

3－（1－ナフトイル）－インドール誘導体に対する アルパカVHH抗体の開発

Development of 3-(1-naphoyl)-indole derivatives-Specific Alpaca VHH antibodies

○中山 浩¹、田中 真司¹、村岡 仁¹、吉田 麻衣子²、村上 明一³

(1. パナソニック㈱、2. 抗体工学研究センター、3. 琉球大学医学部)

○Hiroshi Nakayama¹, Shinji Tanaka¹, Jin Muraoka¹, Maiko Yoshida², Akikazu Murakami³

(1. Panasonic, 2. Antibody engineering research center Inc., 3. Grad. Sch of med., U-Ryukyus)

E-mail: nakayama.health@jp.panasonic.com

1. 序文

合成カンナビノイドは近年、日本で危険ドラッグとして注目されており、JWH-018 や JWH-073 などの 3－（1－ナフトイル）－インドール誘導体が良く知られている。このような化合物を高速度に、簡単に検出することが社会的にも求められている。今回、3－（1－ナフトイル）－インドール誘導体に対するアルパカVHH抗体を作製したので報告する。

2. 方法

1) アルパカVHH抗体の作製及び評価

水素化ナトリウムを予め合成した 3－（1－ナフトイル）－インドールに添加し、その反応液を室温で攪拌した後、ブロモヘプタン酸を徐々に加えた。この溶液を 80℃ で 3 時間攪拌した反応液を冷却した後に酢酸エチルで 3 度抽出した。その後にエタノールを用いて再結晶することにより 7－（3－（1－ナフトイル）1H-インドール-1-イル）-ヘプタン酸（He p）を得ることができた。得られた He p にヒドロキシサクシイミド、ジクロロヘキシルカルボジイミド及びキーホールリンペットヘモシニアン（KLH）を順次加えて、その反応後、重炭酸緩衝液で透析することにより免疫原（He p-KLH）を得た。同様の方法により、抗体評価用 ELISA で用いる固相抗原（He p-BSA）も作製した。この免疫原をアルパカに数回免疫することにより免疫反応を及ぼした後に、血液中から単核球を採集した。その単核球から全 mRNA を抽出し、それを RT-PCR 法により cDNA を作製した。その後、アルパカVHH増殖用のプライマーを使用してVHH領域のみを増殖させた後に、M13 ファージ用ベクターに導入し、大腸菌に形質転換し発現させる。さらにヘルパーファージを感染させることによりファージライブラリーを作製した。その後、パンニングをすることにより 3－（1－ナフトイル）－インドール誘導体に結合するアルパカVHH抗体を得ることができた。

今回、得られたVHH抗体についてELISAにより、種々の3－（1－ナフトイル）－インドール誘導体および原料に対する交差反応を調べた。

3. 結果

上記の方法により免疫原である He p-KLH を得ることができた。KLH に結合している 7－（3－（1－ナフトイル）1H-インドール-1-イル）-ヘプタン酸は、平均 4.4 個であった。この免疫原を用いてアルパカに免疫した後に、若干の修飾を施した常法に従い実験した結果、2 種類のVHH抗体を得ることができた。得られたそれぞれのVHH抗体は、He p を初めとして、さまざまな 3－（1－ナフトイル）－インドール誘導体と結合することが分かった。一方、原料であるインドールや 1-ナフトレンカルボン酸には結合しなかった。

今後は、このモノクローナル抗体を用いて高性能免疫センサを開発する予定である。