

ニバレノールに対するモノクローナル抗体の作製

角明里咲・富本 卓・川村 理

Producing of monoclonal antibodies against nivalenol

Arisa Kado, Suguru Tomimoto and Osamu Kawamura

Abstract

Nivalenol (NIV) and deoxynivalenol (DON) are typical B-type trichothecene mycotoxins, which frequently contaminate domestic wheat and barley, causing health hazards to humans and livestock. Many monoclonal antibodies (mAbs) against DON have been developed, and screening methods for DON in cereals by ELISA have been reported using these mAbs. However, there are no reports of the production of a specific antibody mAb against NIV. Therefore, NIV-oxime was prepared by oxime of carbonyl at the 8-position and bound to cationized bovine serum albumin (cBSA). We performed cell fusion of spleen cells from the mouse, which was immunized four times with NIV-oxime-cBSA, and succeeded in establishing NIV specific mAb producing hybridomas for the first time. Our NIV.9 mAb did not cross-reacted with NIV related compounds. NIV.10, 12, and 13 mAbs weakly cross-reacted with 15-acetyl DON. NIV.11 mAb cross-reacted with 15-acetyl DON, and weakly cross-reacted with DON and 3-acetyl DON. When NIV.10 and 11 mAbs with the highest NIV reactivity were used, 1 ng/mL of NIV could be detected in the optimized indirect competitive ELISA. We expect that a simple screening method for NIV in crops will be established by ELISA using these antibodies.

Key words : ニバレノール, nivalenol-oxime, モノクローナル抗体

緒 言

ニバレノール (nivalenol, NIV) は、デオキシニバレノール (deoxynivalenol, DON) と同様に代表的なトリコテセン系カビ毒であり、国内産の小麦や大麦を高頻度に汚染している⁽¹⁾。食品安全委員会は、NIVはDONより毒性が強いと評価している⁽²⁾ のにもかかわらず、規制値が設定されているのはDONのみであり⁽³⁾、NIVには設定されていない。その理由の1つとして、NIVに対する特異的抗体は未だに作製されておらず、抗体を用いた簡易分析法が確立されていないためと考えられた。NIVなどの低分子化合物は抗原性がないので、蛋白質などと結合させて抗原性を持たせてから抗体を作製する。しかし、NIVには直接蛋白質と結合する官能基を持たず、また、同程度の反応性を有するOH基を3つ持つので化学修飾が難しく、未だにNIV-蛋白質結合体作製の報告もない。そこで、本研究では、NIVのカルボニル基に着目し、

NIV-オキシム化体を作製 (図1) し、新規にNIV-蛋白質結合体を作製し、これを抗原として、抗NIVモノクローナル抗体 (mAb) の作製を行った。

方 法

試薬類

HPLC用のアセトニトリル、メタノール、酢酸とNIVは、富士フィルム和光純薬 (株) から、NIV, 4-acetyl NIV, DON, 3-acetyl DON, 15-acetyl DON 標準溶液 (100 µg/mL アセトニトリル溶液) は、関東化学工業 (株) から購入した。カルボキシメトキシルアミンヘミ塩酸塩はナカライテクス (株) から、Cationized ウシ血清アルブミン (cBSA) はサーモフィッシュャーサイエンティフィック (株) からそれぞれ購入した。その他の試薬は富士フィルム和光純薬 (株) の特級を使用した。

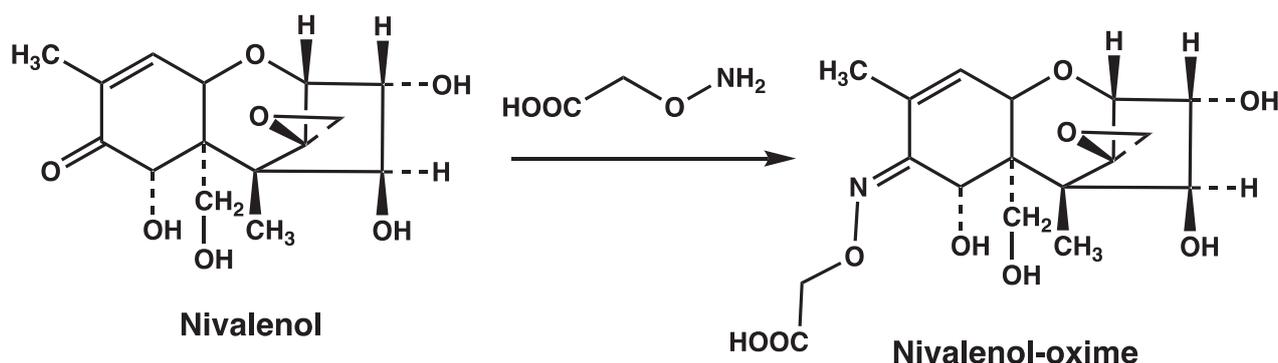


図1 Synthesis of nivalenol-oxime.

NIV-オキシム化の作製

NIV-オキシムはDON-オキシムの方法⁽⁴⁾を参考にして調製した。NIV (5 mg, 16 μmol) とカルボキシメトキシシラミンヘミ塩酸塩 (5.6 mg, 48 μmol) をそれぞれ1 mLのピリジンに溶解した。これらの溶液を合わせ、攪拌しながら40°Cで16時間反応させた。反応液は溶媒を留去した後、25 mLの水:メタノール:アセトニトリル (90:5:5, v/v/v) に再溶解した。NIV-オキシムは、分取HPLCで精製した。HPLCはいずれも(株)島津製作所のシステムコントローラー (SCL-10A_{vp})、送液ユニット (LC-20AD)、オートインジェクター (SIL-10AD vp)、カラムオープン (CTO-10A)、フォトダイオードアレイ検出器 (SPD-M20A)、カラムはShim-pack CLC-ODS 6.0 mm \times 15 cm (島津 GLC)、移動相は、水:メタノール:アセトニトリル:酢酸 (90:4:4:2, v/v/v/v) を用い、カラムオープン温度40°Cに設定し、254 nmをモニターした。

NIV-オキシム-タンパク質結合体の作製

精製 NIV-オキシム (0.46 mg, 1.20 μmol) を50 μL の水メタノール (90:10, v/v) に溶解し、オボアルブミン (OVA, 2.5 mg, 0.06 μmol) を820 μL の0.1 M 2-(*N*-モルホリノ)エタンスルホン酸 (MES) 緩衝液, pH 6.5に溶解した溶液に加え、これに2.0 mg (12 μmol)の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDPC) を添加した。この溶液を25°Cで30分間穏やかに攪拌した後、さらに2.0 mgのEDPCを追加した。この溶液を25°Cで一晩ゆっくり攪拌した。反応液をダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 1 Lに対して4°Cで4回透析した。NIV-オキシム結合OVAはELISAの固相抗原として使用した。

NIV-オキシム (0.46 mg) を *N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解し、*N*-ヒドロキシスクシンイミド0.14 mg およびジシクロヘキシルカルボジイミド0.2 mgを加え、25°Cで30分間攪拌しながら反応させた。次に、ウシ血清アル

ブミン (BSA) またはカチオン化BSA (cBSA) をPBSに1 mg/mLで溶解した溶液1 mLを加え25°Cで6時間ゆっくり攪拌しながら反応させた。反応液をPBS 1 Lに対して4°Cで4回透析した。

免疫

メスのBALB/cマウス (日本SLC (株)) それぞれ6匹に、初回はフロイド完全アジュバンド (富士フィルム和光純薬 (株)) と共にマウス1匹当たり50 μg のNIV-オキシム-BSAまたはNIV-オキシム-cBSAを皮下投与した。14日後にフロイド不完全アジュバンド (富士フィルム和光純薬 (株)) と共に同量を皮下投与した。さらに14日後にフロイド不完全アジュバンドと共に同量を腹腔内投与を2回行った。最終免疫7日後に採血し、NIV-オキシム-OVAを固相抗原として用いた間接ELISAと競合的間接ELISAで抗体価を測定した。抗体価の上昇の認められたマウスに細胞融合3日前にマウス1匹当たり10 μg のNIV-オキシム-cBSAを静脈投与した。

細胞融合およびクローニング

最終免疫3日後のマウスより脾細胞を取り出し、マウスミエロマー細胞SP2/O-Ag14と50%ポリエチレングリコール4000を用い常法により細胞融合を行った。HAT選択後、NIV-オキシム-OVAに対する結合活性 (間接ELISA) で、ハイブリドーマの選択を行い、限外希釈法により、2回以上のクローニングを行い、安定な抗CIT抗体産生ハイブリドーマを得た。

間接ELISA

マウスの抗体価の測定およびハイブリドーマの選択は、間接ELISAによって行った。すなわち、NIV-オキシム-OVA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.01 M炭酸-重炭酸緩衝液pH 9.6) を50 μL ずつ96-ウェルマイクロプレート (NUNC immunoplate II) の各ウェルに加え、4°Cで一晩静置しコーティ

ングを行った。プレートに0.05% (w/v) Tween 20を含むPBS (PBS/Tween) で3回洗浄したのち、各ウェルに0.1% OVA (PBS溶液) を125 μ Lずつ加え、室温で1時間静置し、ブロッキングを行った。プレートをPBS/Tweenで3回洗浄したのち、50 μ Lのマウス抗血清 (1/50~1/50,000) PBS希釈液または培養上清を加え、室温で1時間反応させた。プレートをPBS/Tweenで3回洗浄したのち、50 μ LのALP標識ヤギ抗マウスイムノグロブリン抗体 (BioSource International Inc., PBS/Tweenで1/4,000希釈) 加え、室温で45分間反応させた。プレートをPBS/Tweenで6回洗浄したのち、100 μ Lの

-ニトロフェニルリン酸を1 mg/mLになるように0.5 mMのMgCl₂を含む0.1Mジエタノールアミン緩衝液pH 9.8に溶解した基質溶液を加え、室温で30分間酵素反応させ、405 nmの吸光度を測定した。

競合的間接ELISA

間接ELISAと同様にコーティングとブロッキングを行った。PBSで希釈したNIVとNIV関連標準液を50 μ Lウェルに加え、このウェルにPBSで希釈したマウス抗血清または培養上清を加え、室温で1時間反応させた。以下の操作は、間接ELISAと同様に行った。

至適化した競合ELISA

NIV測定のために競合ELISAの至適化を行った。その結果、以下の方法で最も高感度で、NIVの検出ができた。その方法は、NIV-オキシム-OVA (0.5 μ g/mL, 0.01 M炭酸-重炭酸緩衝液pH 9.6) を50 μ Lずつ96-ウェルマイクロプレートの各ウェルに加え、4°Cで一晩静置しコーティングを行った。プレートをPBS/Tweenで3回洗浄したのち、各ウェルに0.1% OVA (PBS溶液) を125 μ Lずつ加え、室温で1時間静置し、ブロッキングを行った。プレートをPBS/Tweenで3回洗浄したのち、50 μ LのNIV又はNIV関連標準液と50 μ LのPBSで希釈した培養上清を加え、室温で1時間反応させた。プレートをPBS/Tweenで3回洗浄したのち、50 μ LのHRP標識ヤギ抗マウスイムノグロブリン抗体 (BioSource International Inc., PBS/Tweenで1/6,000希釈) 加え、室温で45分間反応させた。プレートをPBS/Tweenで6回洗浄したのち、100 μ Lの基質溶液 (0.05% H₂O₂と0.1 mg/mL 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidineを含む0.01 M酢酸緩衝液 pH 5.0) を加え、室温で30分間酵素反応させた後、50 μ Lの1M硫酸を加え反応を停止させ、450 nmの吸光度を測定した。

結果および考察

NIV-オキシムの作製と精製

NIVとカルボキシメトキシルアミンヘミ塩酸塩の反応液 (NIV換算で0.1 mg/mLの反応液を50 μ L) のクロマトグラムを図2に示した。7分付近に未反応のNIVのピークが確認され、12-15分にブロードのNIV-オキシムのピークを確認した。約85%のNIVとカルボキシメトキシルアミンヘミ塩酸塩と反応した。分取HPLCで12-15分のピークを分取し、精製NIV-オキシムを得た。

マウスの抗体価

NIV-オキシム-BSAまたはNIV-オキシム-cBSAで4回免疫したマウスの抗体価を図3に示した。NIV-オキシム-BSAで免疫した場合は、mouse (1) 以外の抗体価の上昇は認められなかった。一方、NIV-オキシム-cBSAで免疫した場合は、全てのマウスの抗体価は上昇しており、Muckerheide, A⁽⁵⁾らの報告のように、cBSAは抗原性を高めることができる有用なキャリアであることを確認した。NIV-オキシム-cBSAで免疫したマウスでは、特にmouse (7) とmouse (10) の抗体価が高かった。NIV-オキシム-cBSAで免疫したマウス抗血清を吸光度が0.4から0.6になるようにPBSで希釈して、競合ELISAを行った。その結果を図4に示した。mouse (9) 以外の抗血清はNIV濃度依存的に吸光度が低下したことから、抗血清には、NIV特異抗体が存在すると判断した。

細胞融合とクローニング

最終免疫3日後に細胞融合を行い639ウェルに播種した。HAT選択後、621ウェル (97.2%) でハイブリドーマの増殖が認められた。間接ELISAによるスクリーニングの結果、71ウェルが吸光度が0.5以上の陽性であった。競合ELISAでNIVと強い反応性を示した30ウェルを選択して、限界希釈法でクローニングを2回以上行い、19ク

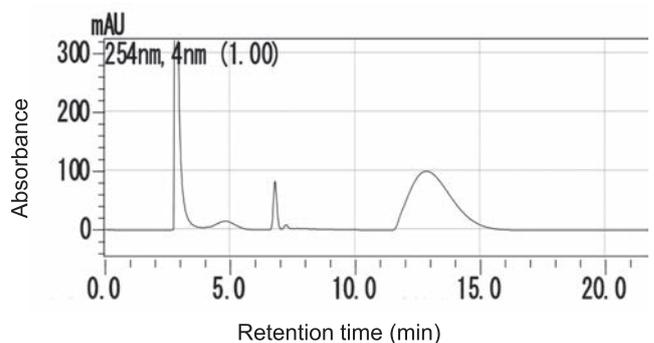


図2 Chromatogram of the reaction solution of NIV and carboxymethoxylamine hemihydrochloride.

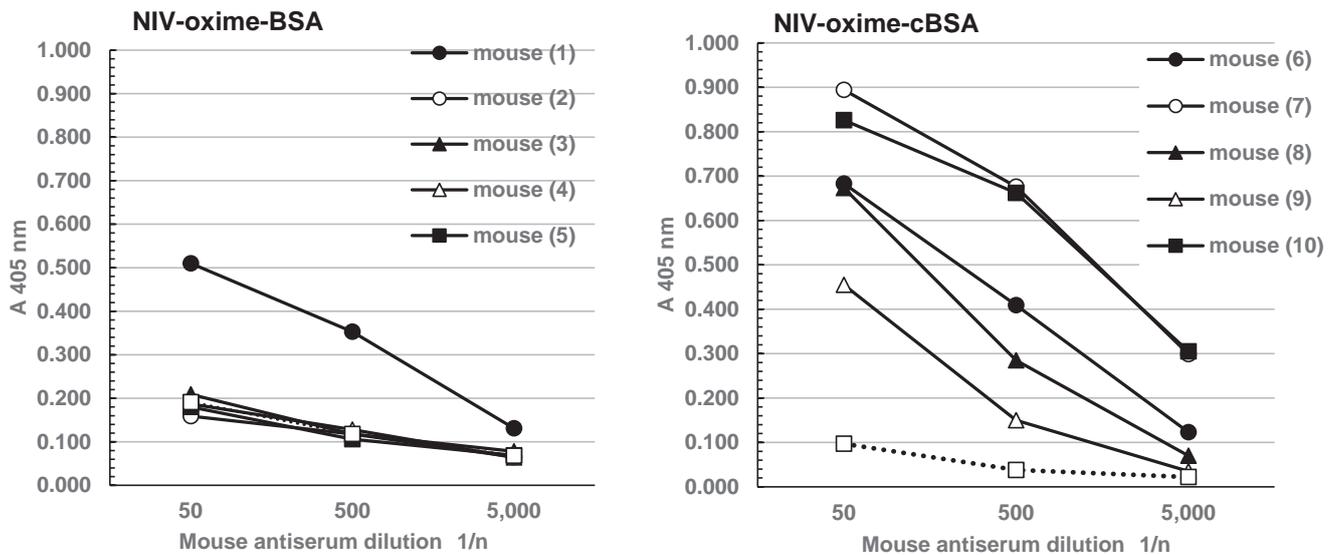


図3 The antibody titers of NIV-oxime-BSA and NIV-oxime-cBSA immunized mouse antiserum

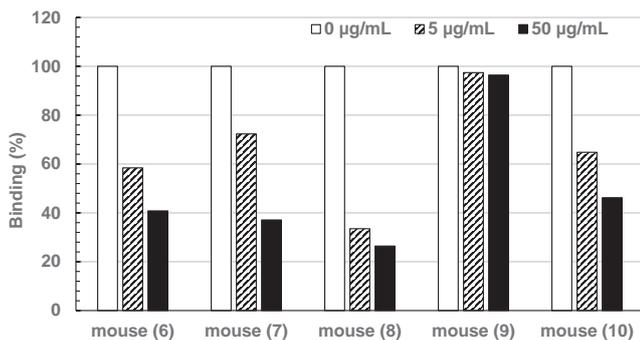


図4 Reactivity of NIV-oxime-cBSA immunized antisera with NIV in competitive indirect ELISA

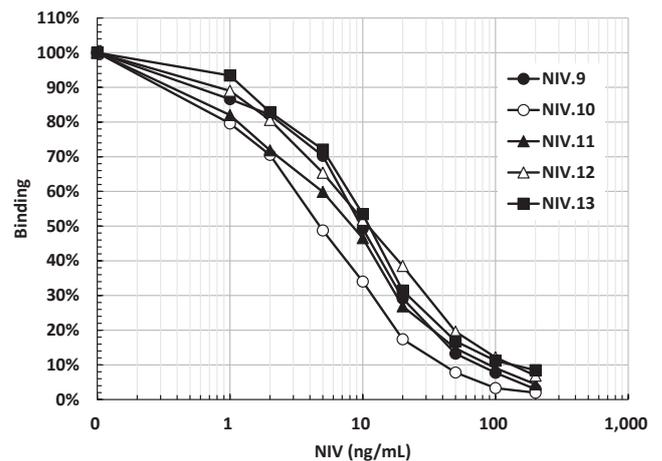


図5 Reactivity of NIV.9, 10, 11, 12, and 13 mAbs with NIV in competitive indirect ELISA optimized for NIV analysis

ローンの安定な抗NIVmAb産生ハイブリドーマを樹立し、NIV.1~NIV.19と命名した。

至適化した競合ELISAでの抗NIVmAbの比較

樹立した抗体のなかでNIVに反応性の高かったNIV.9, 10, 11, 12と13抗体のNIVとNIV関連化合物との反応性について至適化した競合ELISAで検討した。NIVとの反応性では、NIV.10が最も強く反応し、50%結合阻害に必要なNIVは、5 ng/mLであった(図5)。他の抗体の50%結合阻害に必要なNIVは、約10 ng/mLであった。また、20%結合阻害(80% binding)を検出感度とした場合、NIV.9とNIV.11抗体では1 ng/mLで、他の抗体では2~3 ng/mLであった。これらの抗体のNIV関連化合物との反応性について図6と表1に示した。NIV.9抗体は、NIV以外の関連化合物との反応性はかなり低かった。一方、NIV.11抗体は、15-acetyly DONに比較的強く反応し、DONと3-acetyly DONに弱い交差反応性を示した。しか

し、4-acetyly NIVとは反応しなかった。NIV.10, 12と13抗体は、ほぼ反応性は同じで、15-acetyly DONに弱い交差反応性を示した。

Sandersら⁽⁶⁾は、DON-オキシム-BSAでマウスを免疫しても抗体は上がらなかったと報告している。我々もNIVと同様にDON-オキシム-BSAとDON-オキシム-cBSAを作製しBALB/cマウスを4回免疫したが、DON特異的抗体の誘導を行うことはできなかった。これらの結果から、4位がOHかHかが抗原性に大きく関与してる可能性が示唆された。

表1 The cross-reactivities of NIV.9-13 monoclonal antibodies

Monoclonal antibodies	% of cross-reactivity				
	NIV	4-AcetyNIV	DON	3-AcetyDON	15-AcetyDON
NIV.9	100	< 0.18	< 0.18	< 0.18	< 0.18
NIV.10	100	< 0.30	< 0.30	< 0.30	0.75
NIV.11	100	< 0.10	0.130	< 0.10	3.33
NIV.12	100	< 0.10	< 0.10	< 0.10	0.13
NIV.13	100	< 0.12	< 0.12	< 0.12	0.12

% of cross-reactivity was clucrated as a concentration of requerd 50% binding / a concentration of NIV retated compound requerd 50% binding x 100.

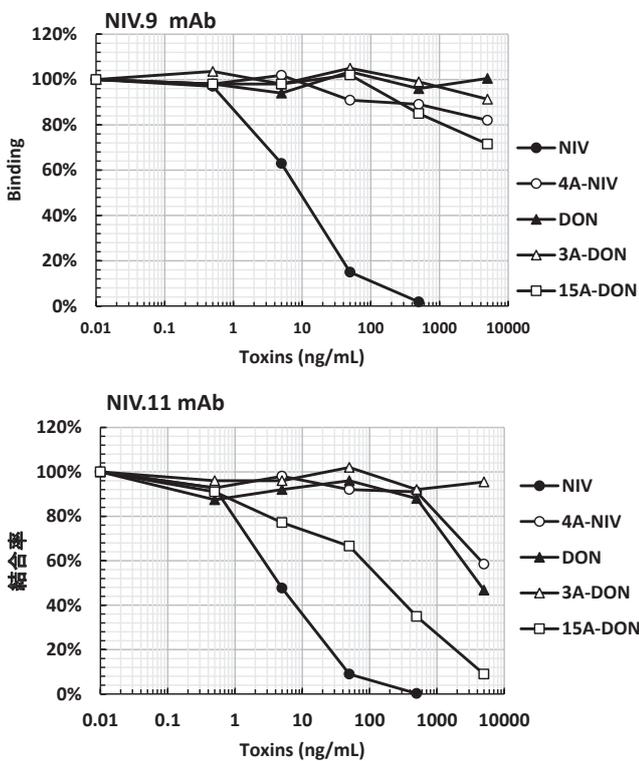


図6 The cross-reactivities of NIV.9 and NIV.11 mAbs in indirect competitive ELISA optimized for NIV analysis.

摘 要

NIV-オキシム化蛋白質結合体を作製し、国内産の小麦や大麦を高頻度に汚染しているニバレノール (nivalenol, NIV) に対するモノクローナル抗体 (mAb) は初めて作製した。NIV-オキシム-cBSAで免疫したマウス脾臓細胞を細胞融合し、19クローンの抗NIVmAb産生ハイブリドーマを得た。NIV.9抗体はNIVに特異的に反応した。NIV.10, 12と13抗体は15-acety DONに弱い交差反応を示した。NIV.11抗体は15-acety DONに強い交差反応を示し、15-acety DONとDONに弱い交差反応を示した。NIV.9とNIV.11抗体を用いた競合ELISAでは、1 ng/mLまでのNIVの検出が可能であった。

謝 辞

本研究は科研費 (18K05489) の助成を受けたものである。

引 用 文 献

- (1) Kumar, P., Mahato, D. K., Gupta, A., Pandey, S., Paul, V., Saurabh, V., Kumar Pandey, A. K., Selvakumar, R., Barua, S., Kapri, M., Kumar, M., Kaur, C., Tripathi, A. D., Gamlath, S., Kamle, M., Varzakas, T., Agriopoulou, S.: Nivalenol Mycotoxin Concerns in Foods: An Overview on Occurrence, Impact on Human and Animal Health and Its Detection and Management Strategies. *Toxins (Basel)*, 14, 647. doi : 10.3390/toxins14090647 (2022).
- (2) 食品安全委員会：かび毒 デオキシニバレノール (DON) ニバレノール (NIV) のリスク評価を行い
- (3) 厚生労働省大臣官房 生活衛生・食品安全審議官：食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について (小麦中のデオキシニバレノールに係る基準値の設定) 生食発 0730第7号, 令和3年7月30日 <https://www.mhlw.go.jp/hourei/doc/tsuchi/T210802I0020.pdf>

ました。
https://www.fsc.go.jp/sonota/kikansi/26gou/26gou_3.pdf
 (2022年10月31日閲覧)

(2022年10月31日閲覧)

- (4) Sanders, M., Guo, Y., Iyer, A., García, Y.R., Galvita, A., Heyerick, A., Deforce, D., Risseeuw, M.D.P., Van Calenbergh, S., Bracke, M., Eremin, S., Madder, A., De Saeger, S.: An immunogen synthesis strategy for the development of specific anti-deoxynivalenol monoclonal antibodies. *Food Addit. Contam. Part A.*, 31, 1751–1759 (2014).
- (5) Muckerheide, A., Domen, P.L., Michael, J.G.: Cationization of protein antigens. II. Alteration of regulatory properties. *J Immunol.*, 138, 2800–2804 (1987)
- (6) Sanders, M., Guo, Y., Iyer, A., García, Y.R., Galvita, A., Heyerick, A., Deforce, D., Risseeuw, M.D.P., Van Calenbergh, S., Bracke, M., Eremin, S., Madder, A., De Saeger, S.: An immunogen synthesis strategy for the development of specific anti-deoxynivalenol monoclonal antibodies. *Food Addit. Contam. Part A.* 31, 1751–1759 (2014).