

令和 4 年 10 月 24 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05489

研究課題名(和文)フザリウム属カビ毒ニバレノールに対するモノクローナル抗体作製と簡易分析法の開発

研究課題名(英文)Preparation of monoclonal antibody against nivalenol

研究代表者

川村 理 (KAWAMURA, Osamu)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：30204770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ニバレノール(NIV)は小麦類を高頻度に汚染しており、嘔吐、下痢などを起こすマイコトキシンである。NIVをオキシム化した後、カチオン化ウシ血清アルブミンと結合させマウスの免疫を行った。このマウスの脾臓細胞の細胞融合を行った。HAT選択後、抗NIV抗体生産細胞を選択して、2回以上のクローニングを行い安定なNIV特異的mAb生産細胞を19クローン(NIV.1～19)得た。初めてNIVに特異的なmAbの作製に成功した。これらの抗体のうちNIV.9と10抗体を用いた競合ELISAでは1 ng/mLまでのNIVの検出が可能であり、簡便かつ高感度なNIVの測定法の開発が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NIVは、デオキシニバレノール(DON)と同様に代表的なトリコテセン系マイコトキシンであり、国内産の小麦や大麦を高頻度に汚染している。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、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。本研究により、初めてNIV特異抗体モノクローナル抗体の作製に成功したことにより、抗体を用いた簡易分析法が確立・利用されることでNIVの汚染実態を明らかにし、そのリスクを明確にできる。

研究成果の概要(英文)：Nivalenol (NIV) was a mycotoxin that frequently contaminates wheat and causes vomiting and diarrhea. Oximmed NIV was bound to cationized bovine serum albumin. Mice were immunized with this conjugate. Cell fusion of the spleen cells from this mouse was performed. After HAT selection, anti-NIV antibody-producing cells were selected and cloned two or more times. We obtained 19 clones (NIV.1-19) of stable NIV-specific mAb-producing cells. For the first time, we succeeded in producing a mAb specific to NIV. Among these antibodies, competitive ELISA using NIV.9 or 10 antibody can detect NIV of 1 ng/mL or more. The development of a simple and highly sensitive method for measuring NIV is expected.

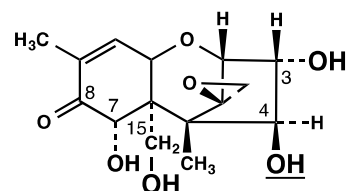
研究分野：食品衛生学

キーワード：ニバレノール モノクローナル抗体 ELISA マイコトキシン トリコテセン

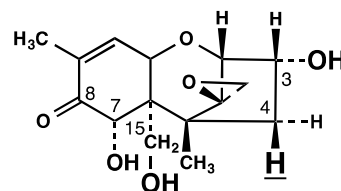
1. 研究開始当初の背景

ニバレノール(NIV、図1.上)は、代表的なタイプBトリコセシ系カビ毒(マイコトキシン)の1つで、デオキシニバレノール(DON、図1.下、4位がH)と共に麦の赤カビ病原菌である *Fusarium graminearum* などのカビによって生産され、小麦や大麦などを高頻度に汚染していることが知られている。

食品安全委員会は、2010年にDONとNIVの食品健康影響評価を行った。その結果、DONとNIVのTDI(耐容1日摂取量、毎日摂取しても健康被害が発生しないと考えられる最大量)は、それぞれ、1.0と0.4 µg/kg 体重/日と設定した。すなわち、食品安全委員会は、NIVのほうがDONより2倍以上毒性が強いと評価した。麦類のNIVとDONの同時汚染が報告されているにもかかわらず、日本も含め世界的にDONに対しての注目度が高く、食品中の規制値が設定されているのはDONのみで、NIVに規制値を設定している国や組織はまだない。国産麦類でのNIVとDONの同時汚染が報告されているにもかかわらず、より毒性が強いと評価されているNIVに規制値が設定されていない現状を放置することはできない。



ニバレノール(NIV)



デオキシニバレノール(DON)

図1. NIVとDONの構造式

2. 研究の目的

この問題を解決するためには、NIVに対する特異的抗体を作製し、抗体を用いた簡易分析法が確立する必要がある。そこで、NIVの8位カルボニル基があることに着目して、予備実験としてカルボキシメトキシルアミンと反応させ、オキシム化を行ってカルボキシル基の導入を試みた(図2)。その結果、諸条件を検討し、約80%以上のNIVをオキシム化することに成功した。

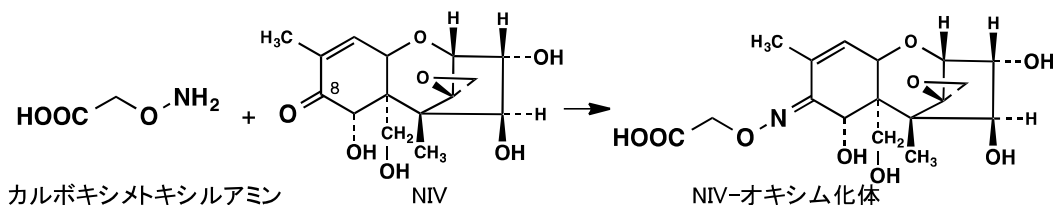


図2. NIVのオキシム化体の合成

次に、NIV-オキシム化体を精製後、蛋白質と結合させた。これでマウスを免疫後、細胞融合を行い、世界で初めてNIV特異的モノクローナル抗体を作製し、これらの抗体を用いたELISAなどの簡易分析法を開発することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

NIV-オキシム化体の合成と精製およびNIV-オキシム-蛋白質結合体の作製

NIV (5.0 mg)にピリジン 1.0 mL 加え、溶解した。カルボキシメトキシルアミンヘミ塩酸塩 5.6 mg をピリジン 1.0 mL に溶解し、NIV 溶液と混合し、40 °C で 16 時間反応させた。反応液を遠心エバポレーター(40 °C)で減圧乾固した。残渣を 25 mL のアセトニトリル:メタノール:水 = 5 : 5 : 90 (v/v/v)に再溶解し、分取 HPLC で NIV-オキシム化体を精製した。なお、分取 HPLC では、カラムは Shim-pack CLC-ODS 6.0 mmID × 15 cm (株)島津ジーエルシー、移動相はアセトニトリル:メタノール:水:酢酸 = 4 : 4 : 90 : 2(v/v/v/v)を用い、254 nm でモニターした。NIV-オキシム化体

を水溶性カルボジイミド法で卵白アルブミン (OVA) と結合させ、ウシ血清アルブミン (BSA) とカチオン化 BSA (cBSA) とは、N-ヒドロキシスクシンイミド法で結合させた。

マウスの免疫

NIV-oxime-BSA または NIV-oxime-cBSA をフロイントアジュバントと共に BALB/c マウスに 1 匹あたり 50 μg ずつ、2 週間毎に 4 回免疫した。4 回免疫 1 週間後に採血し、抗血清中の抗体価を間接 ELISA で測定し、NIV 特異的抗体の存在を間接競合的 ELISA で評価した。

間接 ELISA と競合的間接 ELISA

NIV-oxime-OVA を 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように 0.01M 炭酸-重炭酸緩衝液 pH 9.6 で調製し、50 $\mu\text{L}/\text{well}$ に加え、4 で一晩静置して、コーティングを行った。0.05% Tween 20 を含む PBS (PBS/Tween) で 3 回洗浄後、0.1% OVA を 125 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、室温で 1 時間、ブロッキングを行った。PBS/Tween で 3 回洗浄後、PBS で 50 倍、500 倍、5,000 倍希釈したマウス抗血清または培養上清をそれぞれ 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、室温で 45 分間反応させた。PBS/Tween で 3 回洗浄後、PBS/Tween で 1/4,000 希釈した ALP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を各ウェルに 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、室温で 45 分反応させた。PBS/Tween 3 回洗浄を 2 回行った後、100 μL の基質溶液 (1 mg/mL の *p*-nitrophenylphosphate と 1 mM MgCl_2 を含む 0.1 M diethanolamine-HCl 緩衝液、pH 9.8) を各ウェルに加え室温で 30 分反応させ、405 nm の吸光度を測定した。

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、PBS で希釈した NIV 溶液を 50 μL ずつ各ウェル加えた後、PBS で希釈したマウス抗血清または培養上清を 50 μL ずつ各ウェル加え攪拌後、室温で 60 分間競合反応させた。これ以降は、上記と同様に操作した。

細胞融合とクローニング

NIV に対し特異抗体が確認できたマウスに細胞融合 3 日前にマウス 1 匹当たり 12.5 μg の NIV-oxime-cBSA (PBS 溶液) を静脈内投与した。マウスから脾臓を取り出し、常法で 50% PEG 1500 を用いマウスミエローマ SP2/0-Ag14 と細胞融合を行った。HAT 選択後、ハイブリドーマの増殖を確認できた 12 日目に培養上清を取り、上記の間接 ELISA でスクリーニングを行った。また、陽性ウェルの抗体の反応性は、上記の競合的間接 ELISA で評価した。陽性ウェルの細胞は 24 ウェル培養プレートに移し培養し、再度 抗体の生産を確認した後に限外希釈法で 2 回以上のクローニングを行った。

競合的間接 ELISA の至適化と抗体の特異性の検討

ELISA の至適化を行った結果、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の NIV-oxime-OVA でコーティングを行ない、2 次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ標識 Goat Anti-mouse IgG 抗体を用い、基質溶液として 0.1 mg/mL TMBZ と 0.005% H_2O_2 を溶解させた 0.01 M 酢酸緩衝液 pH 5.0 を用いた。

4 . 研究成果

NIV-オキシム化体の合成と精製

NIV とカルボキシメトキシルアミンヘミ塩酸塩との反応液のクロマトグラムを図3に示した。約3分のピークが未反応のカルボキシメトキシルアミンのピークであり、約6.8分が未反応のNIVのピークであり、11.6から15分のプロードのピークが、NIV-オキシム化体のピークであった。このNIV-オキシム化体のプロードピークを分取した。

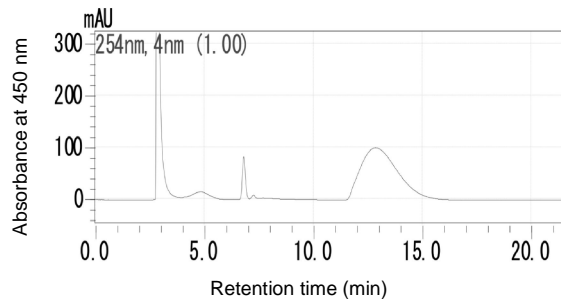


図3 NIV とカルボキシメトキシルアミンヘミ塩酸塩との反応液のクロマトグラム

NIV-oxime-BSA と NIV-oxime-cBSA で免疫したマウス抗体価の比較

NIV-oxime-BSA と NIV-oxime-cBSA でそれぞれ4回免疫したマウス抗血清の NIV-oxime-OVA との反応性を比較した結果を図4に示した。NIV-oxime-BSA で免疫したマウス抗血清(図4A)では、mouse #1の1匹のみが有意に NIV-oxime-OVA との反応性が上昇していた。一方、NIV-oxime-cBSA で免疫したマウス抗血清(図4B)では、5匹すべてが有意に NIV-oxime-OVA との反応性が上昇していた。また、競合的間接 ELISA では、mouse #9 以外は、NIV と用量依存的に反応しており、NIV 特定の抗体が存在を確認した。以上の結果から、少なくとも NIV-oxime をハプテン抗原とした場合、cBSA をキャリアー蛋白質として用いることで、NIV 特異的抗体を誘導できることが明らかとなった。

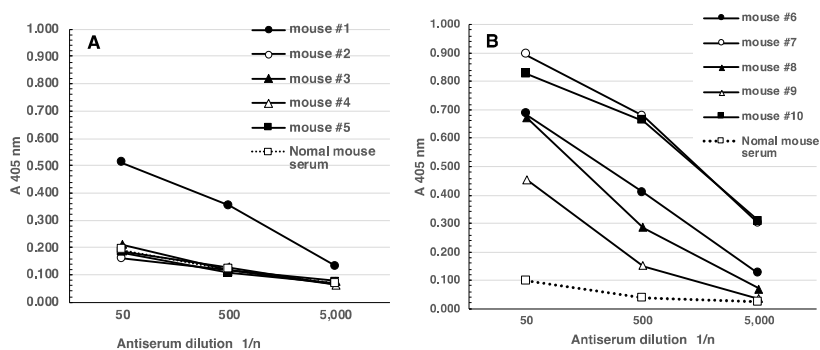


図4 NIV-oxime-BSA と NIV-oxime-cBSA で免疫したマウス抗血清の NIV-oxime-OVA との反応性の比較 Aは NIV-oxime-BSA で、Bは NIV-oxime-cBSA で免疫したマウス抗血清

細胞融合とクローニング

NIV に対する抗体価の上昇の認められたマウスの脾臓細胞とマウスミエロマー細胞の細胞融合を行った。細胞融合後、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を確認した。培養12日目に培養上清を取り、間接 ELISA で NIV-oxime-OVA との反応性を確認した。その結果、72 ウェルの吸光度が 0.5 以上であった。これらの培養上清中の抗体の NIV との反応性を競合的間接 ELISA で調べた。その結果、NIV との反応性が強い上位 30 ウェルを選択し、限界希釈法でクローニングを行った。2 回以上のクローニングを行い、安定に抗 NIV 特異抗体モノクローナル抗体を生産しているハイブリドーマを 19 クローン得て、NIV.1 ~19 と命名した。

競合的間接 ELISA の至適化と抗体の特異性の検討

これらの 19 クローンのうち、NIV との反応性の高かった NIV.9~13 抗体の特異性を至適化した競合的間接 ELISA で調べた。まず、これらの抗体の NIV との反応性を比較した結果を図5に

示した。NIV.10 抗体が最も NIV との反応性が高く結合率 50% は 5 ng/mL であった。他の抗体の結合率 50% は何れも約 10 ng/mL であった。結合率 80% (阻害率 20%) を検出感度とした場合、NIV.10 と 11 抗体を用いた場合、1 ng/mL までの NIV が検出可能であった。

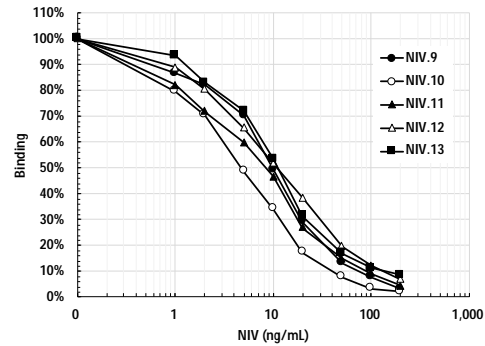


図5 NIV-oxime-cBSA で免疫したマウス抗血清の NIV の反応性

次に、NIV 関連化合物との交差反応性について調べた。その結果を図 6 に示した。

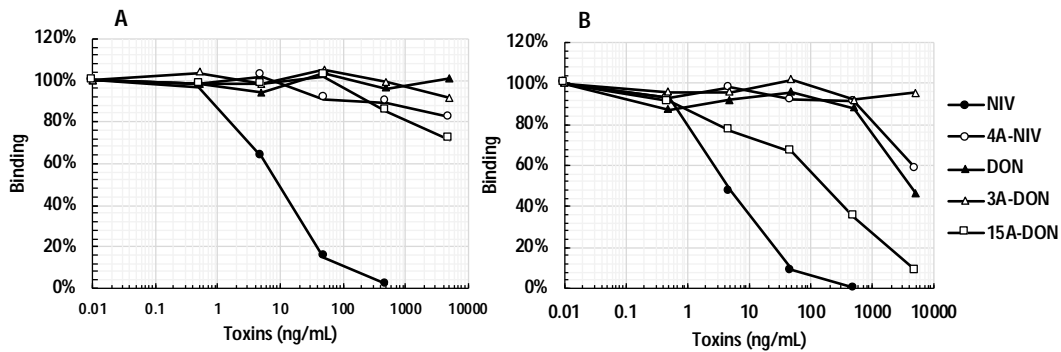


図6 NIV.9 と 11 抗体の NIV 関連化合物との交差反応性
A が NIV.9、B が NIV.11 抗体

NIV.9 抗体は、NIV との特異性が高く 5 $\mu\text{g/mL}$ までの NIV 関連化合物との反応性はほとんど認められなかった(図 6A)。NIV.11 抗体は、15-acetyl DON (15A-DON) と強い交差反応性を示し、DON と 4-acetyl NIV (4A-NIV) に弱い交差反応性を示したが、3-acetyl DON (3A-DON) とはほとんど反応しなかった(図 7B)。NIV.10、12 と 13 抗体の交差反応性はほぼ同じで、15A-DON と交差反応を約 0.1% 示したが、5 $\mu\text{g/mL}$ までのそれ以外の NIV 関連化合物との反応性はほとんどなかった。

本報告は、NIV に特異的なモノクローナル抗体の作製に成功した初めての報告である。これらの抗体を用いた簡便かつ高感度な NIV の簡易分析法が確立と利用され、NIV のリスクが明確になることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川村 理、冨本 卓、角ありさ
2. 発表標題 ニバレノールに対する特異的モノクローナル抗体の作製
3. 学会等名 日本マイコトキシン学会第 87 回学術講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------