

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4077481号  
(P4077481)

(45) 発行日 平成20年4月16日(2008.4.16)

(24) 登録日 平成20年2月8日(2008.2.8)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 0 7 K</b>	<b>16/44</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 16/44
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/15</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/19</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21

請求項の数 7 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-504305 (P2005-504305)	(73) 特許権者	000161932
(86) (22) 出願日	平成16年3月26日(2004.3.26)		京都電子工業株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2004/004355		京都府京都市南区吉祥院新田二の段町68番地
(87) 国際公開番号	W02004/087764	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成16年10月14日(2004.10.14)		弁理士 田中 光雄
審査請求日	平成16年10月26日(2004.10.26)	(74) 代理人	100101454
(31) 優先権主張番号	特願2003-91663 (P2003-91663)		弁理士 山田 卓二
(32) 優先日	平成15年3月28日(2003.3.28)	(74) 代理人	100083356
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 柴田 康夫
微生物の受託番号	FERM BP-8306	(74) 代理人	100104592
微生物の受託番号	FERM BP-8305		弁理士 森住 憲一
前置審査		(72) 発明者	澤田石 一之
			京都府京都市南区吉祥院新田二ノ段町68 京都電子工業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ダイオキシンを認識する組換抗体および該抗体をコードする遺伝子

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

2, 3, 4, 7, 8 - ペンタクロロジベンゾフラン(2, 3, 4, 7, 8 - P e C D F) に結合活性を有する組換抗体であって、s c F v フラグメント D x 3 8 6 0 H L、ならびに、変異体 D x 3 8 6 0 H L - M # 5、D x 3 8 6 0 L H - M # 1、D x 3 8 6 0 L H - M # 2 および D x 3 8 6 0 L H - M # 3 からなる群から選択される組換抗体。

## 【請求項2】

請求項1に記載の組換抗体のアミノ酸配列をコードするDNA。

## 【請求項3】

請求項2に記載のDNAを含むクローニングまたは発現ベクター。

## 【請求項4】

請求項3に記載のクローニングまたは発現ベクターで形質転換した形質転換体。

## 【請求項5】

請求項1に記載の組換抗体の製造方法であって、請求項4に記載の発現ベクターで形質転換した形質転換体を適当な培地中で培養し、該形質転換体または培地から組換抗体を回収することを含んでなる方法。

## 【請求項6】

2, 3, 4, 7, 8 - P e C D F を免疫学的に捕獲する方法であって、請求項1に記載の組換抗体を使用することを特徴とする方法。

## 【請求項7】

10

20

2, 3, 4, 7, 8 - P e C D Fを免疫学的に測定する方法であって、請求項1に記載の組換抗体を使用することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、2, 3, 4, 7, 8 - ペンタクロロジベンゾフラン(2, 3, 4, 7, 8 - P e C D F)に結合活性を有する新規な組換抗体、そのアミノ酸配列をコードする遺伝子、該遺伝子を導入したベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体、該組換抗体の製造方法、該組換抗体を用いる2, 3, 4, 7, 8 - P e C D Fの免疫学的捕獲法ならびに測定法に関する。

【背景技術】

内分泌攪乱物質による環境汚染が問題となり、その汚染状況の把握やヒトの健康への影響などの調査が進められている。これら内分泌攪乱物質によるヒトや環境への影響が明らかになるに従い、日本のみならず世界各国においても重大な社会的関心事となっている。なかでもダイオキシン類については、ヒトや生態系および環境への持続的な影響が懸念されおり、汚染状況の把握や、ヒトや生態系での暴露状況の調査、摂取ルートの解明、さらには汚染箇所のダイオキシン量のモニタリングや汚染除去方法への対応が急務となっている。ダイオキシン類は、有機塩素化合物の使用、生産、燃焼などの過程で生成することから発生源が多岐に渡るとともに、土壌、水質、大気、食品、海産物などにおいて広範な汚染が確認されている。従って、膨大な生体試料や環境試料などの試料中のダイオキシン濃度を測定し、対策を講じる必要から、ダイオキシン類の簡便かつ迅速な測定方法の確立が

10

20

望まれている。ダイオキシン類には、75種類のポリクロロジベンゾダイオキシン(PCDD)および135種類のポリクロロジベンゾフラン(PCDF)からなる多数の構造異性体が存在する。最も毒性が高い2, 3, 7, 8 - テトラクロロジベンゾパラダイオキシン(2, 3, 7, 8 - TCDD)の毒性を1としたときの各ダイオキシン異性体の相対毒性が毒性等価指数として示されており、ダイオキシン類の分析においては毒性の高い7種類のPCDDおよび10種類のPCDFが測定対象物質とされている。また、内分泌攪乱物質の1つとして以前から問題とされていたポリクロロビフェニール(PCB)のうち12種類の共平面(coplanar)PCBもダイオキシン類として測定されるようになった。

ダイオキシン類の測定は、従来、高分解能ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー(HRGC/HRMS)分析により行われていた。しかし、HRGC/HRMS法は、試料中の妨害物質を除去するために多段階のクリーンアップ操作を必要とし、分析機器が高額であり、かつ測定者の習熟を要するため、特定の分析機関においてのみ測定が可能であった。ダイオキシン類の分析方法、特にHRGC/HRMS法においては、毒性の高い17種類のダイオキシン異性体の含有量を個々に定量し、次いで各異性体の実測値に毒性等価指数を乗じた値の総和を、2, 3, 7, 8 - TCDD相当量である毒性等量(TEQ)に換算し、この換算値をダイオキシン分析値として用いている。従って、データ解析を含め被検体の分析に多大な時間を要する。これらの理由から、ダイオキシン類のより簡便で安価かつ高感度な測定方法の開発が強く望まれている。

30

また、特定の指標物質を測定することにより、より簡便にダイオキシン量(TEQ)を把握しようという考え方が根強く存在している。前駆体であるクロロベンゼンを測定する方法もこの1つである。近年、ダイオキシン異性体の1つである2, 3, 4, 7, 8 - P e C D F量が、ダイオキシン類の総TEQと非常に高い相関性を有することが明らかになってきた(高菅ら、第11回環境化学討論会講演要旨集、136頁、2002年)。土壌、底質、大気、水質、排ガス、飛灰などの環境試料、母乳、血液などの生体試料、ならびに、海産物、食品などの広範な試料においても、2, 3, 4, 7, 8 - P e C D Fは、全ダイオキシンの主要構成成分でありその含有量はダイオキシン類の総TEQと $R = 0.96 \sim 0.99$ の高い相関を示す。従って、2, 3, 4, 7, 8 - P e C D Fは、ダイオキシン量を把握するための指標物質として注目されている。

40

一方、抗体を利用してダイオキシン類を定量する試みも行われている。

50

例えば、特開2002-340882号公報には、ダイオキシン類の捕集ユニット、抽出ユニット、分離精製ユニット、および抗体を用いてダイオキシン類を測定する測定ユニットの4つのユニットから構成されるダイオキシン類の測定装置および測定方法が記載されている。

また、特開2002-228660号公報には、2, 3, 7, 8-TCDDに高親和性のモノクローナル抗体を作製し、これを用いてヒト血液や母乳などの生体試料中のダイオキシン類を検出する方法が記載されている。

さらに、特開2002-119279号公報には、ダイオキシン類である複数の異性体に対して交差反応性を有する数種の抗体を用い、ダイオキシン類の存在量を推定する方法が記載されている。

10

しかし、これらの文献には、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを認識するモノクローナル抗体、ならびに、該モノクローナル抗体をコードする遺伝子配列、該遺伝子配列に基づく組換え抗体および該組換え抗体を用いる2, 3, 4, 7, 8-PeCDFの測定方法については記載されていない。

また、これら文献の方法は、試料中に含まれるダイオキシン類のTEQを把握するには至らないという欠点を有する。

#### 【発明の開示】

(発明が解決しようとする技術的課題)

本発明者らは、HRGC/HRMS法で測定される17種類のダイオキシン類の主要構成成分であり、かつ、その含有量がダイオキシン類の総TEQと高い相関性を有する指標異性体である2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを、免疫学的手法により、迅速、簡便、高感度に捕獲および測定する方法を確立しようとした。

20

(その解決方法)

本発明者らは、上記課題を解決するために、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF誘導体を抗原として用いて、通常の細胞融合法により、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを認識するモノクローナル抗体を産生する2株のハイブリドーマ、即ち、モノクローナル抗体Dx3860を産生するハイブリドーマDx3860r1およびモノクローナル抗体Dx3150を産生するハイブリドーマDx3150r1を得た。

また、本発明者らは、これらのハイブリドーマ中に含まれるmRNAを単離および精製し、このmRNAをもとにcDNAを合成した。次いで、このcDNAの中から、モノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域およびL鎖可変領域ならびにモノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域およびL鎖可変領域をコードするcDNAを選択するため、抗体遺伝子特有の配列を利用してPCRを行い、目的の抗体遺伝子の特異的に増幅させた。これら選択されたcDNAの塩基配列を解析し、それらがコードするアミノ酸配列を推定した。

30

その結果、モノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域およびL鎖可変領域をコードするcDNAは、それぞれ配列番号1および2で示され、一方、モノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域およびL鎖可変領域をコードするcDNAは、それぞれ配列番号3および4で示されることがわかった。

また、モノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域およびL鎖可変領域の推定アミノ酸配列は、それぞれ配列番号5および6で示され、一方、モノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域およびL鎖可変領域の推定アミノ酸配列は、それぞれ配列番号7および8で示されることがわかった。

40

さらに、本発明者らは、上記抗体の可変領域中の超可変領域(CDR1~3)のアミノ酸配列およびその位置を特定した。超可変領域のアミノ酸配列を以下の表1~4に示す。

表 1 : D x 3 8 6 0 の H 鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Tyr-Ala	配列番号 9
CDR 2	Phe-Ser-Asn-Gly-Gly-Ile-Thr	配列番号 1 0
CDR 3	Ala-Arg-Gly-Tyr-Gly-Pro-Ala-Tyr	配列番号 1 1

表 2 : D x 3 8 6 0 の L 鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr-Leu-Asn-Tyr	配列番号 1 2
CDR 2	Asn-Thr-Asn	
CDR 3	Ala-Leu-Trp-Tyr-Ser-Asn-His-Leu	配列番号 1 3

10

表 3 : D x 3 1 5 0 の H 鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Gly-Tyr-Ser-Ile-Thr-Ser-Gly-Phe-Tyr	配列番号 1 4
CDR 2	Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Tyr-Asn	配列番号 1 5
CDR 3	Val-Ser-Tyr-Gly-Ser-Arg-Arg-Gly-Val-Thr-Tyr	配列番号 1 6

20

表 4 : D x 3 1 5 0 の L 鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr-Ser-Asn-Tyr	配列番号 1 7
CDR 2	Asn-Thr-Asn	
CDR 3	Ala-Leu-Trp-Tyr-Asn-Thr-His-Leu-Val	配列番号 1 8

モノクローナル抗体 D x 3 8 6 0 の H 鎖および L 鎖可変領域中の超可変領域 ( C D R 1 ~ 3 ) の位置を、DNA 配列およびアミノ酸配列と共に、それぞれ図 1 および図 2 に示す。また、モノクローナル抗体 D x 3 1 5 0 の H 鎖および L 鎖可変領域中の超可変領域 ( C D R 1 ~ 3 ) の位置を、DNA 配列およびアミノ酸配列と共に、それぞれ図 3 および図 4 に示す。

30

図 1 において、アミノ酸配列の 2 6 ~ 3 3 位が C D R 1 を、5 1 ~ 5 7 位が C D R 2 を、9 6 ~ 1 0 3 位が C D R 3 を示す。

図 2 において、アミノ酸配列の 2 6 ~ 3 4 位が C D R 1 を、5 2 ~ 5 4 位が C D R 2 を、9 1 ~ 9 8 位が C D R 3 を示す。

図 3 において、アミノ酸配列の 2 6 ~ 3 4 位が C D R 1 を、5 2 ~ 5 8 位が C D R 2 を、9 7 ~ 1 0 7 位が C D R 3 を示す。

図 4 において、アミノ酸配列の 2 6 ~ 3 4 位が C D R 1 を、5 2 ~ 5 4 位が C D R 2 を、9 1 ~ 9 9 位が C D R 3 を示す。

40

また、本発明者らは、上記抗体の可変領域をコードする DNA を発現ベクターに組み込み、該ベクターを宿主細胞に導入し、該宿主細胞において組換抗体を発現させた。さらに、本発明者らは、該組換抗体を用いて、試料中の 2 , 3 , 4 , 7 , 8 - P e C D F を定量しうることを確かめた。また、本発明者らは、上記抗体の可変領域をコードする DNA に変異を導入し、この変異導入 DNA を用いて上記のように組換抗体を発現させ、該組換抗体を用いて、試料中の 2 , 3 , 4 , 7 , 8 - P e C D F を定量しうることを確かめた。

即ち、本発明は、2 , 3 , 4 , 7 , 8 - ペンタクロロジベンゾフラン ( 2 , 3 , 4 , 7 , 8 - P e C D F ) に結合活性を有する組換抗体であって、

( 1 ) 2 , 3 , 4 , 7 , 8 - P e C D F を認識するモノクローナル抗体 D x 3 8 6 0 の

50

H鎖可変領域を構成し、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(2) 該モノクローナル抗体D×3860のL鎖可変領域を構成し、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(3) 2, 3, 4, 7, 8 - PeCDFを認識するモノクローナル抗体D×3150のH鎖可変領域を構成し、配列番号7で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(4) 該モノクローナル抗体D×3150のL鎖可変領域を構成し、配列番号8で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(5) 上記(1)～(4)のポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8 - PeCDFに結合活性を有するポリペプチド；ならびに

(6) 上記(1)～(5)のポリペプチドのフラグメントであり、2, 3, 4, 7, 8 - PeCDFに結合活性を有するポリペプチド；

からなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドを含む組換抗体を提供するものである。

また、本発明は、上記の組換抗体のアミノ酸配列をコードするDNA、該DNAを含むクローニングまたは発現ベクター、該ベクターで形質転換した形質転換体、該形質転換体を用いて該組換抗体を製造する方法、ならびに、該組換抗体を用いて2, 3, 4, 7, 8 - PeCDFを免疫学的に捕獲および測定する方法を提供するものである。

(従来技術より有効な効果)

本発明の組換抗体を用いて、ダイオキシシン類、特に2, 3, 4, 7, 8 - PeCDFを、免疫学的手法により、迅速、簡便、高感度に捕獲および測定することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

図1は、モノクローナル抗体D×3860のH鎖可変領域のDNA配列、アミノ酸配列および超可変領域(CDR1～3)の位置を示す。

図2は、モノクローナル抗体D×3860のL鎖可変領域のDNA配列、アミノ酸配列および超可変領域(CDR1～3)の位置を示す。

図3は、モノクローナル抗体D×3150のH鎖可変領域のDNA配列、アミノ酸配列および超可変領域(CDR1～3)の位置を示す。

図4は、モノクローナル抗体D×3150のL鎖可変領域のDNA配列、アミノ酸配列および超可変領域(CDR1～3)の位置を示す。

図5は、scFvフラグメントD×3860HLの構成を示す。

図6は、scFvフラグメントD×3860LHの構成を示す。

図7は、scFvフラグメントD×3150HLの構成を示す。

図8は、scFvフラグメントD×3150LHの構成を示す。

図9は、抗2, 3, 4, 7, 8 - PeCDF scFvを用いた間接競合イムノアッセイにより、2, 3, 4, 7, 8 - PeCDFを測定した結果を示すグラフである。

図10は、H鎖可変領域ポリペプチド画分と抗2, 3, 4, 7, 8 - PeCDF活性の関係を示すグラフである。

図11は、モノクローナル抗体D×3860のV<sub>H</sub>鎖変異体のアミノ酸配列を示す。

図12は、変異導入D×3860 scFv提示ファージにより、2, 3, 4, 7, 8 - PeCDFを測定した結果を示すグラフである。

図13は、変異導入D×3860 scFv提示ファージの抗体価を比較するグラフである。

図14は、変異導入D×3860 scFv提示ファージのDMO存在下での反応性を比較するグラフである。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

本発明で言う「抗体」には、生体内に存在する天然型抗体の他に、抗体のH鎖もしくはL鎖の可変領域またはその組合せにより形成される、少なくとも1つの抗原結合部位を有するポリペプチドが含まれる。このようなポリペプチドには、例えば、H鎖またはL鎖の可変領域のみを含むポリペプチド、1組のH鎖フラグメントとL鎖からなるFabフラグ

10

20

30

40

50

メント、2組のH鎖フラグメントとL鎖からなるF(a b')<sub>2</sub>フラグメント、H鎖可変領域とL鎖可変領域がリンカーにより1本に結合された一本鎖組換抗体(s c F v)などが含まれる。

s c F vには、例えば、N末端側から「(H鎖可変領域) - (リンカー) - (L鎖可変領域)」の順序で結合されたポリペプチド、ならびに、「(L鎖可変領域) - (リンカー) - (H鎖可変領域)」の順序で結合されたポリペプチドが含まれる。リンカーは、s c F vが抗原に結合する際に、H鎖可変領域およびL鎖可変領域が効率良く折り畳まれるように、これらの領域の間に配置させるものである。このリンカーは、通常、5~15個のアミノ酸から構成されており、例えば、-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>-を例として挙げることができる。本発明において使用するリンカーは、上記目的を達成できる限り、アミノ酸の数および種類に制限はない。

また、本発明の組換抗体においては、H鎖可変領域またはL鎖可変領域のN末端側およびC末端側に、さらに適当なアミノ酸配列が付加されていてもよい。例えば、以下の実施例において示すように、「(H鎖可変領域) - (リンカー) - (L鎖可変領域)」ポリペプチドの場合には、H鎖可変領域のN末端側に分泌シグナル領域を、L鎖可変領域のC末端側にエピトプタグ配列を付加することができる。また、「(L鎖可変領域) - (リンカー) - (H鎖可変領域)」ポリペプチドの場合には、L鎖可変領域のN末端側に分泌シグナル領域を、H鎖可変領域のC末端側にエピトプタグ配列を付加することができる。

本発明の組換抗体には、抗体のH鎖もしくはL鎖の可変領域またはその組合せにより形成される少なくとも1つの抗原結合部位を有するポリペプチドの他に、これらポリペプチドと実質的に同じ機能を有する変異ポリペプチドが含まれる。本発明で言う「実質的に同じ機能」とは、抗原に対する結合力が実質的に同じであることを意味する。即ち、配列番号5~8で示されるアミノ酸配列を有する本発明の抗2, 3, 4, 7, 8-*PeCDF*抗体のH鎖およびL鎖の可変領域は、抗原との結合力が実質的に同じである限り、1またはそれ以上のアミノ酸の欠失、置換または付加変異を含むことができる。このような本発明の変異ポリペプチドは、配列番号5~8で示されるアミノ酸配列に対して、好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の相同性を有する。また、この変異は、図1~4に示される抗体可変領域中の超可変領域(CDR1~3)以外のフレームワークに存在するのが好ましい。

また、本発明の組換抗体には、配列番号5~8で示されるポリペプチドのフラグメントであって、元のポリペプチドと実質的に同じ機能を有するフラグメント、ならびに、これらフラグメントの組合せにより形成されるポリペプチドが含まれる。これらのフラグメントは、図1~4に示される超可変領域(CDR1~3)の少なくとも1つ、好ましくは2つ、さらに好ましくは3つ全てを含有する。

本発明の組換抗体は、所望のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAを調製し、該DNAを発現ベクターに組み込み、該発現ベクターを宿主細胞に導入し、該宿主細胞を適当な培地中で培養して該組換抗体を発現させることにより製造することができる。

所望のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、配列番号1~4(または図1~4)に示されるcDNA配列またはアミノ酸配列に基づいて、合成により調製することができる。別法によれば、所望のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、次のようにして得ることもできる。即ち、本発明者らは、以下の実施例において示すように、N末端側からモノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域、リンカー、Dx3860のL鎖可変領域を、この順序で含むフラグメント(図5を参照)を組み込んだ発現ベクターを作製し、このベクターを大腸菌Bに導入し、この大腸菌B(pET22-Dx3860HL)を特許生物寄託センターに寄託した。さらに、本発明者らは、N末端側からモノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域、リンカー、Dx3150のL鎖可変領域を、この順序で含むフラグメント(図7を参照)を組み込んだ発現ベクターを作製し、このベクターを大腸菌K-12に導入し、この大腸菌K-12(pET22-Dx3150HL)を特許生物寄託センターに寄託した。所望のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、これらの発現ベクターから適当な制限酵素を用いて切出し、所望により

10

20

30

40

50

DNA配列中に変異を加えることにより得ることができる。また、DNAフラグメントの連結のために、常法によりフラグメントの末端を修飾することができる。

得られたDNAフラグメントの発現ベクターへの組込みは、市販の発現ベクター〔例えば、pET-22b(+)など〕の所定のフラグメント挿入部位に合致させるように、DNAフラグメントの末端を加工し、末端加工されたDNAフラグメントを発現ベクターに挿入することによって行うことができる。

このようにして得た発現ベクターを、適当な宿主細胞、特に大腸菌〔例えば、大腸菌B株、K-12株、BL21(DE3)株など〕に導入し、挿入したDNAフラグメントの発現に適した培地で宿主細胞を培養することにより、所望の組換抗体を発現させることができる。発現された組換抗体を、常法により宿主細胞またはその培養液から回収することができる。回収した組換抗体は、例えばクロマトグラフィー法によって精製することができる。

10

この方法により、所望の組換抗体を、血清を必要とする培地で動物細胞を培養することにより得られるモノクローナル抗体より安価に、かつ大量に製造することができる。

得られた組換抗体を用いて試料中の2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを免疫学的に、迅速に捕獲することができる。このような捕獲法としては、イムノクロマトグラフィーや免疫沈降による2, 3, 4, 7, 8-PeCDFの分離、精製および濃縮方法が含まれる。また、このような2, 3, 4, 7, 8-PeCDFの捕獲作用を利用することにより、該組換抗体を用いて生体中に摂取されたダイオキシン類のうち主要物質である2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを迅速に捕獲し、除去することも可能である。

20

また、得られた組換抗体を用いて試料中の2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを免疫学的に迅速かつ高感度に測定することができる。このような測定法には、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素免疫測定(EIA)、蛍光免疫測定(FIA)などが含まれる。

また、免疫学的測定法は非競合法と競合法に大別される。本発明の組換抗体は競合法に用いるのが好ましい。この競合法には、間接競合法と直接競合法が含まれる。間接競合法においては、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF誘導体を固定化し、試料中の遊離2, 3, 4, 7, 8-PeCDFと固定化抗原との間で、組換抗体との反応を競合させる。直接競合法においては、組換抗体を固定化し、試料中の2, 3, 4, 7, 8-PeCDFの存在量に応じ、該組換抗体に結合する標識2, 3, 4, 7, 8-PeCDF誘導体の量を測定する。

30

#### 【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 抗2, 3, 4, 7, 8-PeCDF抗体産生ハイブリドーマの調製

2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、次のようにして調製した。即ち、初めに2, 3, 4, 7, 8-PeCDFにアルキル鎖を導入し、その末端を活性エステル体とした。次いで、これを、常法に従い、キャリアタンパク質であるウシ血清アルブミン(BSA)に導入し、免疫用コンジュゲートを調製した。

この免疫用コンジュゲートを、アジュバントRAS R-700(Ribi社)中に十分に乳化させ、この乳化液200 $\mu$ lをBALB/cマウス(7週齢、雌)の腹腔内に投与して、マウスを免疫感作した。2週間毎に追加免疫を行い、追加免疫より約1週間の経過後に尾静脈より採血し、血中抗体価を競合EIA法により測定した。

40

2, 3, 4, 7, 8-PeCDFに対する高い抗体産生が確認されたマウスを選択し、尾静脈内に免疫用コンジュゲートを投与して、最終免疫を行った。最終免疫より3~4日後に脾臓を摘出し、脾臓細胞を調製した。対数増殖期にあるマウスミエローマ細胞(Sp2/O)と脾臓細胞を細胞数が1:5になるように混合し、ポリエチレングリコール法(PEG法)にて細胞融合を行った。10%FCS含有HAT培地に懸濁し、96ウエル培養プレートに分注(1~2.5 $\times$ 10<sup>5</sup>/ウエル)し、37<sup>o</sup>C、5%CO<sub>2</sub>下で培養した。

50

培養開始より7~10日後、ハイブリドーマの増殖が見られたウエルの培養上清を一部採取し、2, 3, 4, 7, 8 - PeCDF誘導体 - BSAコンジュゲートを固相化したマイクロタイタープレートに添加した。室温で1時間反応させた後、0.05% Tween 20含有PBS(-)で洗浄した。次いで、プレートにペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG(鎖認識)抗体(KPL社)を加えて室温で1時間反応させた後、同様にプレートを洗浄した。基質溶液(TMB基質、KPL社)を加えてプレート上のペルオキシダーゼ活性を測定し、培養上清中の抗体価を求めた。高い抗体価を示すウエルのうち、固相化2, 3, 4, 7, 8 - PeCDF誘導体 - BSAコンジュゲートに対する抗体価が、20% DMSOに溶解した2, 3, 4, 7, 8 - PeCDFによって大きく阻害されるウエルを選抜し、該ウエル中のハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングした。クローニングにより単離された細胞を培養することによって、2, 3, 4, 7, 8 - PeCDFを認識する2種類のモノクローナル抗体産生クローンを樹立した。

10

即ち、このようにして、モノクローナル抗体Dx3860を産生するハイブリドーマDx3860r1およびモノクローナル抗体Dx3150を産生するハイブリドーマDx3150r1を得た。

#### mRNAの単離および精製

抗2, 3, 4, 7, 8 - PeCDF抗体産生ハイブリドーマDx3860r1およびDx3150r1を、5% CO<sub>2</sub>通気条件下、10% FCSを含有するRPMI 1640培地中で増殖させた。対数増殖期にある約2.8~5.0×10<sup>7</sup>個の細胞から、AGPC法[Chomczynski, P., Sacchi, N., Anal. Biochem., 162, p. 156-159 (1987)]によって全RNAを抽出した。次いで、オリゴdTがラテックスビーズに結合したOrigotex-dT 30(宝酒造)を用いてpoly(A)+RNAを精製した。

20

#### cDNAの合成

Mouse scFv Module/Recombinant Phage Antibody System(Amersham Pharmacia社)に含まれるPrimed first-strand reaction mixを用いて、上記のpoly(A)+RNAからcDNAを合成した。得られたcDNAを鋳型とし、Mouse Ig-Primer Set(Novagen)およびTaq DNAポリメラーゼ(Applied Biosystems社)を用いてPCRを行った。Dx3860H鎖にはMuIgVH5'-AとMuIgVH3'-2のプライマーセットを、Dx3150H鎖にはMuIgVH5'-DとMuIgVH3'-2のプライマーセットを用いた。また、Dx3860L鎖およびDx3150L鎖の両方には、MuIgVL5'-AとMuIgVL3'-1のプライマーセットを用いた。用いたプライマーを以下の表5に示す。PCR反応は次のように行った。即ち、Dx3860H鎖とDx3150L鎖については、94×1分間、50×1分間、72×1分間の反応サイクルを30サイクル行い、Dx3150H鎖については、94×1分間、60×1分間、72×1分間の反応サイクルを30サイクル行い、Dx3860L鎖については、94×1分間、60×1分間、72×1分間の反応サイクルを5サイクル行い、その後さらに、94×1分間、50×1分間、72×1分間の反応サイクルを30サイクル行った。

30

40

表5：cDNA合成用PCRプライマー

H鎖 5'側		
Dx3860	MuIgVH5'-A	GGGAATTCATGRASSTTSKGGYTMARCTKGRITTT (配列番号19)
Dx3150	MuIgVH5'-D	ACTAGTCGACATGGRCAGRCTTACWYTYTCATTCCT (配列番号20)
		ACTAGTCGACATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCT (配列番号21)
		ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT (配列番号22)
H鎖 3'側 (Dx3860、Dx3150共通)		
	MuIgVH3'-2	CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG (配列番号23)
L鎖 5'側 (Dx3860、Dx3150共通)		
	MuIgλ VL5'-A	GGGAATTCATGGCCTGGAYTYCWCTYWTMYTCT (配列番号24)
L鎖 3'側 (Dx3860、Dx3150共通)		
	MuIgλ VL3'-1	CCCAAGCTTAGCTCYTCWGWGAIGGYGGRAA (配列番号25)

10

### cDNAのサブクローニング

上記のPCR産物を、TAクローニングキットであるpGEM-T Easy Vector System I (Promega社)を用いてpGEM-T Easyに挿入した後、大腸菌XL1-Blueを形質転換した。コンピテントセルとして、XL1-Blue Competent Cells (STRATAGENE社)を使用した。

20

### 塩基配列の決定とアミノ酸配列の解析

pGEM-T Easyにサブクローニングした抗体遺伝子cDNAクローンについて、T7プライマー(5'-TAATACGACTCACTATAGGG:配列番号26)を用いて、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems社)によるシーケンス反応を行った。次いで、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems社)にて配列を解析した。その結果、Dx3860抗体遺伝子のH鎖およびL鎖可変領域をコードするcDNAの塩基配列およびその推定アミノ酸配列(配列番号1および2)ならびにDx3150抗体遺伝子のH鎖およびL鎖可変領域をコードするcDNAの塩基配列およびその推定アミノ酸配列(配列番号3および4)を得た。塩基配列の解析ならびにアミノ酸配列の推定および解析には、解析ソフトDNAsis (日立ソフトエンジニアリング)を使用した。

30

また、配列番号1~4の配列中に含まれる超可変領域は、ImmunoGeneticsデータベース(<http://imgt.cines.fr>)の分類に従って特定した。このデータベースは、Lefranc, M.-P.ら[Nucleic Acids Research, 27, p. 209-212 (1999)]、Ruiz, M.ら[Nucleic Acids Research, 28, p. 219-221 (2000)]、および、Lefranc, M.-P. [Nucleic Acids Research, 29, p. 207-209 (2001)]の論文を参照して作成されている。特定した超可変領域(CDR1~3)の位置を、DNA配列およびアミノ酸配列と共に、図1~4に示す。

40

### 発現ベクターpET22の作製

市販ベクターであるpET-22b(+)(Novagen社)の制限酵素サイトXbaI-NcoI間の配列を、市販ベクターであるpET-3d(Novagen社)の制限酵素サイトXbaI-NcoI間の配列に置換して、T7/lacプロモーター、ヒスチジンタグおよびT7ターミネーターを有する発現ベクターpET22を作製した。この発現ベクターpET22を、制限酵素NcoI(New England Biolabs社)とNotI(東洋紡社)で切断し、その末端をCalf intestine

50

Alkaline Phosphatase (東洋紡社) により脱リン酸化処理した。0.7%アガロースゲル電気泳動により、切断した pET22 のバンドを分離し、ゲルを切り出し、Mag Extractor - PCR & Gel Clean Up - (東洋紡社) を用いて DNA をゲルより抽出した。この NcoI - NotI サイトに、以下のように scFv フラグメントを組み込み、これを scFv 発現ベクターとした。

cDNA からの scFv フラグメントの作製

クローニングした抗体遺伝子の H 鎖および L 鎖の cDNA を、リンカー配列をコードする DNA により連結し、これを発現ベクターに組み込むために、制限酵素配列を含むプライマーを用いて、H 鎖および L 鎖の cDNA を PCR で増幅した。Dx3150 H 鎖は、BamHI サイトの配列を GGATCC から GGATTC に変更し、かつ、BamHI サイトの前後の配列を含むようにプライマーを設計し、H 鎖 DNA を 5' 側と 3' 側の 2 つに分け増幅した。リンカー DNA は、fill-in により H 鎖および L 鎖の cDNA を連結するために、これらの配列の一部を含むプライマーにより PCR で増幅した。これによって、一本鎖抗体のアミノ末端側が H 鎖となるものには、H 鎖センス DNA 3' 端側の配列をリンカー DNA の 5' 端側に、L 鎖センス DNA 5' 端側の配列をリンカー DNA の 3' 端側に付加した。また、一本鎖抗体のアミノ末端側が L 鎖となるものには、L 鎖センス DNA 3' 端側の配列をリンカー DNA の 5' 端側に、H 鎖センス DNA 5' 端側の配列をリンカー DNA の 3' 端側に付加した。H 鎖、L 鎖およびリンカー DNA の増幅に用いたプライマーの組合せを表 6 および表 7 に示す。

表 6 : scFv 構築用 PCR プライマー

<u>リンカー用オリゴ(センス)</u>		
GGA GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCC		(配列番号27)
<u>Dx3860 HL</u>		
・H鎖		
3860H 5' (Nco)	G ACC ATG GAA GTG AAG CTG GTG GAG TCC GGG GG	(配列番号28)
3860H 3' (Mro)	CC TCC GGA AGA GAC AGT GAC CAG GGT ACC TTG GC	(配列番号29)
・L鎖		
3860L 5' (Bam)	GC GGA TCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT	(配列番号30)
3860L 3' (Not)	G AGC GGC CGC GCC TAG GAC AGT CAG TTT GGT	(配列番号31)
・リンカー延長		
リンカー 5' (3860H)	GGT ACC CTG GTC ACT GTC TCT TCC GGA GGA GGC GGT TCA G	(配列番号32)
リンカー 3' (3860L)	AGA TTC CTG AGT CAC AAC AGC CTG GGA TCC GCC ACC GCC AG	(配列番号33)
<u>Dx3860 LH</u>		
・L鎖		
3860L 5' (Nco)	G ACC ATG GCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT	(配列番号34)
3860L 3' (Mro)	CC TCC GGA GCC TAG GAC AGT CAG TTT GGT TCC TCC	(配列番号35)
・H鎖		
3860H 5' (Bam)	GC GGA TCC GAA GTG AAG CTG GTG GAG TCC GGG GGA GG	(配列番号36)
3860H 3' (Not)	G AGC GGC CGC TGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT	(配列番号37)
・リンカー延長		
リンカー 5' (3860L)	ACC AAA CTG ACT GTC CTA GGC TCC GGA GGA GGC GGT TCA G	(配列番号38)
リンカー 3' (3860H)	CCC GGA CTC CAC CAG CTT CAC TTC GGA TCC GCC ACC GCC AG	(配列番号39)

表7 : scFv構築用PCRプライマー(続き)

<u>Dx3150 HL</u>		
・H鎖(5'側)		
3150H 5' (Nco)	G ACC ATG GAT GTA CAG CTT CAG GAG TCA GGA CC	(配列番号40)
3150H (128at)	CC TGG AAA CTG CCG AAT CCA GTT CCA GT	(配列番号41)
・H鎖(3'側)		
3150H (101sn)	AC TGG AAC TGG ATT CGG CAG TTT CCA GG	(配列番号42)
3150H 3' (Mro)	CC TCC GGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT ACC TTG GC	(配列番号43)
・L鎖		
3150L 5' (Bam)	GC GGA TCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT	(配列番号44)
3150L 3' (Not)	G AGC GGC CGC GCC TAG GAC AGT CAG TCT GGT	(配列番号45)
・リンカー延長		
リンカー 5' (3150H)	GGT ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCC GGA GGA GGC GGT TCA G	(配列番号46)
リンカー 3' (3150L)	AGA TTC CTG AGT CAC AAC AGC CTG GGA TCC GCC ACC GCC AG	(配列番号47)
<u>Dx3150 LH</u>		
・L鎖		
3150L 5' (Nco)	G ACC ATG GCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT	(配列番号48)
3150L 3' (Mro)	CC TCC GGA GCC TAG GAC AGT CAG TCT GGT TCC TCC	(配列番号49)
・H鎖(5'側)		
3150H 5' (Bam)	GC GGA TCC GAT GTA CAG CTT CAG GAG TCA GGA CCT GG	(配列番号50)
3150H (128at)	CC TGG AAA CTG CCG AAT CCA GTT CCA GT	(配列番号51)
・H鎖(3'側)		
3150H (101sn)	AC TGG AAC TGG ATT CGG CAG TTT CCA GG	(配列番号52)
3150H 3' (Not)	G AGC GGC CGC TGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT	(配列番号53)
・リンカー延長		
リンカー 5' (3150L)	ACC AGA CTG ACT GTC CTA GGC TCC GGA GGA GGC GGT TCA G	(配列番号54)
リンカー 3' (3150H)	TCC TGA CTC CTG AAG CTG TAC ATC GGA TCC GCC ACC GCC AG	(配列番号55)

PCR増幅を、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems社)を使用し、rTaq DNAポリメラーゼ(東洋紡社)を用いて、次のように行った。即ち、94 × 1分間、58 × 1分間、72 × 1分間の反応サイクルを5サイクル行い、さらに94 × 1分間、48 × 1分間、72 × 1分間の反応サイクルを20サイクル行った。PCR増幅の後、各PCR産物を3%アガロースゲル電気泳動により分離した。DNAフラグメントを含むゲルを切り出し、MagExtractor-PCR & Gel Clean Up-(東洋紡社)を用いてDNAをゲルから抽出した。次いで、抽出したH鎖、L鎖およびリンカーDNAの3種類のDNAを混合し、rTaq DNAポリメラーゼ(東洋紡社)を用いて94 × 1.5分、65 × 3分の反応サイクルを20サイクル行うか、あるいは、Pfu DNAポリメラーゼ(STRATAGENE社)を用いて95 × 1.5分、65 × 6分の反応サイクルを20サイクル行うことにより、H鎖、L鎖およびリンカーDNAを連結した。

このように連結したscFvフラグメントを、それがコードするアミノ酸配列と共に、図5~8(配列番号56~59;アミノ酸配列のみは配列番号60~63)に示した。

図5(配列番号56)は、N末端側からモノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域、リンカー、Dx3860のL鎖可変領域を、この順序で含むscFvフラグメント(Dx3860HL)を示すものであり、そのアミノ酸配列の1~114位はH鎖可変領域を、115~129位はリンカーを、130~239位はL鎖可変領域を示す。

図6(配列番号57)は、N末端側からモノクローナル抗体Dx3860のL鎖可変領域、リンカー、Dx3860のH鎖可変領域を、この順序で含むscFvフラグメント(

10

20

30

40

50

D x 3 8 6 0 L H ) を示すものであり、そのアミノ酸配列の 1 ~ 1 1 0 位は L 鎖可変領域を、1 1 2 ~ 1 2 6 位はリンカーを、1 2 7 ~ 2 4 0 位は H 鎖可変領域を示す。

図 7 ( 配列番号 5 8 ) は、N 末端側からモノクローナル抗体 D x 3 1 5 0 の H 鎖可変領域、リンカー、D x 3 1 5 0 の L 鎖可変領域を、この順序で含む s c F v フラグメント ( D x 3 1 5 0 H L ) を示すものであり、そのアミノ酸配列の 1 ~ 1 1 8 位は H 鎖可変領域を、1 1 9 ~ 1 3 3 位はリンカーを、1 3 4 ~ 2 4 3 位は L 鎖可変領域を示す。

図 8 ( 配列番号 5 9 ) は、N 末端側からモノクローナル抗体 D x 3 1 5 0 の L 鎖可変領域、リンカー、D x 3 1 5 0 の H 鎖可変領域を、この順序で含む s c F v フラグメント ( D x 3 1 5 0 L H ) を示すものであり、そのアミノ酸配列の 1 ~ 1 1 0 位は L 鎖可変領域を、1 1 2 ~ 1 2 6 位はリンカーを、1 2 7 ~ 2 4 4 位は H 鎖可変領域を示す。

さらに、得られた s c F v フラグメントを増幅するために、反応溶液に s c F v の両端 ( N c o I - N o t I ) に対応するプライマーを加えて P C R を行った。D x 3 8 6 0 については、9 4 x 1 分、6 7 x 1 分、7 2 x 2 分の反応サイクルを 5 サイクル行い、さらに 9 4 x 1 分、6 0 x 1 分、7 2 x 2 分の反応サイクルを 2 0 サイクル行った。D x 3 1 5 0 については、9 5 x 1 分、6 2 x 1 分、7 5 x 4 分の反応サイクルを 5 サイクル行い、さらに 9 5 x 1 分、5 5 x 1 分、7 5 x 4 分の反応サイクルを 2 0 サイクル行った。P C R 産物を、1 . 5 % アガロースゲル電気泳動により分離し、s c F v の DNA フラグメント ( 7 3 0 ~ 7 4 0 b p ) を含むゲルを切り出し、DNA フラグメントをゲルから抽出した。次いで、この DNA フラグメントの末端を、制限酵素 N c o I ( N e w E n g l a n d B i o L a b s 社 ) および N o t I ( 東洋紡社 ) により処理し、再度 M a g E x t r a c t o r により精製した。

s c F v DNA フラグメントを、発現ベクター p E T 2 2 の N c o I - N o t I サイトに挿入し、この発現ベクターで大腸菌 X L 1 - B l u e を形質転換した。ライゲーションには DNA L i g e t i o n K i t V e r . 2 ( 宝酒造社 ) を使い、コンピテントセルとして X L 1 - B l u e C o m p e t e n t C e l l s ( S T R A T A G E N E 社 ) を使用した。サブクローニングしたクローンについて、s c F v 部分の配列を解析し、正しい配列を有するクローンを選択して s c F v の発現に用いた。このようにして、s c F v フラグメント D x 3 8 6 0 H L を含む発現ベクター p E T 2 2 - D x 3 8 6 0 H L ならびに s c F v フラグメント D x 3 1 5 0 H L を含む発現ベクター p E T 2 2 - D x 3 1 5 0 H L を得た。

発現ベクター p E T 2 2 - D x 3 8 6 0 H L は、大腸菌 B に導入し、大腸菌 B ( p E T 2 2 - D x 3 8 6 0 H L ) として、また、発現ベクター p E T 2 2 - D x 3 1 5 0 H L は、大腸菌 K - 1 2 に導入し、大腸菌 K - 1 2 ( p E T 2 2 - D x 3 1 5 0 H L ) として、平成 1 5 年 2 月 2 7 日に独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託され、それぞれ受託番号 F E R M B P - 8 3 0 5 および F E R M B P - 8 3 0 6 を取得した。

#### 大腸菌での発現

s c F v フラグメント D x 3 8 6 0 H L が組込まれた発現ベクター p E T 2 2 - D x 3 8 6 0 H L で形質転換した大腸菌 O r i g a m i B ( D E 3 ) ( N o v a g e n 社 ) を、L B 培地 3 0 0 m l 中、O D 6 0 0 が約 0 . 5 になるまで 3 7 で培養した。次いで、培養温度を 2 5 に下げて培養を続けた。O D 6 0 0 が約 1 . 0 になった時点で、I P T G ( イソプロピルチオガラクトシド ) を終濃度が 1 m M になるように添加し、終夜培養して、s c F v の発現を誘導した。遠心により菌体約 1 g を回収した後、5 0 m M トリス - H C l ( p H 8 . 0 ) 、0 . 1 M N a C l 中に懸濁し、リゾチーム ( 終濃度 0 . 2 m g / m l ) および T r i t o n X - 1 0 0 ( 終濃度 1 % ) を加えて溶菌した。遠心 ( 1 5 , 0 0 0 x g 、2 0 分間 ) により沈殿を回収し、沈殿を 1 . 0 % T r i t o n X - 1 0 0 を含む緩衝液で 2 回洗浄し、s c F v を含む沈殿を約 1 0 0 m g 得た。

#### s c F v の再構成

封入体として得られた s c F v を、2 5 m M P B 、3 5 0 m M N a C l 、6 M グアニジン・H C l ( p H 7 . 4 ) の緩衝液に加え、4 で終夜静置して溶解した。遠心 (

10

20

30

40

50

10,000 × g、15分間)により残渣を除去した後、上記の緩衝液にて平衡化したニッケルキレートカラム(Qiagen社)に適用した。カラム容積の約5~10倍量の緩衝液にてカラムを十分に洗浄した後、20%グリセロールおよび400mMアルギニンを含む上記緩衝液に交換した。6Mから0Mまでのグアニジン・HClのグラジエントを用いて、キレートカラム上に結合したs c F vを再構成させた。25mM PB、350mM NaCl、20%グリセロール、50mMイミダゾールの溶液(pH7.4)でカラムを洗浄した後、イミダゾール濃度を300mMに上げてs c F vを溶出させた。

#### 抗2,3,4,7,8-PeCDF s c F vを用いた間接競合イムノアッセイによる2,3,4,7,8-PeCDFの測定

マイクロタイタープレートに2,3,4,7,8-PeCDF誘導体-BSAコンジュゲート(1μg/ml)50μlを加え、室温で1時間反応させた。0.05% Tween 20含有PBS(-)でマイクロタイタープレートの各ウェルを洗浄し、ブロックエース(雪印社)を加え、室温で2時間静置してブロッキングを行った。マイクロタイタープレートを洗浄後、各濃度に調製した2,3,4,7,8-PeCDF(20% DMSO溶液)25μlと抗2,3,4,7,8-PeCDF s c F vの溶液25μlを添加し、室温で0.5~1時間反応させた。再度マイクロタイタープレートを洗浄した後、2000倍希釈した抗tetra-His抗体(Qiagen社)を加え室温で1時間反応させた。次いで、3000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG(鎖認識)抗体(KPL社)50μlを添加し、室温で1時間反応させた。マイクロタイタープレートの各ウェルを十分に洗浄して未反応液を除去した後、基質溶液(TMB基質、KPL社)を加え、室温で15分間静置した。50μlの1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>を添加して反応を停止させ、プレートリーダー(Labsystems社)によりOD450(対照:OD600)を測定した。この結果を図9にグラフで示す。このグラフから、抗2,3,4,7,8-PeCDF s c F vにより、高感度に2,3,4,7,8-PeCDFを測定できることが明らかである。

#### H鎖可変領域ポリペプチドの2,3,4,7,8-PeCDF結合活性の確認

発現ベクターpET22-Dx3860HLのL鎖可変領域を含む制限酵素サイトBamHI-NotI間の配列を除去して作製した発現ベクターpET22-Dx3860Hを用いて大腸菌Origami B(DE3)(Novagen社)を形質転換した。この形質転換体を用いて、s c F vと同様に、H鎖可変領域ポリペプチド(配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド)の発現を行った。

封入体として得られたH鎖可変領域ポリペプチドを、上記と同様に、ニッケルキレートカラム上で再構成した後、イミダゾールを用いて単離および精製した。キレートカラムより溶出された画分について、吸光度(280nm)を測定してタンパク質濃度を求め、さらに、EIA法により固相化した2,3,4,7,8-PeCDF-BSAコンジュゲートへの反応性を検討した。この結果、図10に示すように、H鎖可変領域ポリペプチド画分に抗2,3,4,7,8-PeCDF活性を認め、H鎖可変領域ポリペプチドが2,3,4,7,8-PeCDFに結合活性を有することを確認した。

#### H鎖への変異導入と変異体の2,3,4,7,8-PeCDF結合活性の確認

モノクローナル抗体Dx3860の遺伝子配列をもとに、変異導入抗体遺伝子ライブラリーの作製を行った。抗体のH鎖可変領域(V<sub>H</sub>)の遺伝子を鋳型とし、5'側および3'側の配列に制限酵素サイトを付加したプライマーを設定し、error-prone PCRにより変異を導入した。error-prone PCRは、Taq DNAポリメラーゼが増幅中にしばしば読み間違いを起こす性質を利用し、さらに塩化マンガンの添加によりPCRの際の読み間違いを意図的に誘発し、ランダムな変異を導入する方法である。このPCR産物を、制限酵素による末端の処理と精製の後、その制限酵素サイトを利用して単鎖抗体発現ファージミドのH鎖遺伝子と置き換え、これを用いて大腸菌TG1を形質転換した。

形質転換した大腸菌の培養液10mlに、アンピシリンを終濃度100μg/mlとなるように、また、M13KO7ファージを終濃度4 × 10<sup>9</sup> pfu/mlとなるよう添加

10

20

30

40

50

し、37 で1時間培養した。遠心分離により菌体を回収し、アンピシリン100 µg / mlとカナマイシン50 µg / mlを含む2 × Y T培地10 mlに再懸濁し、37 で終夜培養して培地中に単鎖抗体提示ファージを産生させた。培養液を遠心分離し、大腸菌菌体を除いた培養上清10 mlに対し、2.5 M NaCl含有20%ポリエチレングリコール溶液2 mlを加え、混和した。氷上で1時間静置した後、冷却下、遠心分離(10000 g × 20分間)した。上清を完全に除去した後、得られた沈殿を10倍希釈ブロックエース(雪印社)1 mlに溶解させ、単鎖抗体提示ファージ溶液とした。

調製した単鎖抗体提示ファージから、2, 3, 4, 7, 8 - PeCDF誘導体、2, 3, 7, 8 - TCDF誘導体、およびクロロベンゼン誘導体に対する反応性の高いクローンを濃縮するため、バイオパニングを行った。調製したファージ溶液を、まずブロッキング剤のみを固相化したマイクロタイタープレート中でプレインキュベート(100 µl / ウエル、室温、1時間)することにより、非特異的結合を排除した。次いで、2, 3, 4, 7, 8 - PeCDF誘導体、2, 3, 7, 8 - TCDF誘導体、およびクロロベンゼン誘導体の各BSAコンジュゲートを固相化してブロックエースでブロッキングしたマイクロタイタープレートに移し(100 µl / ウエル)、8% DMSO存在下に室温で1時間反応させた。反応終了後、プレートの各ウエルに8% DMSOおよび0.1% Tween 20含有PBS(-)300 µlを添加し、ピペティングし、5分間静置した後、洗浄緩衝液を廃棄した。この洗浄操作を3回繰り返した後、洗浄液を完全に除去し、0.1 Mグリシン - 塩酸緩衝液(pH 2.2)100 µl / ウエルを加え、10分間静置した。ピペティングを行って、固相化抗原から遊離した単鎖抗体提示ファージを回収し、直ちにトリス溶液(pH 8.0)を加えて中和した。

2 × Y T培地2.5 ml中で培養した大腸菌TG1(OD<sub>600nm</sub> = 0.3)の培養液に、バイオパニングにより回収したファージ溶液を混和し、37 で1時間培養してファージを再感染させた。次に、アンピシリン(終濃度100 µg / ml)およびグルコース(終濃度2%)を含む培養液に、終濃度4 × 10<sup>9</sup> pfu / mlとなるようM13KO7ファージを添加し、さらに37 で1時間培養を行った。遠心分離により菌体を回収した後、アンピシリン100 µg / mlとカナマイシン50 µg / mlを含む2 × Y T培地10 mlに再度懸濁し、37 で終夜培養した。これにより、単鎖抗体提示ファージを増幅し、培地中に産生させた(ファージレスキュー)。増幅したファージを、再びポリエチレングリコール沈殿により回収した。バイオパニングによる濃縮と再感染およびファージレスキューによる増幅を、3~5回繰り返した。

十分濃縮されたと考えられるファージクローンを、大腸菌TG1に感染させ、寒天平板培地にプレーティングし、30 で終夜培養して単一コロニー化した。スクリーニング条件ごとにTG1の単一コロニーから6クローンずつを無作為に選び、常法によりファージミドを調製し、これを鋳型としてBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0(Applied Biosystems社)によるシーケンス反応を行った。ジェネティックアナライザABI PRISM 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems社)により塩基配列を解析し、4種類のV<sub>H</sub>鎖変異導入体(Dx3860HL-M#5、Dx3860LH-M#1、Dx3860LH-M#2、Dx3860LH-M#3)を得た。これらV<sub>H</sub>鎖変異体のアミノ酸配列を、図11および配列番号64~67に示した。Dx3860野生型V<sub>H</sub>(WT)と比較したところ、1~2個のアミノ酸の変異が見られた。また、変異導入箇所はCDR部位に特定されず、フレームワークにも認められた。

いずれの変異体も間接競合イムノアッセイにより2, 3, 4, 7, 8 - PeCDFを認識することを確認した(図12)。また、抗体価やDMSO中での反応性には差が見られ、抗体価およびDMSO中での安定性はいずれも、変異体の方が野生型を上回る結果を示した(図13および図14)。さらに、この傾向は形質転換した大腸菌[Origami B(DE3)]にて発現させた各scFvにおいても保持されていた。

【産業上の利用の可能性】

10

20

30

40

50

本発明により提供されるDNAを用いて宿主細胞内で発現させることにより、2, 3, 4, 7, 8 - PeCDFを認識する組換抗体を大量に製造することができる。このように製造された組換抗体は、親モノクローナル抗体より安価であり、それを用いて2, 3, 4, 7, 8 - PeCDFを免疫学的に捕獲することができ、免疫測定に応用することができる。また、変異を導入したDNAを用いることにより、さらに有利な特性を有する組換抗体、例えば、2, 3, 4, 7, 8 - PeCDFへの親和性が向上した組換抗体や安定性が改善された組換抗体などを製造することができ、生体成分である天然の抗体タンパク質が有する問題点の克服も可能となる。

【図1】

第1図

Dx3860 Vh

```

1 GAA GTG AAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG AAG OCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC 60
1 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu 20

61 TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT TCC TAT GGC ATG TCT TGG GTT GGC CAG ACT 120
21 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr 40
      -----CDR1-IMGT-----

121 CCA GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA TCC TTT ACT AAT GGT GGT ATC ACC TAC TAT CCA 180
41 Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Ser Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro 60
      -----CDR2-IMGT-----

181 GAC AGT GTG AAG GGC GCA TTC ACC ATC TCC AGA GAT AAT GGC AGG AAC ATC CTG TAC CTG 240
61 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu 80

241 CAA ATG ACC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACG GCC ATT TAT TAC TGT GCA AGA GGC TAT GGT 300
81 Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly 100
      -----CDR3-IMGT-----

301 CCT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA 342
101 Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 114

```

【図2】

第2図

Dx3860 Vl

```

1 CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA CCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC 60
1 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu 20

61 ACT TGT GGC TCA AGT ACT GGG GCT GTT ACA ACT CTT AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA GAA 120
21 Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu 40
      -----CDR1-IMGT-----

121 AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT AAT ACC AAC GGA GCT CCA GGT GTT 180
41 Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val 60
      -----CDR2-IMGT-----

181 CCT GCC AGA TTC TCA GGC TCC CTG ATT GGA GAC AAG GCT GCC CTC ACC ATC ACA GGG GCA 240
61 Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala 80

241 CAG ACT GAG GAT GAG GCA ATA TAT TTC TGT GCT CTA TGG TAC AGC AAC CAT TTG GTG TTC 300
81 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Leu Val Phe 100
      -----CDR3-IMGT-----

301 GGT GGA GGA ACC AAA CTG ACT GTC CTA GGC 330
101 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly 110

```

【図3】

第3図

Dx3150 Vh

```

1 GAT GTA CAG CTT CAG GAG TCA GGA CCT GGC CTC GTG AAA OCT TCT CAG TCT CTG TCT CTC 60
1 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu 20

61 ACC TGT TCT GTC ACT GGC TAC TCC ATC ACC AGT GGC TTT TAC TGG AAC TGG ATC CGG CAG 120
21 Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln 40
      -----CDR1-IMGT-----

121 TTT CCA GGA AAC AAA CTG GAA TGG ATG GGC TAC ATA GAC TAC GAC GGT TAC AAT AAT TAC 180
41 Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr 60
      -----CDR2-IMGT-----

181 AAC CCA TTT CTC AAA AAT CGA GTG TCC ATC ACT GGT GAC ACA TCT GAG AAC CAG TTT TTC 240
61 Asn Pro Phe Leu Lys Asn Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe 80

241 CTG AAG TTG CAT TCT GTG ACT ACT GAG GAC ACA GCT ACA TAT TAC TGT GTA AGT TAC GGT 300
81 Leu Lys Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Ser Tyr Gly 100

301 AGT GGG AGG GAA GTT ACC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA 354
101 Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser 118
      -----CDR3-IMGT-----

```

【図4】

第4図

Dx3150 Vl

```

1 CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA CCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC 60
1 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu 20

61 ACT TGT GGC TCA AGT ACT GGG GCT GTT ACA ACT AGT AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA GAA 120
21 Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu 40
      -----CDR1-IMGT-----

121 AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT AAT ACC AAC ACA GCA GCT CCA GGT GTT 180
41 Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val 60
      -----CDR2-IMGT-----

181 CCT GCC AGA TTC TCA GGC TCC CTG ATT GGA GAC AAG GCT GCC CTC ACC ATC ACA GGG GCA 240
61 Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala 80

241 CAG ACT GAG GAT GAG GCG ATA TAT TTC TGT GCT CTT TGG TAC AAC ACC CAT TTG GTG TTC 300
81 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Thr His Leu Val Phe 100
      -----CDR3-IMGT-----

301 GGT GGA GGA ACC AGA CTG ACT GTC CTA GGC 330
101 Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly 110

```

【 図 5 】

第 5 図

D x3860HL seFv

1 GAA GTG AAG CTG GTG GAG TCC GGG GGA GGC TTA CTG AAG COT GGA GGG TCC CTA AAA CTC 60  
 CTT GAC TTC GAC CAC CTC AGG CCG COT CGG AAT GAC TTC GGA COT CCG AGG GAC TTT SAG 60  
 1 Glu-Val-Lys-Leu-Val-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly-Lys-Lys-Pro-Ser-Gly-Leu-Lys-Leu 20  
 61 TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT TCC TAT GCG ATG TCT TGG GTT CCG GAG ACT 120  
 AGG ACA COT CGG AAG COT AAG TGA AAG TCA AGG ATA CCG TAC AGA ACC CAA CCG GTC TGA 40  
 21 Ser-Cys-Ala-Ala-Ser-Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Tyr-Ala-Met-Ser-Trp-Val-Arg-Gln-Thr 40  
 121 CCA GAG AAG AAG CAG TGG CTC GCA TCC TTT AGT AAT GGT GGT ATC ACC TAC TAT CCA 180  
 GGT CTC TTC TCC GAC CTC ACC CAG COT AAG AAA TCA TTA CCA CCA TAG TGG ATG ATA GCT 60  
 41 Pro-Glu-Lys-Arg-Leu-Glu-Trp-Val-Ala-Ser-Phe-Ser-Asn-Gly-Gly-Ile-Thr-Tyr-Tyr-Pro 60  
 181 GAC AAT GTG AAG GAG CAA TTC ACC ATC TCC AGR AAT AAT GCG AGG AAC AAT CAG TAC CTG 240  
 CTG CAC CTC CCG COT AAG TGG TAG AGT TCT CTA TTA CCG TCC TTC TAG GAC ATG GAC 60  
 61 Asp-Ser-Val-Lys-Gly-Arg-Phe-Thr-Ile-Ser-Arg-Asp-Asn-Ala-Arg-Asn-Ile-Leu-Tyr-Leu 80  
 241 CAA ATG ACC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACG GCG COT ATT TAT TAC TGT GCA AAA GGC TAT GGT 300  
 GTT TGG TGG TCA GAC TCC AGR CTC CTG TSC CAG TAA AAT AAT GCG GGT TCT CCG TAA CCA 60  
 41 Gln-Met-Thr-Ser-Leu-Arg-Glu-Pro-Gly-Ala-Ser-Phe-Thr-Ala-Ile-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Arg-Gly-Tyr-Gly 100  
 301 COT COT TAC TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC ACT COT TCT TCC GGA GGA GGC GGT TCA GGC 360  
 GGA CCA ATG ACC CCG GTT CCA TGG GAC CAG TCA CAG AAG AGG COT COT CCG CCA AAT CCG 60  
 101 Pro-Ala-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Leu-Val-Thr-Val-Ser-Ser-Gly-Gly-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu 120  
 361 GGA GGT GGC TCT GGC COT GGC GCA TCC CAG COT GTT CCG ACT CAG GAA TCT CCA CTC ACC 420  
 COT CCA CCG AGR CCG CCA CCG COT AAG CTC CCA CAA CAC TGA GTC CTT AAG COT GAG TGG 60  
 121 Glu-Ser-Phe-Ser-Asn-Gly-Ala-Ile-Ser-Gly-Ala-Val-Thr-Gln-Glu-Ser-Ala-Leu-Thr 140  
 Linker  
 421 ACA TCA COT GGT GAA ACA GTC AAT CTC ACT TGT CCG TCA AGT ACT GGG GGT GTT ACA ACT 480  
 TGT AGT GCA CCA CTT TGT CAG TGT GAC TGA ACA GCG AGT TCA TGA CCG CCA CAA TGT TGA 60  
 141 Thr-Ser-Pro-Gly-Glu-Val-Thr-Thr-Leu-Thr-Cys-Arg-Ser-Ser-Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr 160  
 481 CTT AAT TAT GGC AAT TGG GTC CAA GAA AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT 540  
 CTA TTT AAT CCG AAG ACC GAT CTT CTT TTT GGT CTA GAT CAT TAT CAT GAT TAT CCA 60  
 161 Leu-Asn-Tyr-Ala-Asn-Trp-Val-Gln-Glu-Lys-Pro-Asp-His-Leu-Phe-Thr-Gly-Leu-Ile-Gly 180  
 541 AAT ACC AAC AAC CCA COT CCA GGT GGT COT CCG AAG TCC TCA GGC TCC CCG AAT GCA GAC 600  
 TGA TGG TGT TTT GAT CTT ACC TCC GGT CCA AAA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA 200  
 181 Asn-Thr-Asn-Asn-Gly-Ala-Pro-Gly-Ala-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Leu-Ile-Gly-Ser 200  
 601 AAG COT GGC CTC ACC ATC ACA GGG CCA CAG ACT GAG GAT GAG GCA ATA TAT TTC TGT GCT 660  
 TTC CCA CCG AAG TGG TAG TGT CCG COT TCT TGA CTA CTA CTA COT COT TAT ATA AAG ACA GCA 60  
 201 Lys-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Thr-Ala-Cys-Gln-Thr-Ala-Glu-Thr-Ala-Glu-Thr-Ala-Ile-Thr-Phe-Cys-Ala 220  
 661 CTA TGG TAC AAG AAC CAT TTT GTC TTC GGT GGA GCA ACC AAA CTG ACT GTC CTA GGC 717  
 GAT ACC ATG TCG TGT GTA AAC CAC CCA COT COT TGT TTT GAC TGA CAG GAT CCG 60  
 221 Leu-Trp-Tyr-Ser-Asn-His-Leu-Val-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-Leu-Thr-Val-Leu-Gly 239

【 図 6 】

第 6 図

D x3860LH seFv

1 CAG COT GTT GTG ACT CAG GAA TCT CCA CTC ACC ACA TCA COT GGT GAA ACA GTC ACA CTC 60  
 CTC CCA CAA CAC TGA GTC CTT AAT AAG ACA CCA GAT ACC ATG TCG TTG GTA CAC CAC AAG 60  
 1 Glu-Ala-Val-Val-Thr-Gln-Glu-Ser-Ala-Leu-Thr-Thr-Ser-Pro-Gly-Glu-Thr-Val-Thr-Leu 20  
 61 ACT TGT CCG TCA AGT ACT GGG COT GTT ACA ACT CTT AAC TAT GCC AAC TGG CCG CAA GAA 120  
 TGA ACA CCG AGT TGA TGA CCG CCA CAA TGT TGA GAA TGT AFA GCG TTG ACC GAG COT CTT 40  
 21 Thr-Cys-Arg-Ser-Ser-Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr-Leu-Asn-Tyr-Ala-Asn-Trp-Val-Gln-Glu 40  
 121 AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT AAT ACC AAC AAC CCA GCT CCA GGT GTT 180  
 TTT GGT CTA GTA AAT AAG TGA CCA GAT TAT CCA TTA TGG TTT GCT CCA GGT CCA CAA 60  
 41 Lys-Phe-Asp-His-Leu-Phe-Thr-Gly-Leu-Ile-Gly-Asn-Thr-Asn-Arg-Ala-Pro-Gly-Val 60  
 181 CTT GCG ACA TTC TCA GGC TCC CTT AAT GSA GAC AAC GCT GTC ACC ATC ACA GGG GCA 240  
 GGA GGG TCT AAG AAT CCG AGG GAC TAA COT CTG TCG CCA CCG GAG TGG TAG TGT CCG COT 60  
 61 Pro-Ala-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Leu-Ile-Gly-Asp-Lys-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Thr-Gly-Ala 80  
 241 CAG ACT GAG GAT GAG GCA ATA TAT TTC TST COT CTA TGG TCC ACC AAC CAT TTT GTG TTC 300  
 CTC TGA CTC CTA CTC COT TAT AAT AAG ACA CCA GAT ACC ATG TCG TTG GTA CAC CAC AAG 60  
 41 Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Thr-Ala-Ile-Tyr-Phe-Cys-Ala-Leu-Trp-Tyr-Ser-Asn-His-Leu-Val-Phe 100  
 301 GGT GGA GGA ACC AAA CTG ACT GTC CTA GGC TCC GSA GGA GGC GGT TCA GCG GGA GGT GGC 360  
 CCA COT COT TGG TTT GAC TGA CAG GAT CCG AAG COT COT CCG CCA AAT CCG COT CCA CCG 60  
 101 Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-Leu-Thr-Val-Leu-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser 120  
 Linker  
 361 TCT GCG COT GGC GGA TCC CAA CTG AAG CTG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG 420  
 ACA CCG CCA CCG COT AAG COT CAC TTC GAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC 60  
 121 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Val-Lys-Leu-Val-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Lys-Pro 140  
 421 GSA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TET GCA GGC TCT GSA TCT GCT ACT TTT AGT TCC TAT GCG ATG 480  
 COT CCG AAG GAC TTT GAG AAT AAT CCG AAG COT CCG AAG TGA AAG TGA AAG TGA AAG TGA 60  
 141 Gly-Gly-Ser-Leu-Lys-Leu-Ser-Cys-Ala-Ala-Ser-Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Arg-Ala-Ile-His 160  
 481 TCT TGG GTT CCG CAG ACT CCA GAG AAG AAG CTG GAG TGG GTC GCA TCC TTT AGT AAT GGT 540  
 CCG CCA CAA CAC TGA GTC CTT AAT AAG ACA CCA GAT ACC ATG TCG TTG GTA CAC CAC AAG 60  
 161 Ser-Trp-Val-Arg-Gln-Thr-Pro-Glu-Lys-Arg-Leu-Glu-Trp-Val-Ala-Ser-Phe-Ser-Asn-Gly 180  
 541 GGT AAT ACC TAT TAT CCA GAT GAT GAG GGC CCA TCC ACC ATC TCC AAG GAT AAT GCG 600  
 CCA TAG TGG ATG ATA GGT CTT GCA CAC TTC CCA CAC TTC CCA TAT CTA TTA CCG 60  
 181 Gly-Ile-Thr-Tyr-Tyr-Pro-Asp-Ser-Val-Lys-Gly-Ser-Arg-Phe-Thr-Ile-Ser-Arg-Asp-Ala 200  
 601 AAG AAC ATC CTC TAC CTG CAA ATG ACC AAT CTG AAG TCT GAG GAG AAG CCG AAT TAT TAT 660  
 TCC TGG TAG GAC ATG GAT TAT TCC TCA GAC TCC ACA CTA CTC TGC CCG TAA ATA ATG 60  
 201 Arg-Asn-Ile-Leu-Tyr-Leu-Gln-Met-Thr-Ser-Leu-Phe-Thr-Ser-Leu-Phe-Thr-Ala-Ile-Thr 220  
 661 TGT GCA ACA GAG CAT GGT COT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTC CTC ACT COT TCT CCA 720  
 CCA CCG TCT CCG AFA CCA GCA GCA ATG ACC CCG CTT CCG TCA GAG CAG TCA CAG AAG 60  
 221 Cys-Ala-Arg-Gly-Tyr-Gly-Pro-Ala-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Leu-Val-Thr-Val-Ser-Ala 240

【 図 7 】

第 7 図

D x3150HL seFv

1 GAT GTA CAG CTT CAG GAG TCA GCA COT GGC CTC GTG AAA COT TCT CAG TCT CAG TCT CTC 60  
 CTA COT GTC GAA GTC CTC AGT COT GGA CCG GAG CAC TTT GGA AAG GTC AAG GAC AAG GAC 60  
 1 Asp-Val-Gln-Leu-Gln-Gly-Pro-Gly-Ala-Val-Lys-Pro-Ser-Gln-Ser-Leu-Ser-Leu 20  
 61 ACC TGT TCT GTC ACT GGC CAG TCC ATC ACC AAT GGT TTT TAC TGG AAG TGT AAT CCG CAG 120  
 TGA CCA AAG CAG CAG AAG TGA CCG AAT AAG TGA CCG AAT AAG TGA CCG AAT AAG TGA CCG 40  
 21 Thr-Cys-Ser-Val-Thr-Gly-Tyr-Ser-Ile-Thr-Ser-Gly-Phe-Tyr-Trp-Asn-Trp-Ile-Arg-Gln 40  
 121 TTT CCA GGA AAC AAA CTG GAA TGG ATG GGC TAC ATA ACC TAC GAC GGT TAC AAT AAT TAC 180  
 TGA TGG TGT TTT GAT CTT ACC TAC CAG AAG TGG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG 60  
 41 Phe-Pro-Asn-Asn-Lys-Leu-Gly-Trp-Met-Gly-Ile-Tyr-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Tyr-Asn-Asn-Tyr 60  
 181 AAC CCA TTT CTC AAA AAT CCA GAG TCC ATC ACT CCG GAC ACA TCT GAG AAC CAG TTT TTC 240  
 TTT GGT AAA GAG TTT TTA COT CAC AAG TAG TGA GCA CTG TGT AAG CTC TTT GTC AAA AAG 60  
 61 Asn-Pro-Phe-Leu-Lys-Asn-Arg-Val-Ser-Ile-Thr-Arg-Asp-Thr-Ser-Glu-Asn-Gln-Phe-Phe 80  
 241 CTC AAT TGT CMT TCT GTG ACT AAT GAG ACA CCA ACT CCA TAT TAC TGT GTA AAT TAC GCT 300  
 GAC TTC AAC GTA AAG CAC TGA CTA COT CCG TGT ATA ATG ACA CAT TCA ATG CCA 60  
 81 Lys-Leu-Lys-His-Ser-Val-Thr-Thr-Glu-Asp-Thr-Ala-Thr-Tyr-Tyr-Cys-Val-Ser-Tyr-Gly 100  
 301 AOT CCG AAG GCA ATT ACC TAC TGG GCG CAA GGT ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCC GGA GGA 360  
 TCA GCT TCC COT CAA TGG ATG AAT CCG GTT CCA TGA TGA GAG TGT CAG AAG AAG COT COT 60  
 101 Ser-Arg-Arg-Gly-Val-Thr-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Thr-Leu-Thr-Val-Ser-Ser-Gly-Gly 120  
 361 GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGT TCT GCG GGT GGC GCA TCC CAG GCT GTT GTC ACT CAG GAA 420  
 CCG CCA AAT CCG CTT ACC TAC CAG AAG CCG CCA CCG CCG AAG GTC CAA CAC TGA GTC CTT 60  
 121 His-Ser-Phe-Ser-Asn-Gly-Ala-Ile-Ser-Gly-Ala-Val-Thr-Gln-Glu 140  
 Linker  
 421 TCT GCA COT ACC ACA TCA COT GGT GAA ACA GTC ACA CTC ACT TGT CCG CCA AAT ACT GGC 480  
 AAG COT GAG TGG TGT AAT GCA CCA COT TCT CAG TGT GAG TGA ACA GCG AAT TCA TGA CCG 60  
 141 Ser-Ala-Leu-Thr-Thr-Ser-Gly-Glu-Thr-Val-Thr-Leu-Thr-Cys-Arg-Ser-Ser-Thr-Gly 160  
 481 GCT GGT ACA ACT AAT AAC TAT GCG AAC TGG COT CCA GAA AAA CCA GAT CAT TTA TTT ACT 540  
 CCA CAA TGT TGA TCA TTT AFA CCG FTG ACC CAG GTT CTT TTT GGT CTA GTA AAT AAG TGA 60  
 161 Ala-Val-Thr-Thr-Ser-Tyr-Ala-Asn-Trp-Val-Gln-Glu-Lys-Pro-Asp-His-Leu-Phe-Thr 180  
 541 GGT CTA AAT GGT AAT ACC AAC CCA COT CCA GGT GGT COT GGC AAG TCC TCT GGC TCC 600  
 CCA GAT TAT CCA TTA TGG TTT TTT CCA GGT CCA AAA CCA GCG CCG TCT AAG AAT CCG AAG 60  
 181 Gly-Leu-Ile-Gly-Asn-Thr-Asn-Asn-Arg-Ala-Pro-Gly-Val-Pro-Ala-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser 200  
 601 CTG AAT GGA GAG AAG COT CCG CTT ACC ATC ACA GGG CCA CAG ACT GAG GAT GAG GCG ATA 660  
 GAC TAA COT CTT TTT CCA CCG GAG TGG TGG TGT CCG COT GTC TGA CTC CTA CTC CCG TAT 60  
 201 Lys-Ile-Gly-Asp-Lys-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Thr-Gly-Ala-Gln-Thr-Glu-Ser-Glu-Ala-Ile 220  
 661 TAT TTT TGT GGT CTT TGG TAG AAC ACC AAT TTT GTC GGT GGA GGA ACC AAG CTC ACT 720  
 ATA AAG ACA CCA GAA ACC ATG TGT TGG GTA AAC CAG AAG CCA COT COT TGG TCT GAC TGA 60  
 221 Tyr-Phe-Cys-Ala-Leu-Trp-Tyr-Gly-Ser-Arg-Arg-Gly-Val-Thr-Thr-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr 240

【 図 8 】

第 8 図

D x3150LH seFv

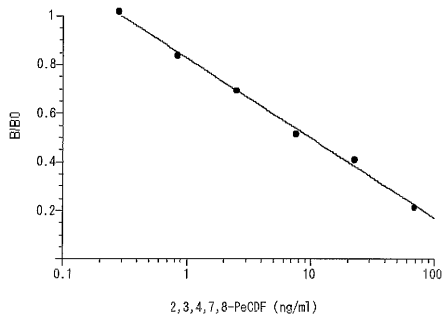
1 CAG COT GTT GTG ACT CAG GAA TCT CCA CTC ACC ACA TCA COT GGT GAA ACA GTC ACA CTC 60  
 CTC CCA CAA CAC TGA GTC CTT AAT AAG ACA CCA GAT ACC ATG TCG TTG GTA CAC CAC AAG 60  
 1 Glu-Ala-Val-Val-Thr-Gln-Glu-Ser-Ala-Leu-Thr-Thr-Ser-Pro-Gly-Glu-Thr-Val-Thr-Leu 20  
 61 ACT TGT CCG TCA AGT ACT GGG COT GTT ACA ACT CTT AAC TAT GCC AAC TGG CCG CAA GAA 120  
 TGA ACA CCG AGT TGA TGA CCG CCA CAA TGT TGA GAA TGT AFA GCG TTG ACC GAG COT CTT 40  
 21 Thr-Cys-Arg-Ser-Ser-Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr-Leu-Asn-Tyr-Ala-Asn-Trp-Val-Gln-Glu 40  
 121 AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT AAT ACC AAC AAC CCA GCT CCA GGT GTT 180  
 TTT GGT CTA GTA AAT AAG TGA CCA GAT TAT CCA TTA TGG TTT GCT CCA GGT CCA CAA 60  
 41 Lys-Pro-Asp-His-Leu-Phe-Thr-Gly-Leu-Ile-Gly-Asn-Thr-Asn-Asn-Arg-Ala-Pro-Gly-Val 60  
 181 COT GCG ACA TCT TCC TCC GGC TCC COT ATG GGA GAC AAG GGT CCG COT ACC ATC ACA GGG GCA 240  
 GSA GGG TCT AAG AAG CCG AAG TAA COT CTG TTC CCA GCG AAG TGG TAG TGT CCG COT 60  
 61 Pro-Ala-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Leu-Ile-Gly-Ser-Lys-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Thr-Gly-Ala 80  
 241 CAG ACT GAG GAT GAG GCG AFA TAT TTC TGT COT CTT TGG TAC AAC ACC CAT TTT GTG TTC 300  
 CTC TGA CTC CTA CTC CCG TAT AAT AAG ACA CCA GAT ACC ATG TCG TGG GTA CAC CAC AAG 60  
 81 Thr-Cys-Arg-Ser-Leu-Thr-Gly-Ala-Ile-Tyr-Phe-Cys-Ala-Leu-Trp-Tyr-Asn-Thr-His-Leu-Val-Phe 100  
 301 GGT GGA GGA ACC AAA CTG ACT GTC CTA GGC TCC GSA GGA GGC GGT TCA GCG GGA GGT GGC 360  
 CCA COT COT TGG TTT GAC TGA CAG GAT CCG AAG COT COT CCG CCA AAT CCG COT CCA CCG 60  
 101 Gly-Gly-Gly-Thr-Arg-Leu-Thr-Val-Leu-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser 120  
 Linker  
 361 TCT GCG GGT GGC GGA TCC GAT GTA CAG CTT CAG GAG TGA CCA COT GGC CTT GTG AAA COT 420  
 AAG CCG CCA CCG COT AAG COT CAC TTC GAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC 60  
 121 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Val-Lys-Leu-Val-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Lys-Pro 140  
 421 TCT CAG TCT CCG TCT CTC ACC TGT TCT GCT ACT GGC AAC TCC AAT ACC AAT GGT TTT 480  
 AAG GTC AAG AAC AAG TGG ACA AAG CAG TGA CCG AAT AAG TGG TGG TCA CCG AAA TTT 60  
 141 Ser-Gln-Ser-Leu-Ser-Leu-Thr-Cys-Ser-Val-Thr-Gly-Tyr-Ser-Ile-Thr-Ser-Gly-Phe-Tyr 160  
 481 TGG AAT TGG ATT CCG GAT TTT CCA GAG AAC AAA CTS GAA TGG ATG GGC TAC ATA ACC TAC 540  
 CCG TGG ACT TAA GCG COT AAA GGT CTT TTT TTT GAT COT ACC TCC CCG AAG TGT GGT AAT 60  
 161 Trp-Asn-Trp-Ile-Arg-Gln-Phe-Pro-Gly-Asn-Lys-Leu-Trp-Met-Gly-Tyr-Ile-Thr-Thr 180  
 541 GAC GGT TAC AAT AAT TAC AAC CCA TTT CTC AAA AAT CCA GGT TCC ATC ACT COT GAC ACA 600  
 CCA CCG TCA CCA CCG COT CCA CCG COT CCA CCG COT CCA CCG COT CCA CCG COT CCA CCG 60  
 181 Asp-Gly-Tyr-Asn-Asn-Tyr-Asn-Pro-Phe-Leu-Lys-Asn-Arg-Val-Ser-Ile-Thr-Arg-Asp-Thr 200  
 601 TCT GAG AAC CAG TTT TTC CTG AAG TTT CAT TCT GTC ACT ACT GGC ACA COT ACA TAT 660  
 AAG CCG TGC CTC AAA AAG AAC TTC AAC GTA AAG CCA TGA CAG TGA COT CTG TGT CCA TGT AFA 60  
 201 Ser-Glu-Asn-Gln-Phe-Leu-Leu-Lys-Leu-His-Ser-Val-Thr-Glu-Asp-Thr-Ala-Thr-Ala-Ile 220  
 661 TAC TGT GFA AGT TAC GGT AGT GCG AAG GGA GTT ACC TAC TGG GCG CAA GCG ACC ACT CTC 720  
 ATT ACA CAT TCA ATG CCA TCA CCG TCC COT CAA TGT AAT ACC CCG GTT CCG TGG TGA GAG 60  
 221 Tyr-Cys-His-Leu-Tyr-Gly-Ser-Arg-Arg-Gly-Val-Thr-Thr-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Thr 240

721 GTC CTA GGC 729  
CAG GAT CCG  
241 Val-Leu-Gly 243

721 ACA GTC TCC TCA 732  
TGT CAG AGG AGT  
241 Thr-Val-Ser-Ser 244

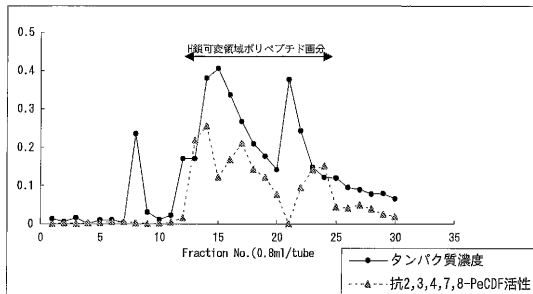
【 図 9 】

第 9 図



【 図 10 】

第 10 図



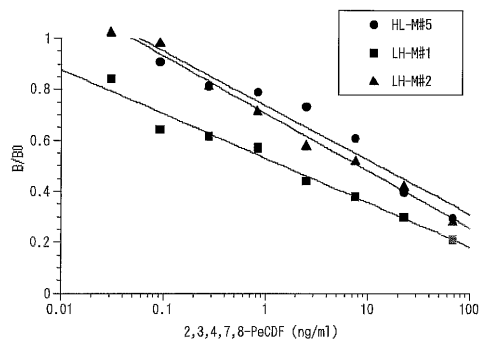
【 図 11 】

第 11 図



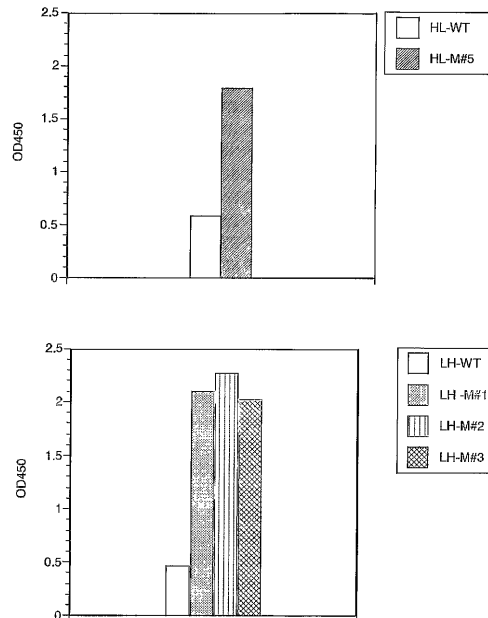
【 図 12 】

第 12 図



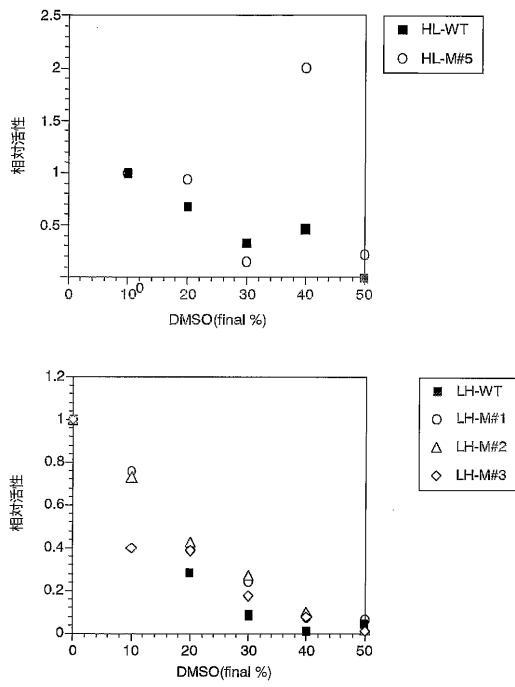
【 図 13 】

第 13 図



【 図 1 4 】

第 1 4 図



【 配列表 】

0004077481000001.xml

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>		C 1 2 N 5/00	A
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>		C 1 2 P 21/08	
<b>G 0 1 N 33/00 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/00	D
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/53	S

(72)発明者 日向野 桂一  
京都府京都市南区吉祥院新田二ノ段町68 京都電子工業株式会社内

(72)発明者 片岡 千和  
京都府京都市南区吉祥院新田二ノ段町68 京都電子工業株式会社内

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 特開2002-119279(JP, A)  
大村直也 他, 免疫測定(イムノアッセイ)法, 環境管理, 2003年 3月10日, Vol. 39, No. 3, p. 19-23  
Toxicology. 1987, Vol.45, No.3, p.229-243

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/00-16/46  
C12N 15/00-15/90  
PubMed  
JSTPlus(JDream2)  
JMEDPlus(JDream2)  
SwissProt/PIR/Geneseq  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

专利名称(译)	识别二恶英的重组抗体和编码所述抗体的基因		
公开(公告)号	<a href="#">JP4077481B2</a>	公开(公告)日	2008-04-16
申请号	JP2005504305	申请日	2004-03-26
申请(专利权)人(译)	京都电子工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	京都电子工业株式会社		
[标]发明人	澤田石一之 日向野桂一 片岡千和		
发明人	澤田石 一之 日向野 桂一 片岡 千和		
IPC分类号	C07K16/44 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/00 G01N33/53 C12N15/13		
CPC分类号	G01N33/5308 C07K16/44		
FI分类号	C07K16/44 C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/08 G01N33/00.D G01N33/53.S		
代理人(译)	田中，三夫 山田卓司 柴田康夫 Morizumi健一		
审查员(译)	清水慎		
优先权	2003091663 2003-03-28 JP		
其他公开文献	JPWO2004087764A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明提供了一种新的重组抗体，它具有对编码氨基酸序列的基因2,3,4,7,8-五氯二苯并咪唑(2,3,4,7,8-PeCDF)的结合活性，引入基因的载体，用载体转化转化，产生重组抗体的方法，免疫捕获方法和使用重组抗体测量2,3,4,7,8-PeCDF关于法律。使用本发明的重组抗体，可以通过免疫学技术快速，方便且高灵敏度地捕获和测量二恶英，特别是2,3,4,7,8-PeCDF。

表 1 : D x 3 8 6 0 のH鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Tyr-Ala	配列番号 9
CDR 2	Phe-Ser-Asn-Gly-Gly-Ile-Thr	配列番号 1 0
CDR 3	Ala-Arg-Gly-Tyr-Gly-Pro-Ala-Tyr	配列番号 1 1

表 2 : D x 3 8 6 0 のL鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr-Leu-Asn-Tyr	配列番号 1 2
CDR 2	Asn-Thr-Asn	
CDR 3	Ala-Leu-Trp-Tyr-Ser-Asn-His-Leu	配列番号 1 3

表 3 : D x 3 1 5 0 のH鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Gly-Tyr-Ser-Ile-Thr-Ser-Gly-Phe-Tyr	配列番号 1 4
CDR 2	Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Tyr-Asn	配列番号 1 5
CDR 3	Val-Ser-Tyr-Gly-Ser-Arg-Arg-Gly-Val-Thr-Tyr	配列番号 1 6

表 4 : D x 3 1 5 0 のL鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr-Ser-Asn-Tyr	配列番号 1 7
CDR 2	Asn-Thr-Asn	
CDR 3	Ala-Leu-Trp-Tyr-Asn-Thr-His-Leu-Val	配列番号 1 8