

## ゼアラレノンに対するモノクローナル抗体の作製

川村 理・江本知朗

## Production of monoclonal antibodies against zearalenone

Osamu KAWAMURA and Akio EMOTO

## Abstract

In order to establish immunological analytical methods for zearalenone (ZEN), worldwide occurring in cereal grains and feeds contaminated *Fusarium graminearum*, specific monoclonal antibodies (mAbs) against ZEN were newly prepared. Spleen cells from the mice immunized with ZEN-bovine serum albumin were fused with SP2/O myeloma. After HAT selection and cloning, two anti-ZEN antibody producing hybridomas (ZEN. 1 and 2) were obtained. In the indirect competitive ELISA with ZEN. 2, the limit of detection was 0.25 ng/mL. The ZEN. 2 mAb cross-reacted with  $\alpha$ -zearalenol (60%),  $\beta$ -zearalenol (5.7%),  $\alpha$ -zearalanol (7.1%), and  $\beta$ -zearalanol (0.9%). Our ELISA was sensitive and specific previously reported ELISAs.

**Key words :** Zearalenone, Monoclonal antibody, ELISA

## 緒 言

ゼアラレノン (zearalenone, ZEN, Fig. 1) は, *Fusarium graminearum*などが産生するマイコトキシンで, 高頻度に麦類やトウモロコシをはじめとする穀類の汚染が報告されている<sup>(1)</sup>. ZENは致死性の急性毒性はそれほど強くないが, 女性ホルモン作用を有し, ZENの混入した飼料を摂取した家畜に過エストロゲン症を引き起こし, 外陰部および乳房の腫れ, 子宮肥大, 卵巣の変化と不妊症などを引き起こすことが知られている<sup>(2-3)</sup>. そのため, 穀物や飼料中の簡便かつ高感度なZENの検出・定量法が必要とされている. そこで, 本研究では, ZENの簡便かつ高感度な免疫化学的測定法の確立を目的として, ZENに対するモノクローナル抗体を作製し, 競合的間接ELISAで抗ZEN抗体の特異性を検討した.

## 材料および方法

## 材 料

ZEN,  $\alpha$ -ゼアラレノール ( $\alpha$ -zearalenol,  $\alpha$ -ZEL),  $\beta$ -ゼアラレノール ( $\beta$ -zearalenol,  $\beta$ -ZEL),  $\beta$ -ゼアラノール ( $\beta$ -zearalanol,  $\beta$ -ZAL), ZEN-bovine serum albumin (BSA) conjugate, 卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) Grade III, 1-ethyl-3, 3'-diethylamino-propyl-carbodiimide (EDPC) はSigma Chemical社製を,  $\alpha$ -ゼアララノール ( $\alpha$ -zearalanol,  $\alpha$ -ZAL), ヘミ塩酸カルボキシ

メトキシルアミン(CMA), 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMBZ), フロイント完全アジュバンドおよびフロイント不完全アジュバンドは和光純薬社製を, horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウスイムノグロブリン抗体およびalkaline phosphatase (ALP) 標識ヤギ抗マウスイムノグロブリン抗体はTago社製をそれぞれ用いた. その他の試薬は特級又は同等品を用いた. BALB/cマウス (7週令, メス) は日本エスエルシーより購入した.

## ZEN-OVA結合体の作製

ZEN-6'-カルボキシメチルオキシム (ZEN-CMO, Fig. 1) は, ThouvenotとMorfinの方法<sup>(4)</sup>を一部変えて作製した. すなわち, ZEN 10.1mg (31  $\mu$ mol) を1mlのピリジンに溶解後, CMA 20.1mg (92  $\mu$ mol) を加え, 遮光して攪拌しながら室温で24時間反応させた. 溶媒を留去したのち残渣を5mlのNaOHでpH8に調整した水に溶解したのち, 0.1M塩酸でpH3.0に調整した. 酢酸エチルエステル7mlで6回抽出後, 酢酸エチルエステル層を集め, 無水硫酸ナトリウムで脱水後, 溶媒を留去した. ZEN-CMOは, TLC (シリカゲル60 (MERCK), 展開溶媒: クロロホルム: エタノール (97+3) を用いたときZENのRf値は0.70, ZEN-オキシムのRf値は0.15) で確認した.

ZEN-CMOとOVAとの結合は, Kawamuraらの方法<sup>(5)</sup>を一部変えて作製した. すなわち, ZEN-CMO 4.2 mgを0.5mlのメタノールに溶解後, 3mlの0.1Mリン酸緩衝

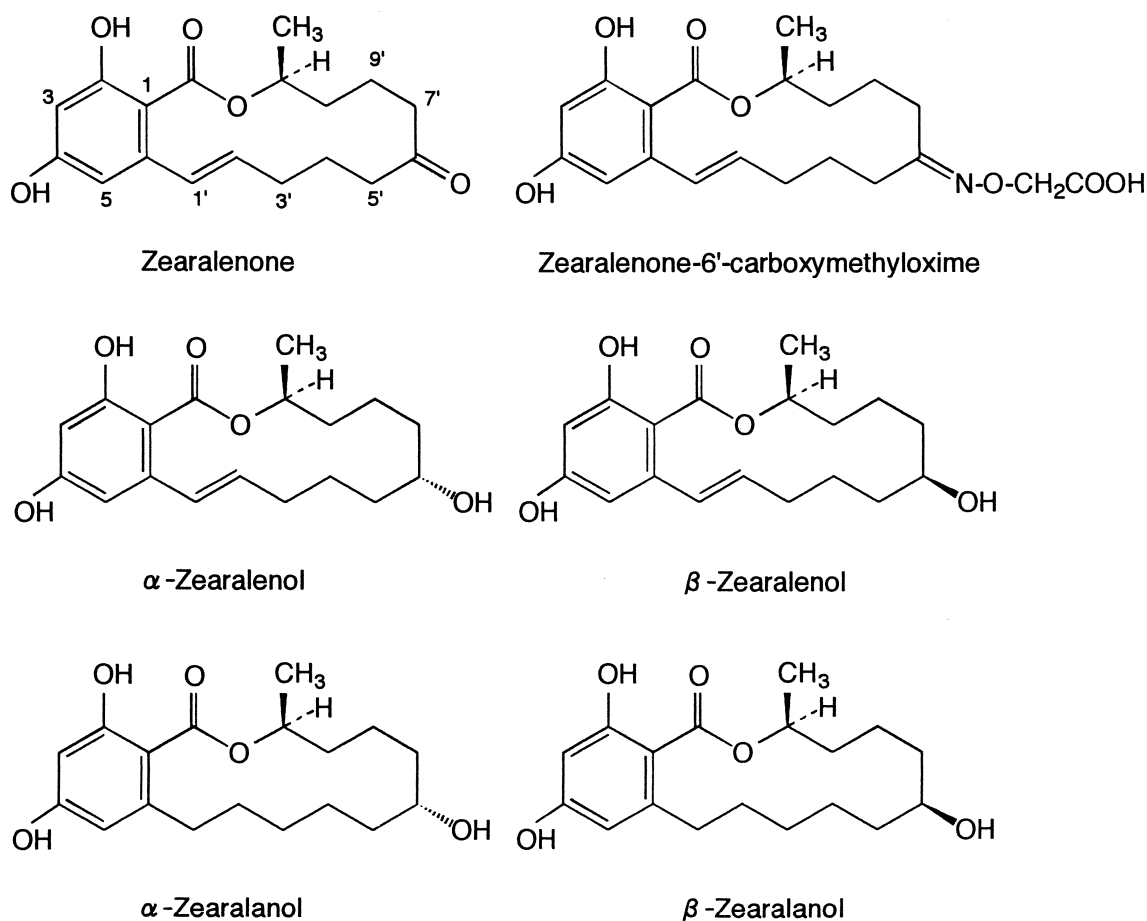


Fig. 1. The structures of zearalenone analogous

液pH7.0と混合後、EDPC 4.4mgを加えた。この溶液とOVA 10mgを溶解した5mlの0.1M NaClを混合し、遮光し、室温でゆっくり攪拌させながら20時間反応させた。反応液は、0.01Mリン酸緩生理食塩水pH7.4（以下PBS）1Lに対して4℃で4回透析した。また、同様にしてZEN-オキシムを加えないEDPC処理OVA（EDPC-OVA）も作製した。透析後タンパク濃度はBCA法で測定し、314nmの吸光度からZENの結合数を算出した。

### 免疫

BALB/cマウス（7週令，メス）に等量のプロイント完全アジュバントと乳化したZEN-BSA 10 $\mu$ gを皮下注射した。1週間後，等量のプロイント不完全アジュバントと乳化したZEN-BSA 10 $\mu$ gを皮下注射し，その1週間後，等量のプロイント不完全アジュバントと乳化したZEN-BSA 10 $\mu$ gを腹腔内投与した。その4週間後，等量のプロイント不完全アジュバントと乳化したZEN-BSA 10 $\mu$ gを皮下注射し，4回目の免疫1週間後，採血し，抗体価を測定した。抗体価の高かったマウスに細胞融合3日前にZEN-BSA 5 $\mu$ gを静注した。

### 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<sup>(6)</sup>により細胞融合を行った。HAT選択後，ZEN-OVAに対する結合性により，ハイブリドーマの選択を行い，限外希釈法<sup>(6)</sup>により，2回以上のクローニングを行い，安定な抗ZEN抗体産生ハイブリドーマを得た。抗体のアイソタイプは，マウスモノクローナル抗体アイソタイプングキットII（PIERCE）を用いて決定した。

### 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，ZEN-OVA（5 $\mu$ g/ml 0.01M炭酸緩衝液pH9.6）を50 $\mu$ l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℃で一晩静置し，コーティングを行った。プレートを0.05%Tween20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150 $\mu$ lずつ加え，室温で1時間静置し，ブロッキングを

行った。プレートにPBS/Tweenで3回洗浄したのち、 $50 \mu\text{l}$ のマウス抗血清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4回洗浄したのち、 $50 \mu\text{l}$ のALP標識ヤギ抗マウスIgG抗体（PBS/Tweenで1/2,000希釈）を加え、室温で1時間反応させた。プレートをPBS/Tweenで6回洗浄したのち、 $100 \mu\text{l}$ の1 mg/mLの4-nitrophenyl phosphate, disodium salt hexahydrate (Fermentasa Life Sciences) と10 mM  $\text{MgCl}_2$ を含む1 Mジエタノールアミン緩衝液 (pH 9.8) を加え、室温で30分間酵素反応を行い405 nmの吸光度を測定した。

### 競合的間接ELISA

競合的間接ELISAで抗ZENモノクローナル抗体の特異性の検討を行った。上記の間接ELISAと同様にZEN-OVAを $100 \mu\text{l}$ /ウェルでコーティングを行ったのち、同様にブロッキングを行った。10% (v/v) メタノールを含むPBS/Tween溶液で希釈したZEN,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL,  $\alpha$ -ZAL, または $\beta$ -ZALを $50 \mu\text{l}$ を加え、さらに、PBS/Tweenで希釈した各抗ZENモノクローナル抗体を $50 \mu\text{l}$ に加え攪拌後、室温で1時間反応させた。プレートをPBS/Tweenで4回洗浄したのち、 $100 \mu\text{l}$ のHRP標識ヤギ抗マウスIgG抗体（PBS/Tweenで1/10,000希釈）を加え、室温で1時間反応させた。プレートをPBS/Tweenで6回洗浄したのち、 $100 \mu\text{l}$ の0.005%過酸化水素と0.1 mg/mlのTMBZを含む0.1 M酢酸緩衝液 (pH 5.0) を加え、室温で30分間酵素反応を行った。1 M硫酸 $50 \mu\text{l}$ を加え反応を停止したのち、450 nmの吸光度を測定した。

## 結果及び考察

### モノクローナル抗体の作製

細胞融合後、220ウェルに細胞をまき、HAT選択後、155ウェル (68%) でハイブリドーマの増殖を確認した。これらの培養上清を間接ELISAでZEN-OVAに対する結合活性を調べた結果、7ウェル (6.9%) が陽性であった。この7ウェルのハイブリドーマを限界希釈法でクローニングを2回行った結果、6クローンのZEN-OVAと反応するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得た。これらのクローンの産生する抗体をZEN. 1～6と名付けた。

### 抗体の特性

これらの抗体の特性を明らかにするために、競合的間接ELISAでZENと $\alpha$ -ZALとの反応性を検討した (Fig. 2)。その結果、ZEN. 1と2抗体では、 $1 \mu\text{g/ml}$ のZENまたは $\alpha$ -ZAL共存下でZEN-OVAとの反応が強く阻害 (90%以上) されたが、ZEN. 4と5抗体では、 $10 \mu\text{g/ml}$ のZEN存在下でも結合阻害は認められなかった。ZEN. 4抗体では、 $1$ と $10 \mu\text{g/ml}$ の $\alpha$ -ZAL共存下でそれぞれ15%、25%の阻害が認められ、ZEN. 5抗体では、 $10 \mu\text{g/ml}$ の $\alpha$ -ZAL共存下でのみ16%阻害されたにすぎなかった。この結果よりZEN. 4と5抗体は $\alpha$ -ZALと弱い反応性を有する抗体であると言える。また、ZEN. 3と6抗体では、 $10 \mu\text{g/ml}$ のZENまたは $\alpha$ -ZAL共存下でも有為なZEN-OVAとの結合阻害は確認なかった。ZENと $\alpha$ -ZALとの反応性の強いZEN. 1と2抗体のアイソタイプをマウスモノクローナル抗体アイソタイプング

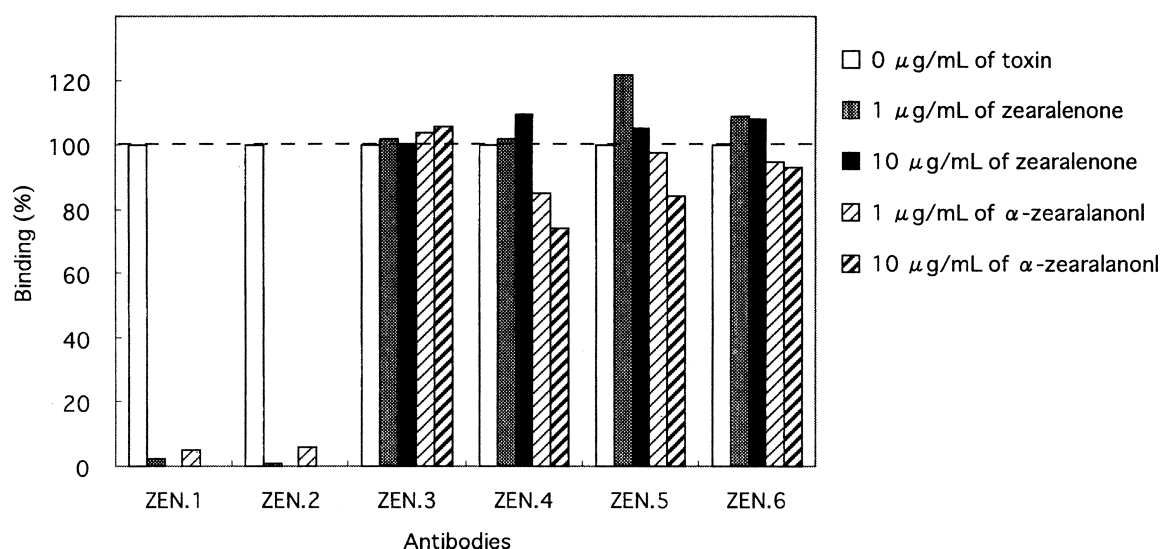


Fig. 2. Comparison of inhibition presence of zearalenone or  $\alpha$ -zearalanol with ZEN. 1, 2, 3, 4, 5, and 6 antibodies in the indirect competitive ELISA.

キットIIを用いて調べた結果, いずれもIgG2a・ $\kappa$ であった。

ZEN. 1と2抗体の交差反応性を検討した結果, 両抗体はほぼ同じ交差反応性を有していた。そこで, より抗体価の高かったZEN. 2抗体をについて詳細にその特異性を検討した (Table 1およびFig. 3)。その結果, ZEN. 2抗体は0.25ng/mlまでのZEN存在下で有為に阻害 (15%以上) が認められた。すなわち, 本ELISAでは0.25ng/mlまでのZENの検出が可能であった。また, 50%結合阻害に必要なZENおよびZEN関連化合物の濃度は, ZENで1.2ng/mL,  $\alpha$ -ZELで2.0ng/mL,  $\beta$ -ZELで20.9ng/mL,  $\alpha$ -ZALで16.8ng/mL,  $\beta$ -ZALで131.6ng/mLであり, ZENとの反応性を100%とした場合の交差反応性は,  $\alpha$ -ZELが60.0%,  $\beta$ -ZELが5.7%,  $\alpha$ -ZALが7.1%,  $\beta$ -ZALが0.9%であった。これらの結果から, ZEN. 2

抗体は, ZENの全体の構造を認識し, 6'位のOH基が $\alpha$ 位だと $\beta$ 位より約10倍強く反応した。また, 1'と2'炭素が2重結合であると単結合より約10倍強く反応したことから, ベンゼン環と1'と2'炭素が平面構造であることがZEN. 2抗体との結合に関与している可能性が示唆された。

ZEN. 2抗体を用いたELISAと既報のELISAとを比較すると, Dixonら<sup>(7)</sup>のモノクローナル抗体を用いたELISAでは, 0.5ng/mLまでのZENの検出が可能であり, 我々のELISAの方が2倍感度が高い。また, DixonらのELISAではZENと $\alpha$ -ZELにほぼ同程度に反応し,  $\beta$ -ZEL,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZALに対しても25~35%と比較的強い交差反応性を示したが, 我々のELISAでは,  $\alpha$ -ZELと60%の強い交差反応性を示したが,  $\beta$ -ZEL,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZALとはいずれも8%以下であり, より特異的にZENの検出が可能であった。また, Warnerら<sup>(8)</sup>のウサギの抗血清を用いたELISAの検出感度は0.5ng/ml, 50%阻害に必要なZENの濃度は5.8ng/mlであり, 我々のELISAの方が, それぞれ約2倍, 約5倍小さい値であった。

我々が新たに樹立したハイブリドーマZEN. 2の産生する抗体を用いたELISAは, 高感度で特異性の点でも既報のELISAより優れており, ZENの検出に有用な手法として期待できる。

Table 1. Cross-reactivity of zearalenone analogous in the indirect competitive ELISA with ZEN. 2 antibody.

Analogue	Amount of required for 50% inhibition (ng/mL)	Cross-reactivity (%)
Zearalenone	1.2	100.0
$\alpha$ -Zearalenol	2.0	60.0
$\beta$ -Zearalenol	20.9	5.7
$\alpha$ -Zearalanol	16.8	7.1
$\beta$ -Zearalanol	131.6	0.9

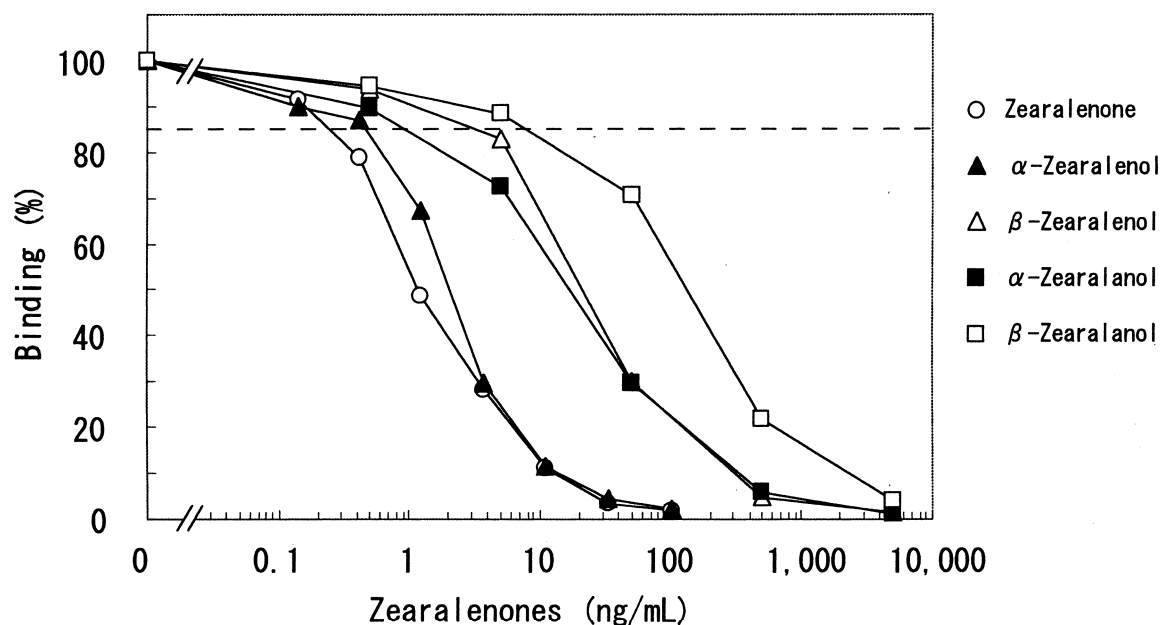


Fig. 3. Cross-reactivity of ZEN. 2 monoclonal antibody in the indirect competitive ELISA. The detection limits, expressed as concentration giving over 15% (---) inhibition observed in the indirect competitive ELISA, were 0.25 ng of zearalenone/mL.

## 要 約

ZEN-BSAで免疫したマウスの脾臓細胞とミエローマ細胞を融合することにより、2つの抗ZENモノクローナル抗体（いずれもIgG2a・κ）産生ハイブリドーマ（ZEN. 1と2）を樹立した。競合的間接ELISAにおい

て、ZEN. 2抗体を用いた場合0.25ng/mLのZENの検出が可能であった。また、ZEN. 2抗体は、α-ZEL, β-ZEL, α-ZAL, β-ZALとそれぞれ60%, 5.7%, 7.1%, 0.9%の交差反応性を示し、既報のモノクローナル抗体より検出感度、交差反応性の点で優れていた。本ELISAはZENの検出に有用な手法として期待できる。

## 引 用 文 献

- (1) PLACINTA, C. M., D'MELLO, J. P. F., and MACDONALD, A. M. C. : A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Sci. and Technol.*, **78**, 21-37 (1999).
- (2) D'MELLO, J. P. F., PLACINTA, C. M., and MACDONALD, A. M. C. : *Fusarium* mycotoxins : a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Sci. and Technol.*, **80**, 183-205 (1999).
- (3) CONKOVA, E., LACLAKOVA, A., KOVAC, G., and SEIDEL, H. : Fusarial toxins and their role in animal diseases. *The Veterinary J.*, **165**, 214-220 (2003).
- (4) THOUVENOT, D. and MORFIN, R. F. : Radioimmunoassay for zearalenone and zearalanol in human serum : Production, properties, and use of porcine antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 16-23 (1983).
- (5) KAWAMURA, O., SATO, S., KAJII, H., NAGAYAMA, S., OHTANI, K., CHIBA, J. and UENO Y. : A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A based on monoclonal antibodies, *Toxicon*, **27**, 887-897 (1989).
- (6) OI, V. T. and HERZENBURG, L. A. : Immunoglobulin-producing hybrid cell lines, In B. B. Mishell and S. W. Shiigi (eds.) *Selected Methods in Cellular Immunology*. pp351-371. W. H. Freeman & Co. San Francisco (1980).
- (7) DIXON, D. E., WARNER, R. L., RAM, B. P., HART, L. P., and PEASTKA, J., J. : Hybridoma cell line production of a specific monoclonal antibody to the mycotoxins zearalenone and α-zearalenol. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 122-126 (1987).
- (8) WARNER, R., RAM, B. P., HART, L. P., and PEASTKA, J., J. : Screening for zearalenone in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 714-717 (1986).  
(2005年9月30日受理)