

ヒスタミンに対するモノクローナル抗体の作製

Ta Mai Trang · 山田瑠美 · 川村 理

Production of monoclonal antibodies against histamine

Ta Mai Trang, Rumi Yamada and Osamu Kawamura

Abstract

Monoclonal antibodies (mAb) against histamine (His), a causative agent of food poisoning, was prepared. We prepared Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) bound with His and five kinds of cross-linking agents, and immunized mice with these. The reactivities of these antisera with bovine serum albumin (BSA) conjugated with five different crosslinkers were examined. Antisera from mice immunized with His-BS3-KLH, His-DTSSP-BSA or His-GA-KLH were highly reactive. Competitive ELISA was performed with these antisera, and His-specific antibodies were efficiently detected when His-GA-KLH was immunized and His-GA-BSA was used as the solid-phase antigen. Therefore, we immunized mice four times with His-GA-KLH and performed cell fusion of spleen cells of mice in which His-specific antibodies could be detected. Cloning was performed more than twice by the limiting dilution method, and 9 clones of stable anti-His mAb-producing hybridomas (His.1-9) were established. Optimized competitive ELISA using His.6 mAb, which had the highest reactivity to His, was able to detect 0.04 µg/mL of His. In the future, it is expected that these antibodies will be used to establish a highly sensitive immunochemical analysis method for His.

Key words : histamine, monoclonal antibody, ヒスタミン, モノクローナル抗体

緒 言

ヒスタミン (His) は、アミノ酸の1つであるヒスチジンから、主に魚の体表または腸内の細菌などの脱炭酸酵素の働きにより生成される生理活性の高いアミンである。His食中毒は、Hisが高濃度に蓄積された食品、特に魚類及びその加工品を摂取することにより発症するアレルギー様の食中毒である⁽¹⁾。厚生労働省の食中毒統計では、日本で2014年から2022年の10年間で93件、患者数1,987名のHis食中毒が発生している。FAO/WHO合同専門家会議は、His最大許容濃度を200 mg/kgに設定した⁽²⁾。Codex委員会はマグロ、イワシ等の缶詰や急速冷凍水産加工品等の腐敗基準100 mg/kg未満と定めている⁽³⁾。

Hisに対する抗体作製の報告はいくつかあるが、ほとんどの抗体がHisと架橋部位を合わせて認識しており、His-架橋剤結合体とは強く反応するが、His単独とはあまり反応しない抗体がほとんどである^(4, 5, 6)。そこで、

高感度にHisを検出できるモノクローナル抗体を作製することを目的として本研究を行った。

まず、Hisの1級アミノ基と蛋白質Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) と Bovine Serum Albumin (BSA) を異なる市販されていた5つの架橋剤を用い結合させた。次に、5種類のHis-KLH結合体でBALB/cマウスを3回免疫し、それぞれの抗血清と5種類のHis-BSA結合体を固相抗原としたELISAで、Hisとの反応性の高い組み合わせを検討した。次に、最も良かったHis-KLH結合体で免疫したマウスの脾臓細胞をマウスミエローマ細胞と細胞融合を行い、最も良かったHis-BSA結合体を固相抗原としたELISAでハイブリドーマのスクリーニングを行った。さらに、クローニングを行い抗Hisモノクローナル抗体産生細胞の樹立を行った。最後に、これらの抗体を用いたHisの高感度ELISAについて検討した。

方 法

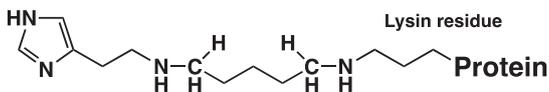
試薬類

Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), ヒスタミン二塩酸塩, 1,4-Benzoquinone (BQ) と10%グルタルアルデヒド溶液は富士フィルム和光純薬(株)から, Bis (sulfosuccinimidyl) suberate, disodium salt (BS3) とDithiobis (sulfosuccinimidyl propionate), disodium salt (DTSSP) は(株)同仁化学研究所から, シアノ水素化ホウ素ナトリウムは東京化成工業(株)から, Bovine Serum Albumin (BSA) と1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDPC) はシグマ-アルドリッチ ジャパン合同会社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.

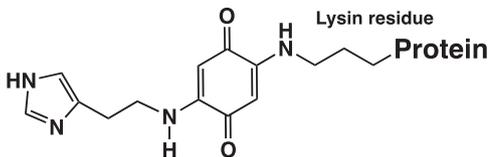
Hisとキャリアー蛋白質との結合

図1に示した5つの架橋剤を用いてHisとキャリアー蛋白質との結合を行った.

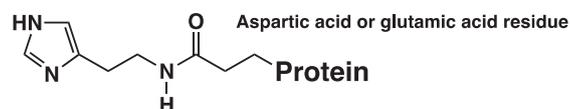
His-GA-KLHとBSAの作製: 6 mgのKLHを1.2 mLのダルベッ



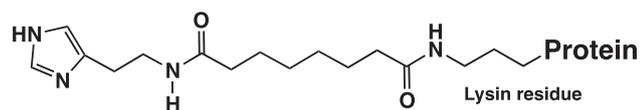
(1) Histamine-GA-Protein



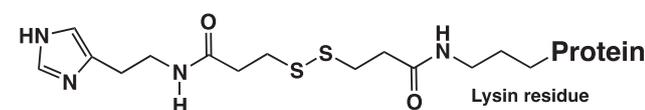
(2) Histamin-BQ-Protein



(3) Histamine-EDPC-Protein



(4) Histamin-BS3-Protein



(5) Histamin-DTSSP-Protein

図1 5種類の架橋剤を用いたヒスタミンとキャリアー蛋白質結合体

コのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶解し, 透析チューブに入れ, 200 mLのPBSに10%グルタルアルデヒド (GA) 溶液を2 mL (最終濃度0.1%GA) に対して, 4°Cで一晩透析した. 次に, 未反応のGAを取り除くために500 mLのPBSに対して4°Cで12時間透析した. このGAで活性化したKLH 600 μ L (約3 mg, 0.6×10^{-3} μ mol) と1.245 mgのヒスタミン二塩酸塩 (6.75 μ mol) を750 μ LのPBSに溶解した溶液を混ぜ, ゆっくりと攪拌しながら, 4°Cで12時間反応させた. 反応液に1/10容量 (13.5 μ L)の1 M NaOHに溶解した5 Mシアノ水素化ホウ素ナトリウムを添加し, 室温で4時間還元反応させた. 未反応アルデヒド部位のブロックするために, 50 μ Lの1 Mエタノールアミン溶液を加え, 室温で30分間反応させた. PBS (1 L) に対して4°Cで4回透析した. BSAとも同様の操作を行い, His-GA-BSAも作製した.

Histamine-BQ-KLHとBSAの作製: 3 mg (0.6×10^{-3} μ mol) のKLHを0.6 mLの0.1 Mリン酸緩衝液pH4.5に溶解し, 90 μ Lのエタノールに溶解した1.3 mg (12 μ mol) の1,4-benzoquinone (BQ) を加え, 暗所・室温でゆっくり攪拌しながら1時間反応させた. 反応液を200 mLの0.1 M炭酸緩衝液pH 8.5に対して, 4°Cで6時間透析した. 透析内液に125 μ Lの0.1 M炭酸緩衝液pH 8.5に溶解した0.83 mg (6.75 μ mol) のヒスタミン二塩酸塩を加え, 暗所・室温でゆっくり攪拌しながら, 20時間反応させた. PBS (1 L) に対して4°Cで4回透析した. BSAとも同様の操作を行い, His-BQ-BSAも作製した.

His-EDPC-KLHとBSAの作製: 3 mg (0.6×10^{-3} μ mol) のKLHを1 mLの20 mMリン酸緩衝液pH 7.0に溶解し, 0.17 mg (0.9 μ mol) のヒスタミン二塩酸塩を加え溶解した. 0.34 mg (2 μ mol) の1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDPC) を加え, ゆっくり攪拌させながら室温で30分間反応させた. 再度, 0.34 mg (2 μ mol) のEDPCを加え, ゆっくり攪拌させながら室温で一晩反応させた. PBS (1 L) に対して4°Cで4回透析した. His-EDPC-BSAも同様にし作製した.

His-BS3-KLHとBSAの作製: 3 mg (0.6×10^{-3} μ mol) のKLHを0.6 mLの20 mMリン酸緩衝液pH 7.0に溶解し, 1.245 mg (6.75 μ mol) のヒスタミン二塩酸塩を同緩衝液に溶解し, 混合した. 6.87 mg (12 μ mol) のBS3を750 μ Lの同緩衝液に溶解し, 混合液に加え, 室温でゆっくり攪拌しながら30分間で反応させた. 最後濃度が20 mMになるように18.5 μ Lの1 M Tris-HCl緩衝液pH 7.5を加え, ゆっくり攪拌しながら15分間反応させ, 反応を停止させた. PBS (1 L) に対して4°Cで4回透析した. His-BS3-BSAも同様にし作製した.

His-DTSSP-KLHとBSAの作製: 3 mg (0.6×10^{-3} μ mol)

のKLHのを0.6 mLのPBSに溶解し、1.245 mg (6.75 μ mol) のヒスタミン二塩酸塩をPBSに溶解し、混合した。6.87 mg (12 μ mol) のDTSSPを490 μ Lに溶解し、混合液に加え、室温でゆっくり攪拌しながら30分間で反応させた。最後濃度が20 mMになるように18.5 μ Lの1 M Tris-HCl緩衝液pH 7.5を加え、ゆっくり攪拌しながら15分間反応させ、反応を停止させた。PBS (1 L) に対して4°Cで4回透析した。His-DTSSP-BSAも同様にし作製した。

作製したHis-蛋白質結合体は、280 nmの吸光度から蛋白濃度を測定し、2 mg/mLに濃度を調整し、分注して-30°Cで保存した。

作製した5種類のHis-KLH結合体を用いたマウスの免疫

各His-KLH結合体を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1群4匹でメスのBALB/cマウス(日本SLC(株))1匹当たり25 μ gの各His-KLH結合体を皮下投与した。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、2週間後、フロイド不完全アジュバンドと共に各His-KLH結合体を同量腹腔内投与した。3回目の免疫1週間後、眼底から採血し、抗血清を得た。

間接ELISA

5種類のHis-KLH結合体を3回目の免疫したマウス抗血清を5種類のHis-BSA結合体を固相抗原とした間接ELISAで抗体価を測定した。また、陰性対照として免疫していないマウス血清を用いた。間接ELISAは、0.01 M炭酸-重炭酸緩衝液pH 9.6で各His-BSA溶液を2.0 μ g/mLに調整し、96ウェルマイクロプレートに50 μ L/ウェルずつ加え、4°Cで一晩コーティングを行った。プレートをプレートウォッシャーで0.05% Tween 20を含むPBS溶液(PBS/Tween)で3回洗浄した。各ウェルに0.1% OVAを含むPBS溶液を125 μ Lずつ加え、室温で2時間静置し、ブロッキングを行った。プレートをPBS/Tweenで3回洗浄した後、各ウェルに50 μ Lのマウス抗血清のPBS希釈液(1/50~1/500,000)を加え、室温で1時間反応させた。プレートをPBS/Tweenで3回洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識Goat Anti-mouse IgG抗体をPBS/Tweenで1/2,000倍に希釈し50 μ L/ウェルずつ加え、室温で45分静置した。1 mg/mLのPNPPと1 mM MgCl₂含む0.1 M ジエタノールアミン-HCl緩衝液pH 9.8を各ウェルに100 μ Lを加え、室温で45分間酵素反応を行った後、405 nmの吸光度を測定した。

競合的間接ELISA

抗体価の上昇の認められた抗血清とHis-BSA結合体について、競合的間接ELISAを行いHisとの反応性を確認した。競合的間接ELISAは、上記と同様にコーティングとブロッキングを行った後、Hisを0, 1.0, 3.3, 10, 33, 100 μ g/mLになるように調整したPBS溶液を阻害剤として25 μ Lずつ各ウェルに加えた。これらのウェルに吸光度が0.6前後になるようにPBSで希釈したそれぞれのマウス抗血清をそれぞれ25 μ L加え、室温で1時間競合反応させた。以下の操作は間接ELISAと同様に操作した。

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、マウスミエローマ細胞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、His-GA-BSA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、限外希釈法で、2回以上のクローニングを行い、安定な抗His抗体産生ハイブリドーマを得た。

至適化した競合ELISA

His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Hisの検出ができた。その方法は、His-GA-BSA (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。その後、上記と同様に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His標準液と50 μ LのPBSで1/4,000希釈したHis.6抗体の培養上清を加え攪拌後、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1 M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

Hisとキャリア-蛋白質との結合のための架橋剤の組み合わせ

間接ELISAでの免疫原毎の抗血清と各固相抗原との反応性をまとめた結果を表1に示した。His-BS3-KLHで免疫したマウスの抗血清が最も強くHis-BS3-BSAとHis-DTSSP-BSAととても強く反応し、His-GA-BSAと強く反

表1 免疫原毎の抗血清と各固相抗原との反応性

	免疫原 (KLH)					
	ハプテン-架橋剤	His-GA	His-BQ	His-EDPC	His-BS3	His-DTSSP
固相抗原 (BSA)	His-GA	↑	→	↗	↑	↑
	His-BQ	→	→	→	↗	↗
	His-EDPC	→	→	→	→	↗
	His-BS3	→	→	→	↑↑	↑
	His-DTSSP	→	→	→	↑↑	↑

↑↑とても強く反応, ↑強く反応, ↗やや反応, →あまり反応せず

表2 His-BS3-KLHで免疫したマウス抗血清の競合的間接ELISA

His (μg/mL)	結合率 (%)					
	固相抗原His-BS3-BSA			固相抗原His-DTSSP-BSA		
	マウス①	マウス②	マウス③	マウス①	マウス②	マウス③
0	100	100	100	100	100	100
1	83.3	83.7	92.4	99.3	93.5	97.3
3.3	77.9	70.4	92.3	97.8	81.0	87.3
10	71.9	65.1	84.5	97.2	80.0	84.1
33	65.3	41.8	69.3	81.0	74.5	88.0
100	53.9	26.3	60.9	75.7	60.5	74.8

表3 His-GA-KLHで免疫したマウス抗血清の競合的間接ELISA

His (μg/mL)	結合率 (%)	
	固相抗原His-GA-BSA	
	マウス①	マウス②
0	100	100
1	92.8	89.6
3.3	82.7	73.3
10	72.3	55.6
33	51.3	42.6
100	36.8	30.1

応した. His-DTSSP-KLHの抗血清は強くHis-GA-BSA, His-BS3-BSAとHis-DTSSP-BSAと反応した. また, His-GA-KLHの抗血清は強くHis-GA-BSAのみと反応した. そこで, これらの反応性の高かった組合せで, 吸光度が0.6前後になるようにPBSで希釈しマウス抗血清でHisの競合ELISAを行った. His-BS3-KLHで免疫したマウスの抗血清の場合, His-BS3-BSAを固相抗原とした場合は, 3匹中1匹の抗血清が100 μg/mLのHisでの結合率が30%以下で強い反応性を示した. 一方, His-DTSSP-BSAを固相抗原とした場合は, Hisとの反応性は高くなかった (表2) また, His-GA-BSAを固相抗原とした場合もHisとの反応性は高くなかった. His-DTSSP-KLHの抗血清の場合は, His-GA-BSA, His-BS3-BSAまたはHis-DTSSP-BSAを固相抗原とした競合ELISAでHisとの反応性は高くなかった. His-GA-KLHの抗血清は, 2匹中2匹が100 μg/mLのHisでの結合率が30%以下で強い反応性を示した (表3). 以上の結果から, Hisの特異抗体を誘導し, 抗

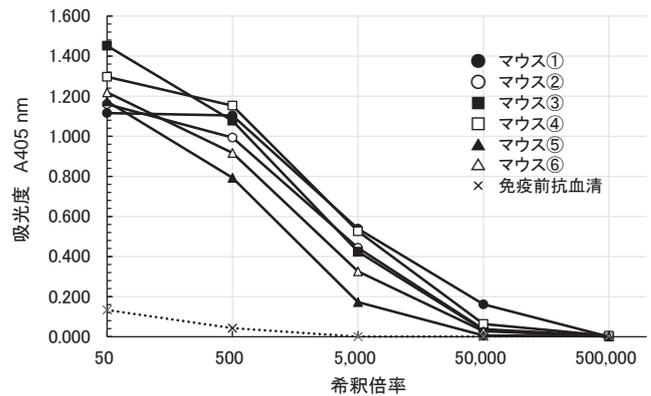


図2 His-GA-KLHで4回免疫したマウスの抗血清の抗体価

His抗体の検出には, His-GA-KLHを免疫原として用い, 固相抗原としてHis-GA-BSAを用いることが適していた. そこで, 上記と同様にHis-GA-KLHを2週間間隔で1匹当たり25 μgのHis-GA-KLHを免疫したマウスの抗血清の抗体価 (間接ELISA) を図2に示した. 何れのマウス抗血清もHis-GA-BSAに対して強く反応していた. そこで, Hisに対する特異抗体の存在を確認するために1/5,000希釈した各抗血清で競合ELISAを行った. その結果 (表3), マウス①を除いて, 100 μg/mLのHisでの結合率が30%以下で強い反応性を示した. また, マウス③は100 μg/mLのHisでの結合率が12%で特に強く反応していた. このマウスに最終免疫を行い, 細胞融合を行った.

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307ウエルに播種した. HAT選択後, 166ウエル (54.1%) 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, 67ウエルが吸光度が0.2以上の陽性であった. 競合ELISAでHisと強い反応性を示した10ウエルを選択して, 限界希釈法でクローニングを2回以上行い, 9クローンの安定な抗His mAb産生ハイブリドーマを樹立し, His.1~His.9と命名した.

競合的間接ELISAでの各抗体のHisとの反応性の比較

図3に抗His抗体の競合的間接ELISAでのHisとの反応性の比較した結果を示した. これらの抗His抗体中でHis.6抗体が最もHisとの反応性が高かった. この抗体を用いて競合ELISAの至適化を行った.

至適化した競合ELISA

至適化した競合ELISAでのHisの検量線を図4に示した. 結合率50%は0.2 μg/mLであり, 結合率80%を検出限界とした場合, 0.04 μg/mLまでのHisが検出可能であった. この検出限界は, Liら (2020)⁽⁷⁾ の2.5 μg/mLの

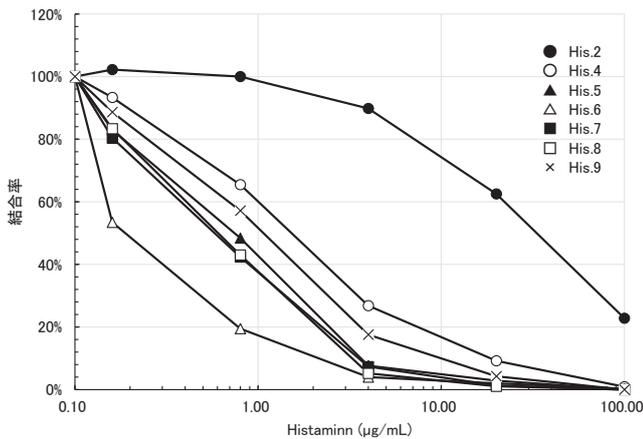


図3 抗His抗体の競合的間接ELISAでのHisとの反応性

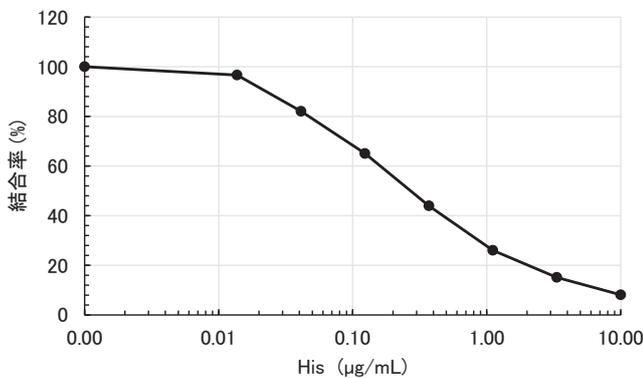


図4 至適化した競合ELISAでのHisの検量線

1/62.5, Xuら (2020)⁽⁸⁾ の0.073 µg/mLの約1/2であり、かなり高感度なELISAであった。今後、これらの抗体を用いたHisの高感度な免疫化学的分析法の確立が期待される。

表4 His-GA-KLHで4回免疫したマウス抗血清の競合的間接ELISA

His (µg/mL)	結合率 (%)				
	固相抗原His-GA-BSA				
	マウス①	マウス②	マウス③	マウス④	マウス⑥
0	100	100	100	100	100
1	100.4	98.7	100.4	92.3	92.5
3.3	106.3	102.6	85.9	82.1	105.5
10	108.2	79.8	53.7	76.1	81.8
33	95.1	57.4	28.3	52.8	52.7
100	56.8	24.7	12.0	27.6	22.0

摘 要

食中毒の原因物質であるヒスタミン (His) のモノクローナル抗体 (mAb) の作製した。Hisと5種類の架橋剤で結合させたKeyhole Limpet Hemocyanin (KLH) を作製し、これらでマウスの免疫を行った。これらの抗血清と5種類の架橋剤で結合させたBovine Serum Albumin (BSA) との反応性を調べた。その結果、His-BS3-KLH, His-DTSSP-BSAまたはHis-GA-KLHで免疫したマウスの抗血清の反応性が高かった。次に、これらの抗血清で競合ELISAを行った結果、His-GA-KLHで免疫し、固相抗原にHis-GA-BSAを用いた場合に効率よくHis特異抗体を検出できた。そこで、His-GA-KLHで4回免疫し、His特異抗体を検出できたマウスの脾臓細胞の細胞融合を行った。限界希釈法でクローニングを2回以上行い、9クローンの安定な抗His mAb産生ハイブリドーマ (His.1~9) を樹立した。この中で最もHisに反応性の高かったHis.6抗体を用いた至適化した競合ELISAで0.04 µg/mLまでのHisの検出が可能であった。今後、これらの抗体を用いたHisの高感度な免疫化学的分析法の確立が期待される。

引 用 文 献

- (1) 厚生労働省HP：ヒスタミンによる食中毒について (2023年10月20日閲覧)
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000130677.html>
- (2) Joint FAO/WHO expert meeting report: Public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products, 23-27 July 2012 (2023年10月20日閲覧)
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240691919>
- (3) Codex : Codex general standard for quick frozen fish fillets-Codex Stan 190-1995. Codex Alimentarius Commission, Italy (1995)
- (4) Chevrier, D., Guesdon, J.-L., Mazié, J.-C., Avrameas, S. : Enzyme immunoassay for the measurement of histamine. *Journal of Immunological Methods*, 94, 119-125 (1986)
- (5) Guesdon, J.-L., Chevrier, D., Mazié, J.-C., David, B., Avrameas, S. : Monoclonal anti-histamine antibody: Preparation, characterization and application to enzyme immunoassay of histamine. *Journal of Immunological Methods*, 87, 69-78 (1986)
- (6) Serrar, D., Brebant, R., Bruneau, S., Denoyel, G.C. : The development of a monoclonal antibody-based ELISA for the determination of histamine in food: application to fishery products and comparison with the HPLC assay. *Food Chemistry* 54, 85-91 (1995).

- (7) Li, Y.-F., Lin, Z. Z., Hong, C.-Y., Huang, Z.-Y. : Histamine detection in fish samples based on indirect competitive ELISA method using iron-cobalt co-doped carbon dots labeled histamine antibody. *Food Chem.*, 345, 128812 (2020).
- (8) Xu, L., Zhou, J., Eremin, S., Dias, A. C. P., Zhang, X. : Development of ELISA and chemiluminescence enzyme immunoassay for quantification of histamine in drug products and food samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, 412, 4739-4747 (2020).