

Productions, characterizations, and
applications of monoclonal and recombinant
antibodies against daidzin and paclitaxel

ガラウィット, ユサカル

<https://hdl.handle.net/2324/1806962>

出版情報：九州大学, 2016, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



氏 名	ユサクル ガラウイット
論 文 名	Productions, characterizations, and applications of monoclonal and recombinant antibodies against daidzin and paclitaxel (ダイジンとパクリタキセルに対するモノクローナル抗体と組換え抗体の作製、特性評価並びに応用研究)
論文調査委員	主 査 九州大学 准教授 田中宏幸 副 査 九州大学 教授 森元 聰 副 査 九州大学 教授 植田 正 副 査 九州大学 准教授 宮本智文

論文審査の結果の要旨

ユサクル・ガラウイット氏は有用な生理活性成分であるダイジンとパクリタキセルに対するモノクローナル抗体(MAb)と組換え抗体に関する研究を遂行し、その成果を博士論文としてまとめた。予備審査で指摘した内容に対して適切に修正し、本審査用論文として完成させていた。

ユサクル氏は、簡便で高感度なイムノアッセイに着目し、有用な特性を備えたモノクローナル抗体を自ら試行錯誤の末に作製し、二種類の異なった特性を有する抗ダイジン MAb を作製した。MAb の作製において特筆すべきは、免疫原の調製にあり、従来一般的に採用されてきた過ヨウ素酸酸化法で作製した免疫原を用いた場合には、幅広い交差反応性を有する抗体が産生され、一方、マンニッヒ反応を用いて調製した免疫原を用いた場合には、配糖体であるダイジンのみを選択的に認識する抗体が産生されることを見出した。この結果は、今後、その他のフラボノイドに対する抗体作製を行う上で、極めて有用な知見になると考える。さらに、簡便高感度な間接競合法による enzyme-linked immunosorbent assay (icELISA) を確立し、本手法の定量的分析法としての有用性も詳細に検証している。また、安価に大量調製可能な組換え抗体である single-chain Fv (scFv) も作製し、カイコを用いた効率的な調製システムを確立した。従来、組換え抗体の作製には、大腸菌を宿主とした発現系が用いられてきたが、発現した抗体は不活性な状態で不溶性画分に発現することが多く、煩雑な巻き戻し操作が必要であった。ユサクル氏は巻き戻しを必要としない組換えタンパク質の発現系として、カイコ幼虫を宿主として体液に活性を保持した scFv を発現することに成功した。調製した scFv の抗原認識能やその特性を icELISA で評価し、イムノアッセイに活用できることを示したことは、興味深い内容であった。

さらに、ユサクル氏は、現在重要な抗癌剤として利用されているパクリタキセルに対する組換え antigen-binding fragment (Fab) を作製した。先行研究により、scFv に比べて安定性に優れている Fab に着目し、抗ハクリタキセル MAb 產生ハイブリドーマを材料として組換え Fab の作製を進めた。その過程で、マウス由来 Fab の巻き戻し効率の違いを発見し、CH1 領域の配列の違いによる巻き戻し効率の違いを詳細に解析し、興味深い知見を得ている。即ち、マウス IgG の重鎖は 4 種類知られており、抗パクリタキセル MAb は IgG2a であった。抗パクリタキセル Fab の巻き戻しを行ったところ、その巻き戻

し効率は低く、そこで、CH1 領域の改変を企図した。四種類すべてのタイプの組換え Fab を調製し、大腸菌を用いて各 Fab フラグメントを発現させ、巻き戻しを行った。その結果、興味深いことに各々のタイプの Fab の再生効率に違いが認められ、IgG1 タイプの Fab が最も高い巻き戻し効率であった。また各組換え Fab の活性にも違いがあり、IgG1, IgG2b タイプの Fab がより高い反応性を示すことを明らかにした。今回の成果は、組換え抗パクリタキセル Fab の調製のみならず、他の組換え Fab の調製にも応用可能と考えられることから、ユサクル氏の博士論文の研究成果として重要な内容と評価した。作製した組換え抗パクリタキセル Fab について、icELISA による評価を行い、反応性、選択性がオリジナルの抗パクリタキセル MAb と同様であり、その有用性を詳細に評価している。これらの成果は、今後、より機能性が高い組換え Fab の設計などへ展開できる基盤となるもので、イムノアッセイのツールとして Fab の利用が広がる可能性が示されたと考えている。

以上の成果をまとめた博士論文は、充実した内容であり、詳細かつ適切に記述されていた。また、実験結果を科学的に考察し、その結果がどのように薬学分野に貢献できるのかを明確に示していた。ダイジンやパクリタキセルのように広く知られた有用な天然由来生理活性成分をより有効に活用する上で、各化合物を正確に分析することは最も基本となる情報である。健康食品や生薬原料、さらに、生体内の天然由来医薬品やその代謝物を迅速、簡便に分析する場合に、イムノアッセイは他の機器分析とは異なる特性を持ち、注目されている。本博士論文は、低分子化合物を対象としたイムアッセイを構築する上で最も重要な高い機能性を有した MAb および組換え抗体の調製について、示唆に富む結果を含んでおり、今後との当該生薬学領域の研究に生かされるものと考える。総合的に判断した結果、ユサクル氏の博士論文は薬用植物由来生理活性化合物に対する抗体の作製とイムノアッセイの構築に関する先端的な研究内容を含んでおり、ユサクル氏は博士として相応しい成果を上げたと判断し、博士（創薬科学）の学位に値すると認める。