

厚生労働科学研究費補助金（慢性の痛み政策研究事業）  
分担研究報告書

自家製 Elisa 用抗体の作製

研究分担者 渡邊 政博 就実大学薬学部・講師  
研究協力者 友野 靖子 岡山大学医学部客員研究員

**研究要旨**

本研究は、「血中 HMGB1 レベルが疾患横断的な慢性疼痛患者の簡便な客観的評価法になる」との仮説を実証することを目的とする。臨床におけるそれぞれ基礎疾患の異なる慢性疼痛患者 200 名の血中 HMGB1 レベルを測定するに当たり、自家製 Elisa 用抗体の作製を担当する。測定値と臨床症状との連関について、解析結果を検討し、客観性と有用性を備えた評価法となり得るか否かを判定する。

**A. 研究目的**

がん性疼痛や神経障害性疼痛では、持続的激痛から自殺念慮が生じることも稀ではない。このような痛みの状態では、仕事や学業を継続することが困難になるだけでなく、最低限の社会生活を営むことすら難しくなる。これまで世界的に、痛み知覚に関与する分子群を解析し、それに基づく治療薬開発が実施され、またリポジショニング薬が登場してきたが、著効する薬物は存在せず、また痛みの軽減を評価するための簡便な客観的評価法は確立されていない。

研究代表者が長年継続してきた生体における炎症反応の研究を背景に立てた仮説：「血中 HMGB1 レベルが疾患横断的な慢性疼痛患者の簡便な

客観的評価法になる」を実証することを本研究の目的とする。臨床におけるそれぞれ基礎疾患の異なる慢性疼痛患者 200 名の血中 HMGB1 レベルを測定するに当たり、自家製 Elisa 用抗体の作製を担当する。測定値と臨床症状との連関について、解析結果を検討し、客観性と有用性を備えた評価法となり得るか否かを判定する。

**B. 研究方法**

ラット抗 HMGB1 単クローン抗体として、#10-22, #4-1, #11-19 の 3 種類の抗体産生クローン細胞を培養し、回収された上清から、それぞれの単クローン抗体をアフィニティ精製して実験に用いた。#10-22, #4-1, #11-19, OKY-001 を固相化に用いた場合と、

HRP 標識抗体として検出に用いた場合の最適な組み合わせを決定した。

スタンダードとして用いる HMGB1 は、LPS-free とすることに留意し、昆虫細胞 sf-9 を用いて製造した。

#### C. 研究結果

自家製 Elisa に用いるサンドイッチ抗体の組み合わせでは、固相化に OKY-001 抗体を、検出に HRP 標識の #4-1 抗体を用いると最も高い感度が得られることが分かった。

Shino-test 製の Elisa と自家製では、感度に大きな差は認められなかった。

#### D. 考察

B-box 内をエピトープする #4-1 と、C 末端をエピトープする OKY-001 が、同じエピトープ認識抗体と考えられる #11-19, #10-22 の組み合わせより優れていることから、HMGB1 立体構造のエピトープ認識において微妙な差があると推定された。

自家製 Elisa と Shino-test 製で認められた検体測定時の若干の食い違いに関して、次年度の課題とした。

#### E. 結論

自家製 Elisa に用いる 2 種類の抗体を選抜した。検体測定に関する問題点を抽出した。

#### F. 研究発表

該当なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

#### H. その他

「痛みセンターを中心とした慢性疼痛診療システムの均てん化と診療データベースの活用による医療向上を目指す研究」(代表: 矢吹省司先生・福島県立医科大学)の研究班と連携して、本事業の推進を図る。

令和 5 年 3 月 19 日(日)に実施された班会議に参加し、情報共有を図るとともに今後の課題を確認した。