

## オクラトキシンBに対するモノクローナル抗体の作製

川村 理・鈴木祐介

### Production of monoclonal antibodies against ochratoxin B

Osamu Kawamura and Yusuke Suzuki

#### Abstract

Monoclonal antibodies against ochratoxin B (OTB) were generated by immunizing Balb/c mice with OTB conjugated to keyholelimpet hemocyanin (KLH). Eight stable hybridoma cell lines, named OTB.1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8, were obtained. All antibodies were IgG<sub>1</sub> · kappa. The detection limit was 0.01 ng/mL of OTB and 50 % binding inhibition was reached at 500 nM free OTB in an indirect competitive ELISA using OTA.2 antibody. It was approximately 1,000 times higher sensitivity than the previous reported. The cross-reactivity of OTB.4 and OTB.5 antibodies were 25~46 % of ochratoxin A (OTA). OTB.2 and OTB.7 antibodies were equally reacted with OTA and B. OTB.1, OTB.3, and OTB.6 were strongly reacted with OTA (148~266 %) rather than OTB. The establishment of a high sensitive immunochemical assay such as ELISA or the immunoaffinity column method that were possible the detection of OTA and OTA by using these antibodies was expected.

**Key Words :** ochratoxin B, ochratoxin A, monoclonal antibody, indirect competitive ELISA

#### 緒 言

オクラトキシンB (ochratoxin B, OTB) は、オクラトキシンA (OTA) の脱クロル体であり (Fig. 1), OTAよりは毒性が弱いながら同様に肝臓・腎臓障害などの毒性を有しており<sup>(1, 2, 3, 4)</sup>, 麦類, トウモロコシ, 米, これらの加工品, ワイン, ビール, コーヒー, 乾燥果実, 肉類など広範囲な食品を汚染していると考えられている<sup>(5, 6)</sup>. 液-液分配法や固相抽出法<sup>(7, 8, 9)</sup>, ではOTAとBの同時分析が可能であるが, 近年汎用されているイムノアフィニティーカラム (IAC) 法<sup>(10)</sup>では, 多くの場合OTAに対する特異抗体が使用されるためにOTBの分析ができないので, 農作物や食品中のOTBの汚染実態があまり明確でないのが現状である. そこで, OTAとBの同時分析可能な免疫化学的測定の確立を目的として, OTBに対するモノクローナル抗体を作製し, これらの特異性について検討した.

#### 材料および方法

##### 材料及び標準液

OTAとOTBはシグマアルドリッチ社製を用いた. OTAは10 μg/mLになるようにメタノールに溶解し, 吸光度を測定し, 333 nmのモル吸光係数6,400から正確な濃度を算出した. また, OTBも同様にエタノールに溶解し, 吸光度を測定し, 318 nmのモル吸光係数6,900から正確な濃度を算出した. OTAとOTB溶液を希釈混合し, それぞれが1 μgになるように小試験管に分注し, 溶媒を完全に留去し, -20℃で保存した. 必要に応じて, 溶解し実験に用いた.

ウシ血清アルブミン (BSA), 3,3', 5,5' -ttramethylbenzidine (TMBZ), フロイド完全アジュバンドおよびフロイド不完全アジュバンドは, 和光純薬社製を卵白アルブミン (OVA) は生化学工業社製を用いた. 1-ethyl-3,3'-diethylamino propyl carbodiimide (EDPC), シグマアルドリッチ社製を, 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

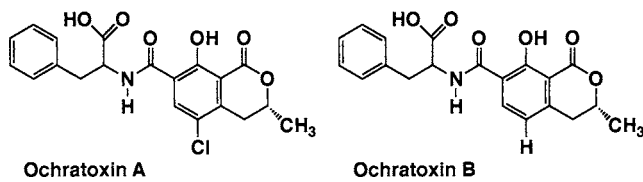


Fig. 1 オクラトキシンAとBの構造式

社製をそれぞれ用いた. その他の試薬は, 特級又はそれ以上のものを用いた. BALB/cマウス (8週令, メス) は日本SLCより購入した.

### OTB-蛋白質結合体の作製

OTB-蛋白質結合体は, 川村らの方法<sup>(10)</sup>に準じてBSA及びKLHと結合させた. すなわち, OTB (1 mg) に50  $\mu$  Lのエタノールを加えて溶解し, 0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.6 mLを加えた. BSA又はKLH 10 mgを0.1M塩化ナトリウム水溶液1 mLに溶解し, 両者を混合した. この混合液にそれぞれEDPC 5 mgを加え加えて暗所で18時間室温ゆっくり攪拌しながら反応させた. 反応液を透析膜に移して4°Cで0.01Mリン酸緩衝生理食塩水, pH 7.3 (PBS) 1 Lに対して4回透析を行った.

透析後, OTB-蛋白質結合体の蛋白質濃度はBCA法で測定し, 200から500 nmのUV-可視吸収を測定し, 370 nmのOTBの特異吸収からOTBの蛋白質結合数を算出した.

### 免疫

作製したOTB-KLHを免疫原とし, 初回はフロインド完全アジュバンドと共にマウス1匹当たり10  $\mu$  gの抗原を皮下投与した. 10日後にフロインド不完全アジュバンドと共に同量を皮下投与した. さらに10日後にFIAと共に同量を腹腔内投与し, 7日後に採血し, OTB-BSAを固相抗原として用いた間接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5  $\mu$  gのOTB-KLH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臓細胞を取り出し, 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<sup>(11)</sup>により細胞融合を行った. HAT選択後, OTB-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<sup>(11)</sup>により, 2回以上のクローニングを行い, 安定な抗OTB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 (Amersham社製) 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, OTB-BSA (2  $\mu$  g/mL, 0.1M炭酸緩衝液pH 9.6) を100  $\mu$  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°C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. プレートをPBS/Tweenで3回洗浄したのち, 50  $\mu$  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, 100  $\mu$  LのALP標識ヤギ抗マウスイムノグロブリン抗体 (PBS/Tweenで1/5,000希釈) 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  $\mu$  Lの

-ニトロフェニルリン酸 (PNPP) を1 mg/mLの濃度で0.1Mジエタノールアミン緩衝液 (pH 9.8) 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

抗体の特異性は競合的間接ELISAで行った. コーティングはOTB-BSA 500 ng/mLで上記と同様に行い, ブロッキング後洗浄し, 10%メタノール含むPBS/Tweenで希釈したOTB及び関連化合物を50  $\mu$  Lを各ウェルに加え, そこにPBS/Tweenで希釈した培養上清を同量加え, 室温で1時間競合反応させた. 洗浄後, HRP標識ヤギ抗マウスイムノグロブリン抗体 (PBS/Tweenで1/5,000希釈) 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  $\mu$  lの0.005%過酸化水素と0.1 mg/mlのTMBZを含む0.1M酢酸緩衝液 (pH5.0) を加え, 室温で30分間酵素反応を行った. 1 M硫酸50  $\mu$  lを加え反応を停止したのち, 450 nmの吸光度を測定した.

### 結果および考察

#### モノクローナル抗体の作製

細胞融合後, 354ウェルに細胞をまき, HAT選択後, 354ウェル中83ウェル (23%) でハイブリドーマの増殖が見られ, スクリーニングでは83ウェル中15ウェル (18%) で活性が認められた. 活性が見られたウェル中13ウェルを選択し, 2回のクローニングを行った. その結果, 8クローンの安定な抗OTB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OTB.1, 2, 3, 4, 5, 6, 7と8と名付けた. また, これらの抗体のアイソタイプはすべてIgG<sub>1</sub>・ $\kappa$ であった.

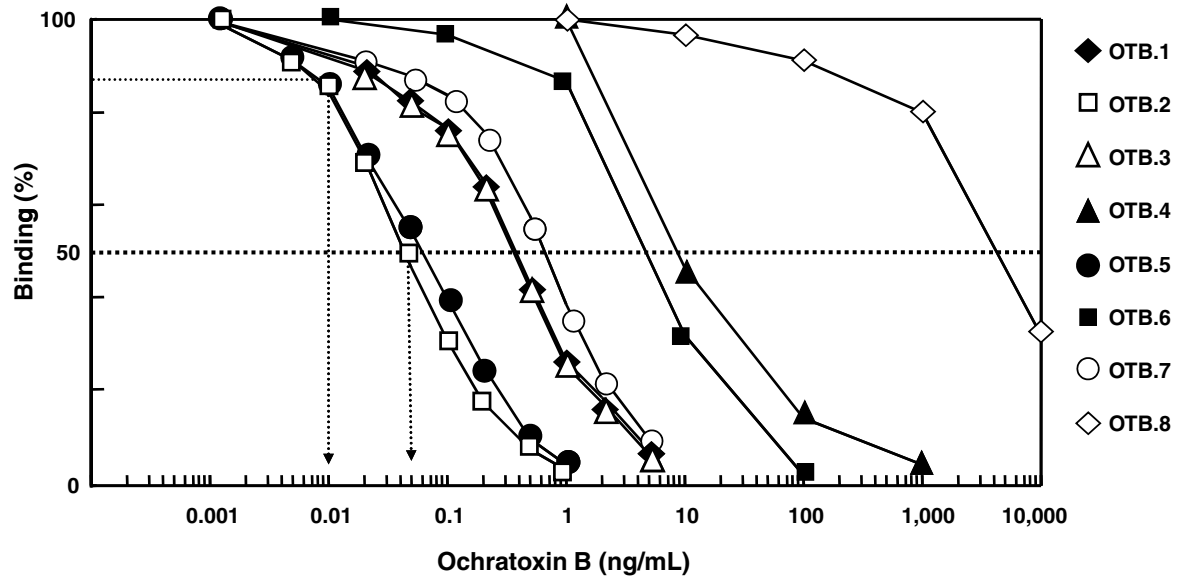


Fig. 2 競合的間接ELISAによる各抗体とOTBの反応性

#### 抗体の特性

これらの抗体の特性は、競合的間接ELISAでのOTBの検量線を作製し比較した (Fig. 2). OTBとの反応性が高い順は、OTB.2≒OTB.5>OTB.3=OTB.1>OTB.6>OTB.4>OTB.8抗体であった。最も反応性の強いOTB.2と5抗体では、0.01 ng/mL (0.027 nM) までのOTBの検出が可能であった。OTB.2抗体を用いた場合OTBで50%結合阻害する濃度は0.05 ng/mL (0.135 nM) であった。Heussnerらの報告<sup>(12)</sup>では、検出限界が27 nMで、50%結合阻害濃度は500 nMであることから、我々OTB.2抗体の方が検出感度で約1,000倍、50%結合阻害濃度約3,700倍高感度であった。

OTBと反応性の高かった7つの抗体の交差反応性を競合的間接ELISAで調べた。OTB関連化合物で50%結合阻害する濃度÷OTBで50%結合阻害する濃度×100 (%) で評価した。結果を表1に示した。OTB.4抗体がOTBに最も特異的で次いで、OTB.5抗体が特異的であった。OTB.2と7抗体は、OTAとOTBを同程度反応する抗体であった。一方、OTB.1、3と6抗体は、OTB-KLHで免

疫したのにもかかわらず、OTAとの反応性が高い抗体で、特にOTB.3抗体は2倍以上OTAに強く反応する抗体であった。Heussnerらの報告<sup>(12)</sup>では、OTAとの交差反応は3.3%なので、特異性の点では劣っていた。

競合的間接ELISAでOTB.2または5抗体を用いた場合、10 pg/mLまでのOTBの検出が可能であり、また、OTB.2抗体はOTAとOTBを同程度反応することから、これらの抗体を用いることでOTAとBの同時検出が可能なELISAやイムノアフィニティーカラム法など免疫化学的測定法の確立が期待された。

#### 摘 要

OTB-KLHで免疫したマウスの脾臓細胞とミエローマ細胞を融合し、8つの抗OTBモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを樹立した。競合的間接ELISAでOTB.2または5抗体を用いた場合、10 pg/mLまでのOTBの検出が可能で、既報のものより約1,000倍高感度であった。OTB-KLHで免疫を行ったが、OTAと強く反応する3抗体と

Table 1 各抗体の交差反応性

OTB analogous and citrinin	Monoclonal antibodies						
	OTB.1	OTB.2	OTB.3	OTB.4	OTB.5	OTB.6	OTB.7
Ochratoxin B	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Ochratoxin A	161.0	93.7	266.0	25.8	45.9	147.9	92.3
Ochratoxin C	1.34	1.48	1.16	6.83	0.555	<1.79	2.80
Ochratoxin β	0.019	0.026	0.022	0.934	0.021	<0.179	0.032
L-Phenylalanine	<0.007	<0.001	<0.005	<0.097	<0.001	<0.051	<0.008
Citrinin	<0.007	<0.001	<0.005	<0.097	<0.001	<0.051	<0.008

OTAとB同程度反応する2つの抗体を得た。これらの抗体を用いることでOTAとBの同時検出が可能なELISAや

イムノアフィニティーカラム法など高感度な免疫化学的測定法の確立が期待された。

### 引用文献

- (1) Heussner, A. H., Dietrich, D. R., O'Brien, E.: 2006. In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells. *Toxicol. In Vitro*, **20**, 332-341 (2006).
- (2) Støermer, F. C., Kolsaker, P., Holm, H., Rogstad, S., Elling, F.: Metabolism of ochratoxin B and its possible effects upon the metabolism and toxicity of ochratoxin A in rats. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1108-1112 (1985).
- (3) Dietrich, D. R., O'Brien, E., Stack, M. E., Heussner, A.H.: Species and sex-specific renal cytotoxicity of ochratoxin A and B in vitro. *Exp. Toxicol. Pathol.* **53**, 215-225 (2001).
- (4) Mally, A., Keim-Heusler, H., Amberg, A., Kurz, M., Zepnik, H., Mantle, P., Volkel, W., Hard, G. C., and Dekant, W., Biotransformation and nephrotoxicity of Ochratoxin B in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **206**, 43-53 (2005).
- (5) Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M., Related Articles, Links A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, **82**, 897-902 (1999).
- (6) Kawamura, O., Sato, S., Nagura, M., Kishimoto, S., Ueno, I., Sato, S., Uda, T., Itoh, Y. and Ueno, Y., Enzyme-linked immunosorbent assay for detection and survey of ochratoxin A in livestock sera and mixed feeds. *Food Agric. Immunol.*, **2**, 135-143 (1990).
- (7) Scott P. M., Methods of analysis for ochratoxin A. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **504**, 117-134 (2002).
- (8) Buttinger, G., Fuchs, E., Knapp, H., Berthiller, F., Schuhmacher, R., Binder, E. M., and Krska, R., Performance of new clean-up column for the determination of ochratoxin A in cereals and foodstuffs by HPLC-FLD. *Food Addit. Contam.*, **21**, 1107-1114 (2004).
- (9) 川村 理: 改良DEA固相抽出法によるコーヒーおよび穀物中のオクラトキシンAとBの分析法の検討, 香川大学農学部学術報告, **62**, 77-82 (2010).
- (10) 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).
- (11) 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*. pp.351-371. W. H. Freeman & Co. San Francisco (1980).
- (12) Heussner, A. H., Moeller, I., Day, B. W., Dietrich, D. R., O'Brien, E.: Production and characterization of monoclonal antibodies against ochratoxin B, *Food Chemical Toxicol.*, **45**, 827-833 (2007).