

生体における免疫反応を単クローン抗体のレベルでより詳細に解析するために、抗体可変部位の塩基配列を知ることができれば、有益な情報が得られると考えられる。

今回用いた3種類のハイブリドーマに対して、使用した市販のプライマーセットはいずれもL ( $\kappa$ ) 鎖について用意された7種類の何れか(複数)で増幅できた。ところで、H鎖の可変部位をクローニングすることができたのは2D5のみで、5G2および9F12においてはBプライマーに弱い反応が認められたが、この産物から直接シーケンシングすることはできなかった。これらの結果は、L鎖に比べて、H鎖のほうがより可変領域が多様性に富んでいることを示唆する。

個々のプライマーペアで行うPCRは、H鎖で6種類、L鎖で7種類、合計13のプライマーペアによる操作が必要になる。そこで、Novagen社のプロトコールには用意されていないが、H鎖とL鎖についてマルチプレックスPCRを行った。得られた増幅産物を3' constant region primerによるシーケンシングで解析する手順が、PCRを4反応、シーケンスに用いるプライマーを1種類ですますことができ、最も効率的であると考えられたからである。そこで、マルチプレックスPCRを試みたところ、すべてのハイブリドーマにおいて個々のプライマーセットを用いたときと矛盾する反応は起きず、増幅されることが確認できた。さらに共通する3' primerを用いてシーケンシングを試みたところ、PCRの8反応のうち4反応はシーケンス可能であった。このことは、2D5及び9F12についてはこの段階でシーケンシングまで終わることが出来たことになる。5G2については、ABによるマルチプレックスPCRでの反応物を5' primerのAでシーケンシング出来たことになる。すなわち、マルチプレックスPCRでの反応物を3' primerでシーケンスし、解析できなかったものについては、いずれかの5' primerによってシーケンスを決めることができることが分かった。しかしながら、解析に要するさらなる省力化が求められる。

そこで、数多くのハイブリドーマが生産されて、その群別が急がれるとき、今回のPCR及びシーケンシングの結果から、市販の個々のプライマーによるPCR反応のH鎖及びL鎖のスコア化したパターンを比較をすることが手段の一つとし

て考えられた。表1に示されたハイブリドーマのスコアの多様性がそれを示している。H鎖はともかく、3種類すべてのハイブリドーマで増幅されたL鎖のみのパターンを比較する群別法がさらに省力的と考えられる。さらにハイブリドーマの数を増やして検討していく必要があると考える。

ところで、シーケンスの解析されたL鎖の配列を予備的ではあるが比較したところ、3種類のハイブリドーマとも明確な差は認められなかった。L鎖増幅部位における均一性は、H鎖の可変部の多様性を示唆するのか、あるいは日脳ウイルスNS1に対するハイブリドーマに特徴的なものであるのか等については、今後の解析を待ちたい。

## E. 結論

DNAワクチンをマウスに免疫後、作製したハイブリドーマにおける抗体可変部位のシーケンス配列を迅速に解析する方法を探った。マウスの免疫グロブリン可変部を増幅するために用意された市販の17種類のプライマーを複数単位で組合わせたマルチプレックスPCR法を導入し、H及びL鎖のそれぞれの可変部を増幅できること、増幅産物はダイレクトシーケンス法によって直接塩基配列が確定できることを明らかにした。一方、現時点では、用意されたプライマーセットによるPCR反応のパターンからの解析も検討に値する。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

特になし。

### 2. 学会発表

特になし。

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

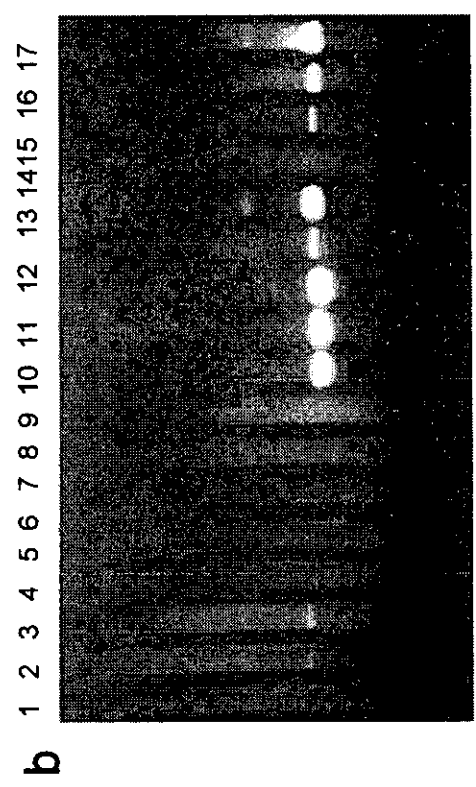
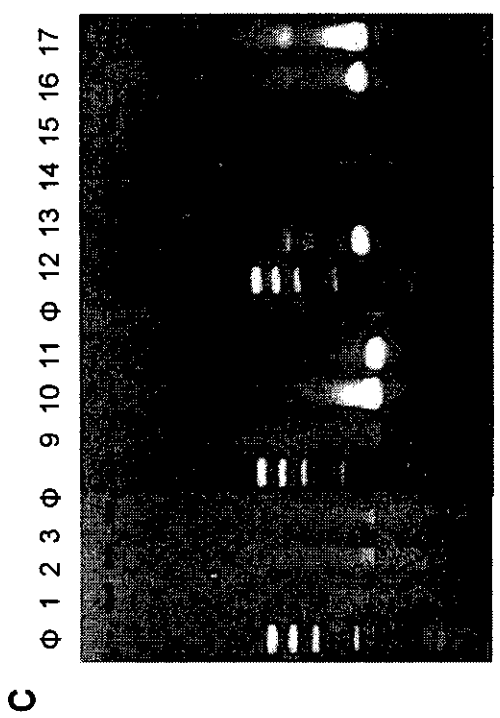
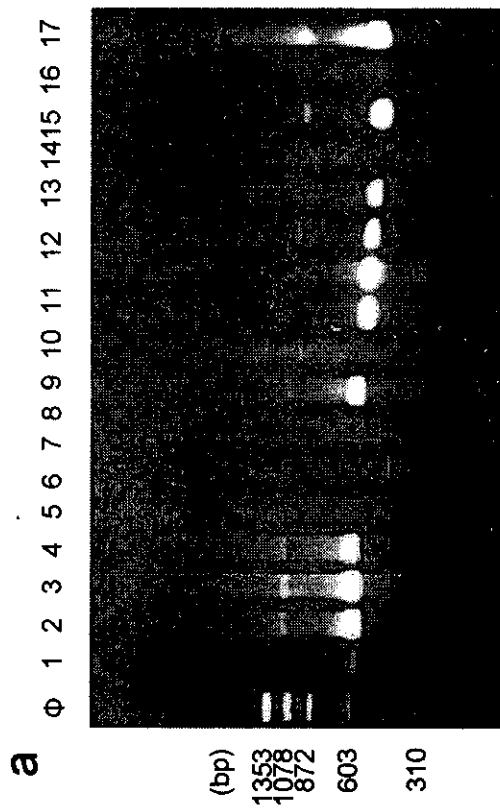
特になし。

### 2. 実用新案登録

特になし。

### 3. その他

特になし。



**図1** ハイブリドーマ2D5(a), 5G2(b)及び9F12(c)における、5' leader primer、A-G、によるPCR及びβマ ルチブレックスPCR。レーン1-8はH鎖、レーン9-17 はL(kappa)鎖に対するPCR。レーン3と11は、A&B、8 はC-F、17はC-GによるマルチブレックスPCR。さら に、レーン1-8は、3と8を除いて順にA-Fを、レーン 9-17は、11と17を除いて順にA-Gを示す。Φは分子 量マーカーである。

表1 抗体可変部に対するプライマーでのPCR

H鎖/L鎖	プライマー	ハイブリドーマ		
		2D5	5G2	9F12
H	A	w*	-	-
	B	4	w	w
	C	3	-	-
	D	-	-	-
	E	-	-	-
	F	-	-	-
L	A	-	4	-
	B	3	4	3
	C	2	1	3
	D	2	3	-
	E	-	-	-
	F	3	1	-
	G	-	2	3

\*: PCR反応を泳動産物の強弱で順に-, w, 1~4で示

表2 抗体可変部に対するマルチプレックスPCR

H鎖/L鎖	プライマー	ハイブリドーマ		
		2D5	5G2	9F12
H	A,B	4	w	w
	C-F	3	-	-
L	A,B	3	4	3
	C-G	3	3	4

\*: PCR反応を泳動産物の強弱で順に-, w, 1~4で示す

表3 マルチプレックPCR産物のシーケンシング

ハイブリドーマ	H鎖/L鎖	PCRプライマー	シーケンスプライマー	シーケンス解析*
2D5	H	A,B	B	○
			3'	○
		C-F	C	○
			3'	○
	L	A,B	B	○
			3'	○
		C-G	C	○
			3'	△
5G2	L	A,B	A	○
			B	△
			3'	×
		C-G	C	△
			D	×
			F	×
			G	△
			3'	×
9F12	L	A,B	B	○
			3'	○
		C-G	C	○
			G	○
			3'	×

\*: ○、解析可能、△、部分的に可能、×、解析不可能