

タイワンハブ毒の迅速検出の検討

大城聡子・泉水由美子・盛根信也・寺田考紀

Antibody screening for detection of hemorrhagic metalloproteinase HR1 from *Protobothrops mucrosquamatus* venom

Akiko OSHIRO, Yumiko IZUMI, Nobuya MORINE, Koki TERADA

要旨: 抗タイワンハブ毒 HR1 抗体を作製し, ELISA 間接法, ELISA 直接法, Sandwich ELISA によってタイワンハブ毒 HR1 検出を試みた. 作製した抗タイワンハブ毒 HR1 抗体 34 抗体を ELISA 間接法によるスクリーニングの結果, タイワンハブ毒 HR1 にのみ結合する特異的抗体は 5 抗体であった. 抗タイワンハブ毒 HR1 特異的抗体の 5 抗体は, ペルオキシダーゼ標識によるタイワンハブ毒 HR1 に対する反応に影響はみられなかった. 抗タイワンハブ毒 HR1 特異的抗体の 5 抗体を Sandwich ELISA により, タイワンハブ毒 HR1 検出の組み合わせを試みた結果, 捕捉抗体および検出抗体が同一の組み合わせで検出が可能であった.

Key words: *Protobothrop mucrosquamatus*, Indirect ELISA, Direct ELISA, Sandwich ELISA

I はじめに

ヘビに咬まれて加害生物が有毒か無毒であったのか知ることは診断において重要であるが, 加害生物を目撃しても専門家や見慣れた人でない限り判断するのは難しい.

加害生物を同定するには生物を捕獲して持参すれば確実だが, そのため治療が遅れてはならない¹⁾. 蛇咬症の被害者の管理のために最も大切なことは抗毒素を使用するか否かの判断である²⁾. 医療現場から, ハブ咬症治療の初期に有毒, 無毒咬傷の検査ができる簡易キットが求められており, 無毒咬傷と分かれば血清投与を行わない判断ができるため, 治療の一助になるとの意見がこれまでに寄せられた. ハブ類による咬傷, 咬症で重症化しやすいのは主にハブ及びタイワンハブであり, ヒメハブやサキシマハブでは体長が小さいことと毒そのものの力が弱いこと, よほどのことがない限り重症化しない³⁾. そのため, 加害種の毒の判別ができる簡易キットの開発が望まれている. ハブ種を判別することができれば, 重症化への対応が迅速にできる. 咬傷の原因となる蛇の種類診断は, 最適な臨床管理にとって重要である²⁾.

本研究では, ハブ毒及び類縁種毒を迅速かつ簡易に検出できるキットの開発をめざし, その手始めとして致死活性がハブ毒に対して 1.10 倍⁴⁾⁵⁾だったタイワンハブ毒に着目し, タイワンハブ毒検出イムノクロマトキットの作製に必要な抗体と検出条件検討を ELISA 法により行った.

II 方法

1. タイワンハブ毒 HR1 の精製

本研究所で飼育されている複数のタイワンハブより採取した毒を凍結乾燥させた粗毒 1 g を, 0.01 M CaCl₂ buffer (pH 8.0) 10 ml で溶解し, 不溶性タンパク質を 14,000 × g, 20 分で遠心分離, 上清をゲルろ過クロマトグラフィー(26 mm × 90 cm packed with Sephacryl S-200 HR, Buffer: 10 mM CaCl₂ in 0.01 M Tris-HCl (pH 8.0), Flow rate: 1 ml/min (8 ml/tube))に供した.

10 mM CaCl₂ in 0.01 M Tris-HCl (pH 8.0)の調整には, Tris Buffer Powder, pH 8.0 (TaKaRa BIO), 塩化カルシウム(関東化学株式会社)を用いた. プロテアーゼ活性は, 消光性ペプチド(Nma-SPMLK(DnP)rr-NH₂)(株式会社ペプチド研究所)10μM に調整, 50 倍希釈した各 fraction をマルチスペクトロプレートリーダー (Varioskan, Thermo SCIENTIFIC)で測定した. ゲルろ過クロマトグラフィーで分離されたプロテアーゼ活性を有する前半ピークを 0.5M NaCl になるように NaCl (特級 関東化学株式会社)で調整し, EDTA・2Na(株式会社同仁化学研究所), ZnSO₄ で Regeneration および平衡化を行った金属キレートアフィニティークロマトグラフィーでサンプルの吸着と溶出 (0 mM-30 mM Imidazol in 0.01 M Tris-HCl 0.01 M CaCl₂ pH 8.0, 0.05 M NaCl)(Imidazol, 関東化学株式会社)を行った.

そこで溶出された画分をさらに FPLC 陽イオン交換クロマトグラフィーにより分離を試みるために, FPLC 陽イオン交換クロマトグラフィーに用いる 0.01 M CaCl₂ in 0.01 M MES (pH 5.5) で透析(SnakeSkin Pleated Dialysis

Tubing, PIERCE)を行った。

0.01 M CaCl₂ in 0.01 M MES (pH 5.5) は、2-(N-Morpholino) ethanesulfonic Acid, NaOH (特級 関東化学株式会社)で調整した。FPLC 陽イオン交換クロマトグラフィーは、カラム POROS S/20 4.6 mmD/100 mmL 1.662 mL (BIO-RAD), Buffer は、running buffer : 0.01 M CaCl₂ in 0.01 M MES (pH 5.5), elution buffer: 0 M-0.25 M NaCl with running buffer, Flow rate: 10 ml/ min (5 ml/ tube), クロマトグラフィーシステム AKTA purifier (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社)を用いた。

FPLC 陽イオン交換クロマトグラフィーにより、プロテアーゼ活性があり、吸着されなかった画分をタイワンハブ毒 HR1 とした。

上記の方法で、精製されたタイワンハブ毒 HR1 をマウスへの免疫および、ELISA 検出用抗原として用いた。

2. 抗タイワンハブ毒 HR1 抗体の作製

抗毒素研究報告書^{6,7)}に準じて、タイワンハブ毒 HR1 を BALB/c マウスに免疫し、抗体価の上昇がみられた 3 匹のマウスの脾臓を摘出し、脾細胞とミエローマ細胞と細胞融合後、得られたハイブリドーマを培養した。その中から安定したハイブリドーマを培養し、抗タイワンハブ毒 HR1 抗体をアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製を行った。

3. ELISA 間接法

マウスの抗体価測定および、タイワンハブ毒検出に有効な株の選別には、96 ウェルプレート(Corning 1 × 8 Stripwell 96well plates medium binding surface, clear. ヒメハブ毒 PLA2 は、ELISA 用アミノプレート MS-8696F(住友ベークライト株式会社))を用いた。10 mM CaCl₂ in 0.01 M Tris で調整したタイワンハブ毒 HR1、沖縄島産ハブ粗毒、サキシマハブ粗毒、ヒメハブ粗毒、ヒメハブ毒 PLA2 を 1 well あたり 250 ng/100 μl を加え、一昼夜 4℃で静置した。各 well より溶液をアスピレートし、1%BSA (Sigma-Aldrich) /PBS を各 well に添加し、一昼夜 4℃で静置しブロッキングを行った。プレート使用時に、ブロッキング溶液をアスピレートし、PBS-T で 1 回洗浄後、プレート内の水滴を取り除き、測定に用いた。以下、96 ウェルプレートのアスピレート及び洗浄は、WELLWASH VERSA (Thermo Scientific), タイワンハブ毒および抗体のタンパク質濃度測定は、微量サンプル分光光度計 nanovue (GE) の BSA モードおよび IgG モードを用いた。

1 次抗体として、タイワンハブ毒特異的抗体を 100 μl ずつプレートに添加し、室温で 30 分、shaker-incubator (DYNATECH)で攪拌し反応させた。反応液をアスピレート後、

PBS-T で 3 回洗浄した。

2 次抗体は、1%BSA/PBS で 5000 倍に希釈した抗マウス IgG (全分子) 抗体-ペルオキシダーゼ標識ヤギ宿主抗体 (Sigma-Aldrich)を各 well に 100 μl ずつ添加し、室温で 30 分、shaker-incubator で攪拌し反応させた。反応液をアスピレート後、PBS-T で 3 回洗浄した。

TMB Peroxidase 基質(コスモバイオ)を各 well に 100 μl ずつ添加し、室温で 5 分放置後、0.5 mol/l 硫酸 (nacalai tesque)100 μl を加え反応を停止させ、450 nm における吸光度を測定した。吸光度測定には、マイクロプレートリーダー-DYNEX MRX Revelation (DYNEX technologies)で測定した。

4. ELISA 直接法

「3. ELISA 間接法」で作製したタイワンハブ毒 ELISA プレートおよびペルオキシダーゼを標識したタイワンハブ毒 HR1 特異的抗体を用いて、ELISA 直接法を行った。標識抗体の調整は、抗体を PBS で 150 μg/100 μl に調整後、Peroxidase Labeling Kit-SH (株式会社 同仁化学研究所)で標識した。標識した抗体を 1%BSA/PBS で 5,000 倍希釈した溶液 100 μl を 1 次抗体とした。各 well に 1 次抗体 100 μl ずつ添加し、室温で 30 分、shaker-incubator で攪拌し反応させた。反応液をアスピレート後、PBS-T で 3 回洗浄した。

TMB Peroxidase 基質を各 well に 100 μl ずつ添加し、室温で 5 分放置後、0.5 mol/l 硫酸 100 μl を加え反応を停止させ、450 nm における吸光度を測定した。吸光度測定には、マイクロプレートリーダー-DYNEX MRX Revelation で測定した。

5. Sandwich ELISA

各タイワンハブ毒 HR1 特異的抗体を PBS で 250 ng/100 μl に調整後、96 ウェルプレートに添加し、一昼夜 4℃で静置した。各 well より溶液をアスピレートし、Pierce Protein Free(PBS) Blocking Buffer (Thermo scientific) を各 well に添加し、室温で 60 分静置しブロッキングを行った。ブロッキング溶液をアスピレートし、PBS-T で 1 回洗浄後、プレート内の水滴を取り除き、測定に用いた。

タイワンハブ毒 HR1 を 0.01 M CaCl₂ in 0.01 M MES (pH 5.5) により 0 ng/100 μl から 500 ng/100 μl まで希釈し 1well あたり 100 μl のタイワンハブ毒 HR1 溶液を加え、室温で 30 分、shaker-incubator で攪拌し反応させた。反応液をアスピレート後、PBS-T で 5 回洗浄した。検出抗体は、「4. ELISA 直接法」で調整した標識抗体を Pierce Protein Free(PBS) Blocking Buffer で 5,000 倍に希釈し、各 well に 100 μl ずつ添加し、室温で 30 分、shaker-incubator で攪拌し反応させた。反応液をアスピレート後、PBS-T で 5 回洗浄した。TMB Peroxidase 基質を各 well に 100 μl ずつ添加し、室温で 5 分放置後、0.5 mol/l 硫酸 100 μl を加え反応を停止させ、450 nm における吸光度を

測定した。

Ⅲ 結果と考察

1. ELISA 間接法による抗タイワンハブ毒 HR1 抗体の各ハブ毒に対する反応

「Ⅱ 方法 2. 抗タイワンハブ毒 HR1 抗体」で得られた抗体数は, 34 抗体だった. その抗体を「Ⅱ 方法 3. ELISA 間接法」で作製した各毒を固相化した ELISA プレートを用いて, 各毒への反応を吸光度により判断した。

抗タイワンハブ毒 HR1 抗体を 1 well あたり 0 ng/100 μ l から 5000 ng/100 μ l まで濃度変化させ, タイワンハブ毒 HR1 及びタイワンハブ粗毒に対し, シグモイド曲線を描き, かつサキシマハブ粗毒, 沖縄島産ハブ粗毒, ヒメハブ粗毒, ヒメハブ毒 PLA2, 1%BSA, 1%スキムミルク (nacalai tesque) に対して, 吸光度 0.5 以下だった抗体を抗タイワンハブ毒 HR1 特異的抗体とした。

抗タイワンハブ毒抗体のブロッキング剤に対する非特異的反応は, 1%BSA および 1%スキムミルクのみ固相化したプレートと抗体を反応させて判断した. その結果, 株番号 1206-16, 1206-31, 1213-17, 1215-2, 1215-3 から得られた 5 抗体を抗タイワンハブ毒 HR1 特異的抗体とした(図 1(A), (B), (C), (D), (E)).

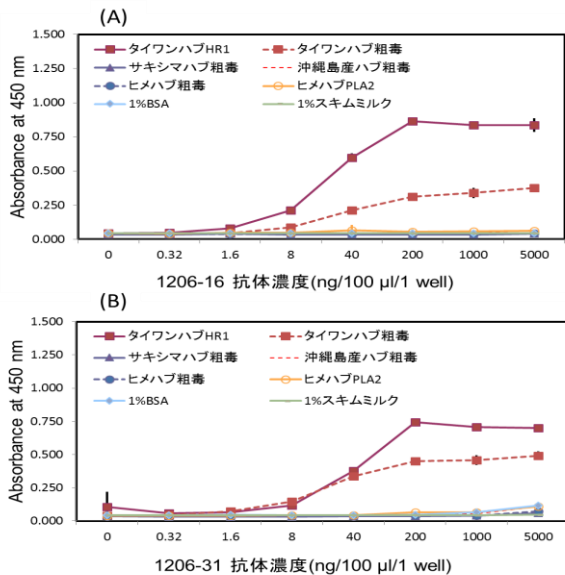


図1 (A),(B). 抗タイワンハブ毒特異的抗体による各種ハブ毒の検出(ELISA間接法)(N = 3). 固相化した抗原:タイワンハブ毒HR1, タイワンハブ粗毒, サキシマハブ粗毒, 沖縄島産ハブ粗毒, ヒメハブ粗毒, ヒメハブPLA2(以上250 ng/1 well), 1%BSA/PBS, 1%スキムミルク/PBS(以上, 300 μ l/1well), ブロッキング:1%BSA/PBS(1%BSA/PBSおよび1%スキムミルク/PBSを固相化したプレート以外)300 μ l, 1次抗体:(A)1206-16, (B)1206-31, 2次抗体:抗マウスIgG(全分子)抗体ーペルオキシダーゼ標識ヤギ宿主抗体 1: 5,000 100 μ l, 基質:TMB Peroxidase 100 μ l.

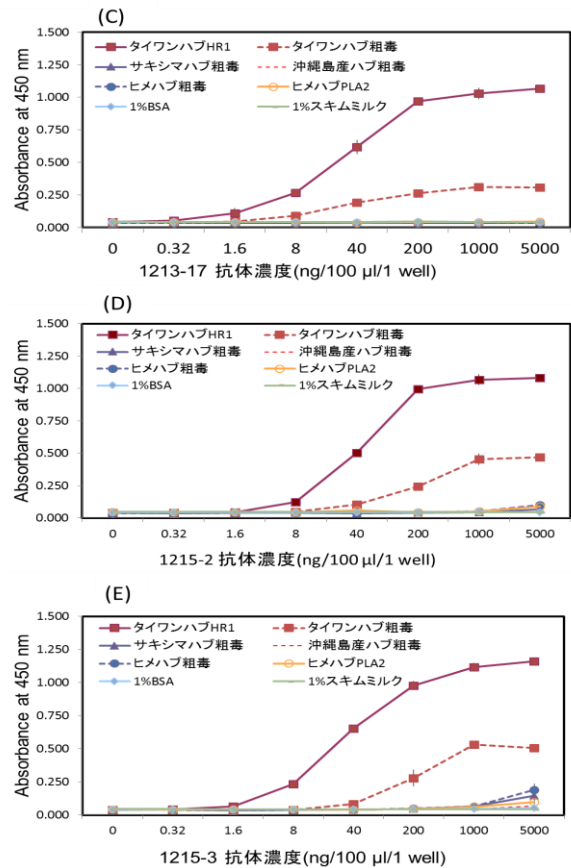


図1(C),(D), (E). 抗タイワンハブ毒特異的抗体による各種ハブ毒の検出(ELISA間接法)(N = 3). 固相化した抗原:タイワンハブ毒HR1, タイワンハブ粗毒, サキシマハブ粗毒, 沖縄島産ハブ粗毒, ヒメハブ粗毒, ヒメハブPLA2(以上250 ng/1 well), 1%BSA/PBS, 1%スキムミルク/PBS(以上, 300 μ l/1 well), ブロッキング:1%BSA/PBS(1%BSA/PBSおよび1%スキムミルク/PBSを固相化したプレート以外)300 μ l, 1次抗体:(C)1213-17, (D)1215-2, (E)1215-3, 2次抗体:抗マウスIgG(全分子)抗体ーペルオキシダーゼ標識ヤギ宿主抗体 1: 5,000 100 μ l, 基質:TMB Peroxidase 100 μ l.

2. ELISA 直接法による抗タイワンハブ毒 HR1 特異的抗体の反応

上記「1. ELISA 間接法による抗タイワンハブ毒 HR1 抗体の各ハブ毒に対する反応」で得られた結果より, 抗タイワンハブ毒 HR1 特異的抗体 1206-16, 1206-31, 1213-17, 1215-2, 1215-3(以後, 抗タイワンハブ毒 HR1 特異的抗体 5 抗体)にペルオキシダーゼを標識し, 検出抗体を調整した. ペルオキシダーゼを各抗体に標識することにより, タイワンハブ毒 HR1 検出に影響があるかを調べた. 特異的抗体の 5 抗体とも, ペルオキシダーゼを標識後も, ELISA 直接法でタイワンハブ毒 HR1 を固相化したプレートと反応し, 吸光度が 2.0 以上だった. この結果より, 上記 5 抗体にペルオキシダーゼを標識することで, 抗体のタイワンハブ毒 HR1 検出には, 大きな影響はないと考えられる(図 2). また, タイワンハブ毒 HR1

がより強く固相化されるように、以後、プレートは高結合能マイクロプレート Greiner 655061 を用いた。

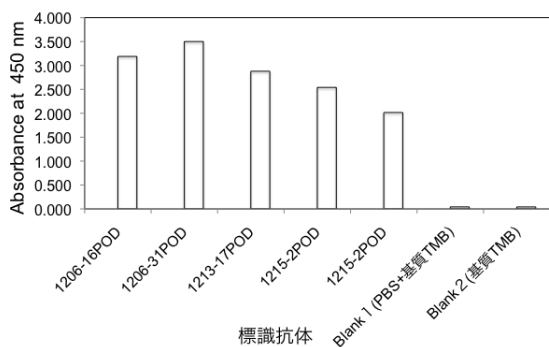


図2. ELISA直接法による台湾ハブ毒HR1検出 (N = 3). 固相化に使用したプレート: greiner 655061, 固相化した抗原: 台湾ハブ毒HR1 250 ng/1 well, ブロッキング: 1%BSA/PBS, 検出抗体: 1206-16ペルオキシダーゼ(以下, POD)標識抗体, 1206-31POD標識抗体, 1213-17POD標識抗体, 1215-2POD標識抗体, 1215-3POD標識抗体1:5,000 各100 µl, 基質: TMB Peroxidase 100 µl.

3. Sandwich ELISA による台湾ハブ毒 HR1 検出

抗台湾ハブ毒 HR1 特異的抗体 5 抗体をそれぞれ捕捉抗体として、プレートに固相化した。ここでは示していないが、台湾ハブ毒 HR1 は、ブロッキングで用いた BSA に非特異的吸着する反応を示したので、以後、ブロッキングは非タンパク質である Pierce Protein Free(PBS) Blocking Buffer(以後, Protein Free)を使用した。捕捉抗体が固相化されたプレートに、台湾ハブ毒 HR1 をタンパク質濃度 0 ng から 500 ng まで反応させ、洗浄後「2. ELISA 直接法による抗台湾ハブ毒 HR1 特異的抗体の反応」で作製した抗台湾ハブ毒 HR1 特異的抗体 5 抗体にペルオキシダーゼを標識した検出抗体をそれぞれ反応させた(図 3)。

抗台湾ハブ毒 HR1 特異的抗体 5 抗体を総あたりで組み合わせ、台湾ハブ毒 HR1 の検出を試みたが、1206-31 が検出抗体になった場合、どの捕捉抗体においても台湾ハブ毒 HR1 の濃度に依存した反応だった。特に、捕捉抗体と検出抗体を同じ 1206-31 にした組み合わせでは、台湾ハブ毒 HR1 5000 ng に吸光度 0.458 を示した(図 3)。

抗原を 2 抗体で検出する際、異なる結合部位を持つ抗体の組み合わせを考えるが、今回の Sandwich ELISA による台湾ハブ毒 HR1 検出では、1 種類の抗体の組み合わせで検出ができた。ここでは示していないが、ゲルろ過クロマトグラフィー用タンパク質分子量マーカーで台湾ハブ毒 HR1 を分析したところ、台湾ハブ毒

HR1 が 2 量体であった。この結果より、場所の異なる同じエピトープが、それぞれ捕捉抗体および検出抗体と反応したと考える。

今後は、抗台湾ハブ毒 HR1 特異的抗体 1206-31 を用いて、免疫クロマトグラフィーのテストストリップを用いて、台湾ハブ毒 HR1 が検出できるか分析を行う。

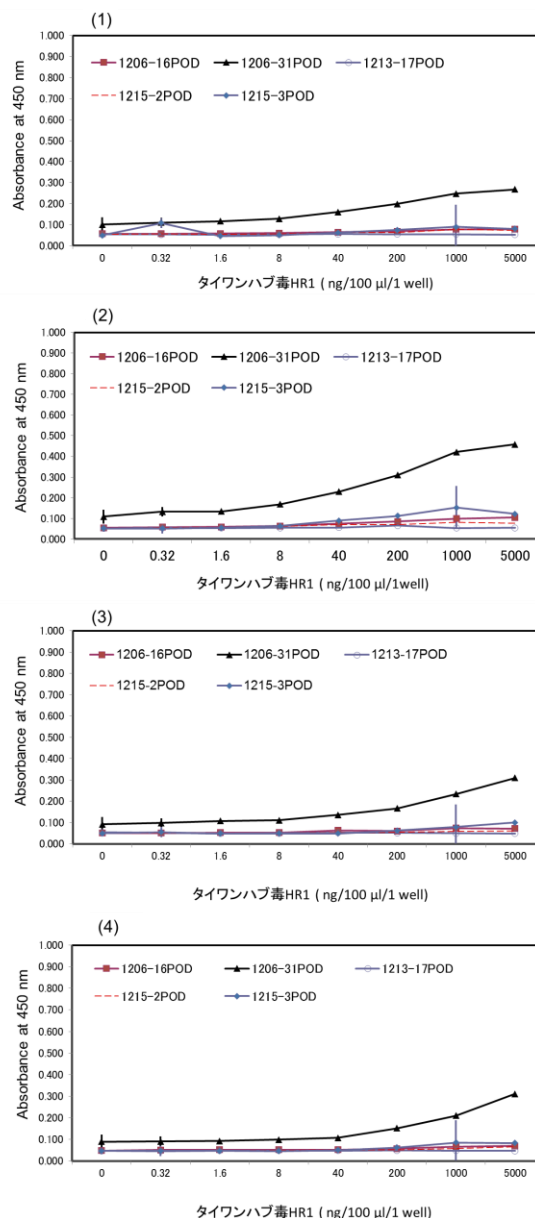


図3(1),(2),(3),(4). 抗台湾ハブ毒HR1特異的抗体による台湾ハブ毒HR1検出 sandwich ELISA (N = 3). 固相化に使用したプレート: greiner 655061, 捕捉抗体: (1)1206-16, (2)1206-31, (3)1213-17, (4)1215-2, ブロッキング: Pierce Protein Free (PBS) Blocking Buffer, 検出抗体: 1206-16ペルオキシダーゼ(以下, POD)標識抗体, 1206-31POD標識抗体, 1213-17POD標識抗体, 1215-2POD標識抗体, 1215-3POD標識抗体 1:5,000 各100 µl, 基質: TMB Peroxidase 100 µl.

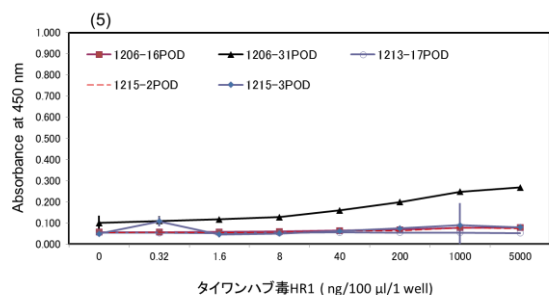


図3(5). 抗タイワンハブ毒HR1特異的抗体によるタイワンハブ毒HR1検出 sandwich ELISA (N = 3). 固相化に使用したプレート: greiner 655061, 捕捉抗体: (5)1215-3, ブロッキング: Pierce Protein Free (PBS) Blocking Buffer, 検出抗体: 1206-16ペルオキシダーゼ(以下, POD)標識抗体, 1206-31POD標識抗体, 1213-17POD標識抗体, 1215-2POD標識抗体, 1215-3POD標識抗体 1:5,000 各100 µl, 基質: TMB Peroxidase 100 µl.

IV 謝辞

試験溶液等の調整にご協力いただきました宮城博俊氏, 真榮城徳之氏, 前野沙耶架氏に深謝いたします。

V 参考文献

- 1) 宮城良充 (2004). 蛇毒咬症. 総合臨床, 53 : 625 - 629.
- 2) Guidelines for the management of snake-bites (2010). < http://apps.searo.who.int/PDS_DOCS/B4508.pdf >. 2015年10月アクセス.
- 3) 松田聖子・盛根信也・玉那覇康二(2012). 医療機関への報告説明. 平成23年度抗ハブ毒ヒト抗毒素の実用化事業 ヒト抗毒素需要予測等調査, 10-12.
- 4) 野崎真敏・盛根信也・寺田考紀 (2002). 沖縄に生息するハブ属毒の交叉中和実験－沖縄ハブ・サキシマハブ・タイワンハブ・交雑種について－. 平成14年度抗毒素研究報告書, 27-32.
- 5) 宮城良充・野崎真敏(2007). ハブ咬症. 中毒研究, 20 : 223-233.
- 6) 野崎真敏・盛根信也・松田聖子・坂本智代美・正代清光・江藤晶・有働睦夫(2005). 抗ハブ毒ヒト抗体の作製に関する研究－KM マウスを用いた抗ハブ毒ヒト抗毒素の作製(5)－. 平成16年度抗毒素研究報告書, 3-12.
- 7) 盛根信也・松田聖子・大城聡子・玉那覇康二・江藤晶(2011). 抗ハブ毒ヒト抗体の作製に関する研究－KM マウスを用いた抗ハブ毒ヒト抗毒素の作製(5)－. 平成22年度抗毒素研究報告書, 3-9.