

シトリニンに対するモノクローナル抗体の作製

川村 理・有富亮哉・張 燃

Production of monoclonal antibodies against citrinin

Osamu Kawamura, Ryoya Aritomi, and Zhang Ran

Abstract

Citrinin (CIT) is a nephrotoxic mycotoxin that contaminates barley, cheese, and *Monascus color*. In Japan, there is the regulation that the CIT concentration in *Monascus color* is less than 200 µg/kg. Therefore, we prepared anti-CIT monoclonal antibody for the purpose of developing a highly sensitive and simple analyzed method for CIT in these. Twelve BALB/c mice and 12 CB6F1 mice were immunized with CIT-KLH three times each, and as a result, an increase in the antibody titer against CIT was confirmed in each of the one mouse. The mouse spleen cells were fused by standard methods. After HAT selection and cloning, we obtained stable anti-CIT monoclonal antibody-producing hybridomas CIT.6 and CIT.7. Optimized competitive indirect ELISA using CIT.6 antibody was able to detect CIT up to 0.3 µg/mL. It is expected that a highly sensitive and simple analyzed method for CIT in foods will be established.

Key words : citrinin, monoclonal antibody, *Monascus color*, ベニコウジ色素

緒 言

シトリニン (citrinin, 以下CIT, 図1) は, *Penicillium citrinum*をはじめとする*Penicilium*属, *Aspergillus*属, および*Monascus*属などが生産する腎毒性を有するマイコトキシンである。CITは, 穀物やチーズやベニコウジ色素などからしばしば検出されている⁽¹⁾。日本では, 第二次世界大戦直後の食糧事情が悪い時代に, ビルマ (現ミャンマー) から輸入された米のカビ汚染 (黄変米事件) の原因物質と考えられている。腎毒性マイコトキシンであるオクラトキシンA (ochratoxin A, OTA) を生産する*Penicillium verrucosum*などは, 同時にCITも生産し, CITはOTAの毒性を増強することから, アジアでの米の同時汚染が懸念されている⁽²⁾。さらに, 着色料として用いられるベニコウジ色素 (モナスカス色素) の産生菌である*Monascus pilosus*と*M. purpureus*がCITを産生することから, 日本ではベニコウジ色素中CIT濃度200 µg/kg以下の規格が定められている⁽³⁾。しかし, ベニコウジ色素以外の農作物などでCITの基準値を設定した国や国際機関はまだない。

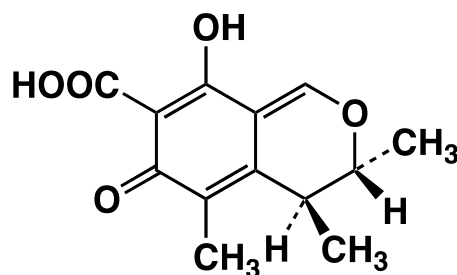


図1 シトリニンの構造式

CITの分析法は, 酸性条件で溶媒に抽出し, 液-液分配あるいは固層抽出カートリッジカラムを用いてクリーンアップを行い, 蛍光HPLCやLC-MSによって測定する方法が一般的である。また, 近年, 抗CIT抗体を用いた酵素免疫測定法も報告されている^(4, 5)。我々は, 抗マイコトキシン抗体を結合させたイムノアフィニティークラム (IAC) をクリーンアップとして用いる分析法を確立し, コーヒー中のOTA汚染⁽⁶⁾, ニワトリ用飼料中や南アフリカ市販食品中のアフラトキシン汚染^(7, 8)などを明らかにしてきた。マイコトキシン汚染調査において, IACを用

いる分析方法は、簡便で高感度な有用な分析方法である⁹⁾。そこで、CITのIACを用いる分析法の確立を最終目的として、抗CITモノクローナル抗体を作製した。

方 法

シトリン標準液と試薬類

CIT標準品は、富士フィルム和光純薬（株）から購入した。CITは、10 µg/mLになるようにエタノールに溶解後、吸光度を測定し、319 nmのモル吸光係数4,700から濃度を算出した。HPLC移動相には、富士フィルム和光純薬（株）のHPLC用メタノールとアセトニトリルを用いた。他の試薬は富士フィルム和光純薬（株）の特級試薬または同等品を用いた。

シトリン蛋白質結合体の作製

Abramsonらの方法⁴⁾に準じて作製した。すなわち、6 mgのKeyhole limpet hemocyanin (KLH, 富士フィルム和光純薬（株）)を1.6 mLの0.1 M酢酸緩衝液pH 4.2に溶解し、これに1 mgのCITを0.2 mLのメタノールに溶解し加えた。この溶液に50 µLの37%ホルムアルデヒド溶液（富士フィルム和光純薬（株）)を加え、37°Cで24時間ゆっくり攪拌しながら反応させた。反応液は、1 Lのダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（以下PBS）に対し4°Cで、4回透析を行った。ウシ血清アルブミン（BSA, 富士フィルム和光純薬（株）)でも同様の操作を行い、CIT-BSA結合体を作製した。

透析後、蛋白質濃度はBCA法で測定し、CITの結合量は、PBS中で315 nmにおけるCITのモル吸光係数は3,240であることから、CITの結合量を計算した。

免疫

BALB/cマウス（メス）とCB6F1マウス（BALB/cとC57BL/6Nの交雑種、メス、日本SLC（株）)それぞれ13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100 µgのCIT-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14日後にフロイド不完全アジュバンドと共に同量を皮下投与し、7日後に採血し、CIT-BSA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CIT-KLH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、マウスミエローマー細胞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、CIT-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、CIT-BSA (20 µg/mL, 0.1 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。プレートを0.05% 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 µL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 µLのマウス抗血清（1/20~1/20,000）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 µL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1/2,000希釈）を加え、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 µLの*p*-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0.1 M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。10%メタノールを含むPBSで希釈したCIT標準液を25 µL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。

競合的間接ELISAの至適化

より高感度なCIT検出するELISAを構築するために、Horseradish Peroxidase, (HRP) 標識2次抗体を用いたCIT-BSAの固相化濃度や培養上清濃度を検討し、至適条件を設定した。

結果および考察

シトリニン蛋白質結合体の作製

BCA法での蛋白濃度測定結果と315 nmの吸光度測定の結果から、CIT-KLHではKLH 1 mg当り90.7 μg のCITが、CIT-BSAでは、BSA 1 mg当り64.1 μg のCITが結合していた。

マウスの抗CIT抗体の抗体価

CIT-KLHで3回免疫したBALB/cとCB6F1マウスそれぞれ12匹の抗血清のCIT-BSAとの反応性は何れのマウスでも上昇していた(図2)。図2では、BALB/cマウスの抗血

清の代表的なマウス⑤とCB6F1マウスの抗血清の代表的なマウス⑨の結果を示した。また、BALB/cマウス⑪とCB6F1マウス②の抗血清は著しく抗体価が上昇していた。これらの抗血清がCITと特異的に反応していることを確認するためにこれらのマウス抗血清を1/400希釈して競合的間接ELISAを行った。その結果(図3)、あまり抗体価の高くなかったBALB/cマウス⑤やCB6F1マウス⑨は、CITとの反応しなかったが、抗体価の高かったBALB/cマウス⑪とCB6F1マウス②は、CIT濃度依存的に反応し、CITを10と100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 存在下で、CIT-BSAとの結合がそれぞれ約30%と50%阻害された(図3)。すなわち、このマウス抗血清中には、CIT特異抗体が含まれている

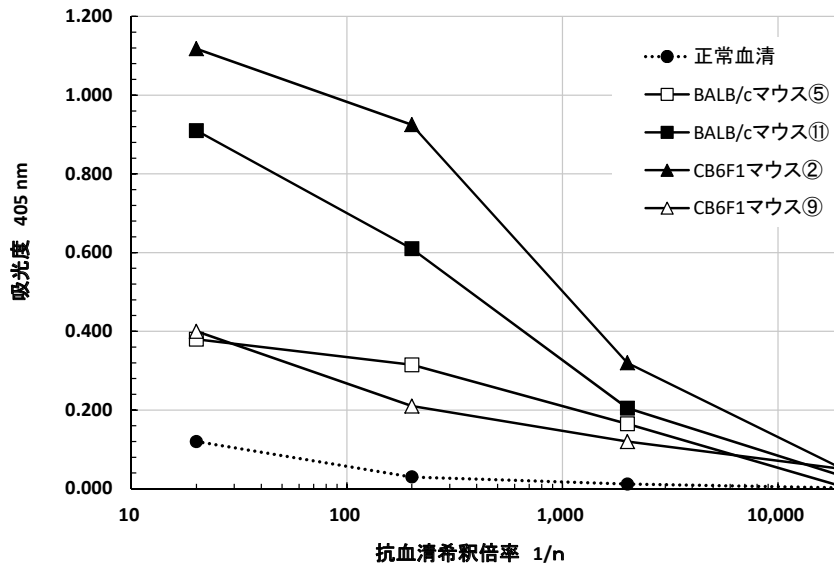


図2 マウス抗血清のCIT-BSAとの反応性(間接ELISA)

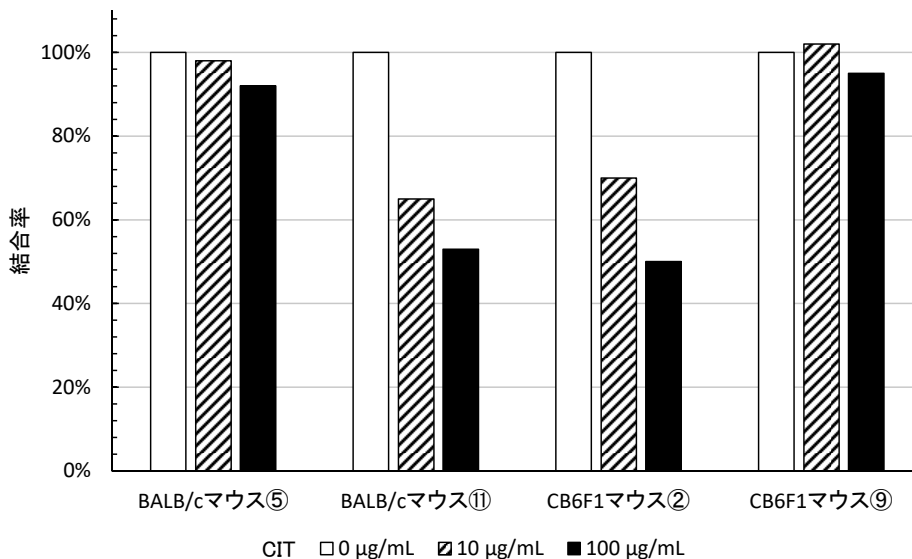


図3 マウス抗血清のCITとの反応性(競合的間接ELISA)

ことが確認できた。そこで、よりCIT-BSAと結合する抗体量の多いCB6F1マウス②の脾臓細胞を用いて、細胞融合を行った。

細胞融合とクローニング

方法により細胞融合を行った。細胞融合後、893ウェルで培養し、HAT選択後、306ウェル(34.2%)でハイブリドーマの増殖を確認した。CIT-BSAを固相化した間接ELISAで吸光度0.1以上であったウェルは8ウェル(0.9%)であった。これらの培養上清の抗体のCITとの反応性を競合的間接ELISAを行った。その結果、7E10のみ100 µg/mLのCITで83%の結合阻害を確認した。7E10ウェル中のハイブリドーマのクローニングを限界希釈法で行った。

3回のクローニング後、安定に抗CITモノクローナル抗体を細胞CIT.6とCIT.7を樹立した。これらの培養上清の抗体価を図4に、競合的間接ELISAでのCITとの反応性を

を図5にそれぞれ示した。何れの培養上清もほぼ同程度、強くCIT-BSAと反応した。最大吸光度の約1/2の吸光度が得られる1/200希釈で競合的間接ELISAを行った結果、CITを10と100 µg/mL存在下で、CIT-BSAとの結合がそれぞれ7.3~7.3%と1.7~1.8%と強く阻害した(図5)。

競合的間接ELISAの至適化

至適化条件を検討した結果、CIT-BSAは500 ng/mL、CIT.6の培養上清は1/500倍希釈、HRP標識 Goat Anti-Mouse Ig's は1/4,000倍希釈が至適条件であった。この条件でCITの検量線を作成した(図6)。20%の結合率の阻害を検出限界とした場合、約0.3 µg/mLまでのCITを検出できた。本法を用いて、食品中などのCITの高感度かつ簡易検査法の確立が期待される。

摘 要

シトリニン(CIT)は、腎毒性を有するマイコトキシンで、麦類やチーズやベニコウジカビ色素などを汚染している。日本ではベニコウジ色素中CIT濃度200 µg/kg以下との規格が定められている。そこで、高感度かつ簡便なCITの測定法の開発を目的として抗CITモノクローナル抗体の作製を行った。CIT-KLHでBALB/cマウスとCB6F1マウスを各12匹をそれぞれ3回免疫した結果、それぞれのマウスで1匹ずつ2匹のマウスでCITに対する抗体価の上昇を確認した。抗体価の上昇の認められたマウスの脾臓細胞を常法で細胞融合を行った。HAT選択後、クローニングを行い安定な抗CITモノクローナル抗体産生ハイブリドーマCIT.6とCIT.7を得た。CIT.6抗体を用いた至適化した競合的間接ELISAで0.3 µg/mLまでのCITを

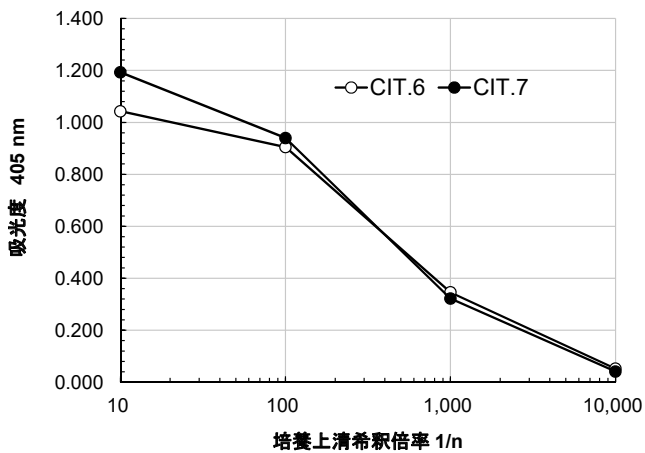


図4 CIT.6とCIT.7の培養上清の抗体価(間接ELISA)

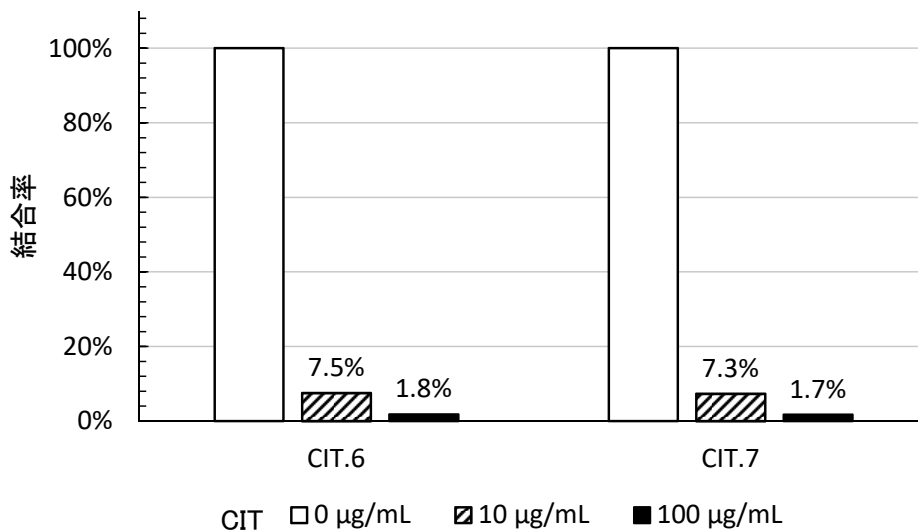


図5 CIT.6とCIT.7の培養上清のCITとの反応性(競合的間接ELISA)

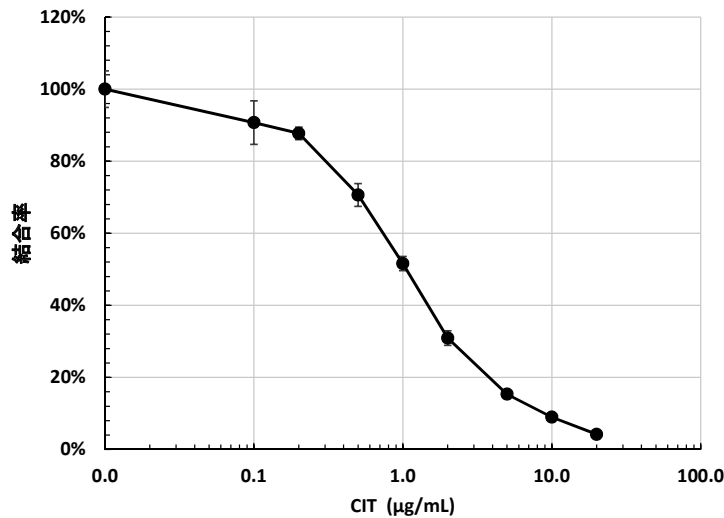


図6 競合的間接ELISAでのCIT.6抗体を用いたCITの検量線

検出可能であった。本法を用いて、食品中などのCITの高感度かつ簡易検査法の確立が期待される。

引用文献

- (1) Dalefield, R.: Chapter 21, Mycotoxins and Mushrooms, In Rosalind Dalefield (eds.) *Veterinary Toxicology for Australia and New Zealand*, pp.373-419, Elsevier Inc. (2015).
- (2) Ali, N.: Co-occurrence of citrinin and ochratoxin A in rice in Asia and its implications for human health. *J Sci Food Agric*, 98, 2055-2059 (2018)
- (3) 厚生労働省：ベニコウジ色素，第9版食品添加物公定書，911-912，(2018)。
- (4) Abramson, D., Usleber, E., and Martlbauer, E.: Determination of citrinin in barley by indirect and direct enzyme immunoassay. *J. AOAC International*, 79, 1325-1329 (1996)
- (5) Liu Renrong, Yu Zhou, He Qinghua and Xu Yang: Preparation and identification of a monoclonal antibody against citrinin. *J. Hygiene Research*, 36, 190-193 (2007).
- (6) 川村理，鈴木祐介，佐々木絢子：イムノアフィニティーカラム-HPLC法による国内市販コーヒー製品のオクラトキシンAとBの汚染調査，香川大学農学部学術報告，67，47-53 (2015)。
- (7) Bagatin Artur Kikuchi, Elisabete Hiromi Hashimoto, Elisa Yoko Hirooka, 川村理：ブラジルのトウモロコシ及び鶏用飼料のアフラトキシン汚染調査とそのリスク評価，香川大学農学部学術報告 68, 25-31 (2016)。
- (8) Xolani Nkosikhona Mhlongo, 川村理：イムノアフィニティーカラム-HPLC法を用いた南アフリカ市販食品のアフラトキシンとオクラトキシンの汚染調査，香川大学農学部学術報告，70，7-13 (2018)。
- (9) Senyuva, H. Z., and John Gilbert, J. : Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. *J. Chromatography B*, 878, 115-132 (2010)。

