコルチゾールへの特異性が高い抗体を得られやすいと考えられた。そこでこのマウスから下記の通りモノクローナル抗体を単離することにした。

まず免疫したマウスを安楽死させ、脾臓細胞を摘出した。そしてこの細胞とミエローマ細胞とを定法に従って融合し^{5, 6)}、ハイブリドーマを作成した。このハイブリドーマを細胞培養液へ懸濁してから 384well プレートへ播き、37℃、5% CO₂ の環境下で培養した。その後この培養上清を各ウェルから少量回収し、その中に分泌されている抗体の性能 (抗原検出感度・反応特異性) を下記の ELISA で評価した。

この評価ではまず、 α mouse IgG (0.5 μ g/ml) が固定化された ELISA プレートにスキムミルクが 1% 含まれる PBS 溶液でブロッキングした。その後この ELISA プレートへ先ほど回収した培養上清を一定量ずつ加えて反応させた。次にこのプレートへ①標識コルチゾール溶液、②標識コルチゾールとコルチゾールの混合溶液 (コルチゾールによる競合)、③標識コルチゾールとコルチゾール類似化合物の混合溶液 (コルチゾール類似化合物による競合) のいずれかをそれぞれ

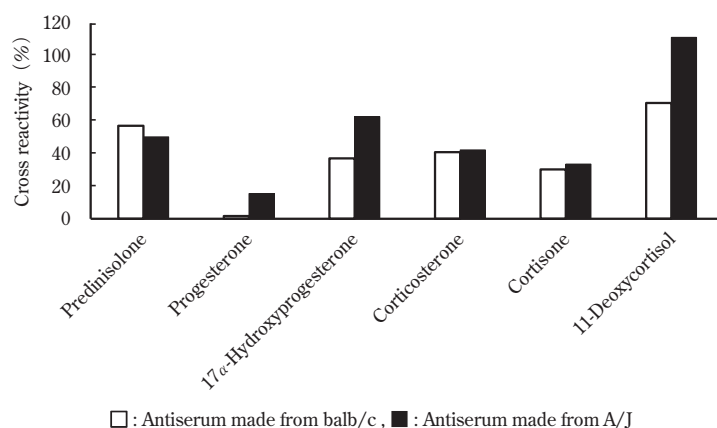


Fig. 4 Results of studies on the strains of mouse

加え、反応させた。その後未反応の標識コルチゾールを洗浄して除き、ALPの基質である4-メチルウンベリフェリリン酸を加え、それぞれ蛍光強度を測定した。そして①標識コルチゾールのみ添加した時の蛍光強度 (B0) を100 %とし、②コルチゾールや③コルチゾール類似化合物で競合させた時の蛍光強度 (B) をそれぞれ相対的な値 ($B/B0 \times 100 (\%)$) として算出した。

実験の結果を図5に示す。この図では、②コルチゾールと競合させた際の $B/B0$ を横軸にとり、③コルチゾール類似化合物と競合させた際の $B/B0$ を縦軸にとっている。また、それぞれの円の大きさは①標識コルチゾールとだけ反応させた際のシグナル強度の大きさを表している。このようなスクリーニングにより、要求性能を満たすモノクローナル抗体が単離できた。

[4] 試薬性能の評価

単離したモノクローナル抗体を用いて AIA-CL 試薬を作成し、その性能を評価した。その結果、今回作成した AIA-CL 試薬は従来の AIA 試薬とほぼ同等の検

量線を描くことが確認できた (図6)。またこの AIA-CL 試薬では、コルチゾール類似化合物との交差反応性が従来の AIA 試薬より大幅に改善される傾向にあることも確認できた (図7)。

3. まとめ

従来の AIA 試薬では、コルチゾール類似化合物との交差反応が課題となっていた。しかし今回新たに作成した AIA-CL 試薬では、自社開発した高性能なモノクローナル抗体を利用することによってこの課題を改善することができた。今後はこの抗体を使って AIA 試薬の改良にも取り組み、その性能を向上させていく。またコルチゾール以外の項目についても高性能なモノクローナル抗体の開発に取り組み、試薬性能の更なる向上を図っていく。

謝辞

本研究の様々な実験でお世話になった相馬麗さんに感謝いたします。

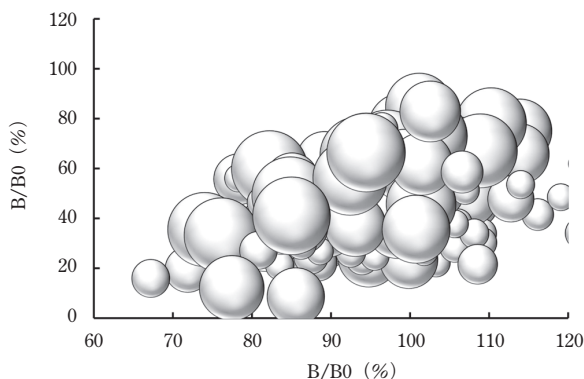


Fig. 5 Results of ELISA screening

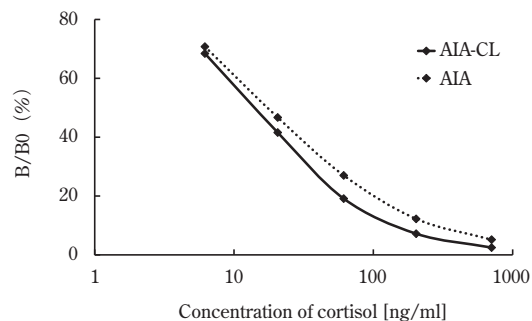


Fig. 6 Calibration curve of AIA-CL and AIA reagents

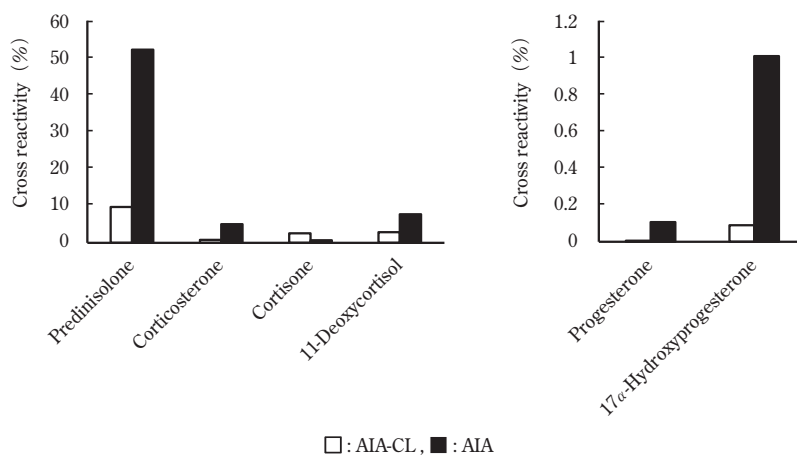


Fig. 7 Reaction specificity of AIA-CL and AIA reagents

引用文献

- 1) M C Goiato, E V F da Silva, N B Cândido, A S Nóbrega, R A de Medeiros, D H Sumida, F Y Chiba, D M Dos Santos. *BMC. Oral. Health.*, 19, 75 (2019)
- 2) G P Chrousos, T Kino, E Charmandari. *Neuroimmunomodulation.*, 16, 272 (2009)
- 3) D E Yorde, E A Sasse, T Y Wang, R O Husa, J C Garancis. *Clin. Chem.*, 22, 1372 (1976)
- 4) H Oyama, I Morita, Y Kiguchi, T Morishita, S Fukushima, Y Nishimori, T Niwa, N Kobayashi. *Biol. Pharm. Bull.*, 40, 2191 (2017)
- 5) P N Nelson, G M Reynolds, E E Waldron, E Ward, K Giannopoulos, P G Murray. *Mol. Pathol.*, 53, 111 (2000)
- 6) G Köhler, C Milstein. *Nature.*, 256, 495 (1975)

