

抗サルモネラ O4 抗体検出用競合エライザ法の開発

江口正浩¹⁾, 小川洋介¹⁾, 下地善弘¹⁾

Monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies to O:4 *Salmonella* in the sera of livestock and poultry

Masahiro EGUCHI¹⁾, Yohsuke OGAWA¹⁾, Yoshihiro SHIMOJI¹⁾

背景と目的

サルモネラ属菌は、グラム陰性の通性嫌気性桿菌で腸内細菌科に属し、2,600 種類以上の血清型に細分されている。血清型は O 抗原, H 抗原の組み合わせにより決定される。サルモネラ属菌は各種の哺乳動物, 鳥類, 爬虫類, 両生類に感染する。また, 家畜やヒトに対して下痢症, 敗血症を起こす人獣共通感染症である。

家畜・家きんのサルモネラ症及び家きんサルモネラ感染症は, 家畜伝染病予防法に基づく, 届出伝染病及び法定伝染病に指定されており, 家畜・家きんに対する感染予防対策は重要視されている。しかしながら, 現行の治療・予防法の限界などから国内の家畜・家きんのサルモネラ症の発生は完全には抑えられていない。

農場におけるサルモネラコントロールプログラムは, 細菌検査と抗体検査が必要であり, 抗体検査によりサルモネラの侵入や農場汚染の実態が把握できる¹⁾。しかしながら, 実際には細菌検査による菌の同定のみで留まる場合が多い。現在, 使用されているサルモネラ抗体の検出は, エライザ法が一般的であるが, 各動物種に対する 2 次抗体の準備が必要となり煩雑である²⁾。そこで, 本研究では, サルモネラ O4 群を対象とした様々な家畜・家きんの抗体検査を一つの手法で行う新しい検査方法の開発を試みた³⁾。

研究の概要

1. 抗サルモネラ O4 抗原に対するモノクローナル抗体の作製

Salmonella enterica serovar Typhimurium (S.

Typhimurium : O4 群血清型) をマウス (BALB/c, 6 週令, 雌) に免疫し, その後, 脾臓と株化ミエローマ細胞を融合させモノクローナル抗体 (mAb) 414B を作製した。作製した mAb 414B のサブクラスを解析したところ IgG2a であった。

次に mAb 414B が認識する抗原を同定したところ, mAb 414B はリポ多糖 (LPS) を認識することを明らかにした (図 1)。

LPS は菌体表面に存在し, リピド A と O 側鎖 (O 抗原) と, それを連結する糖鎖 (コア) の 3 部分から構成されている。リピド A は普遍的な構造をしており, 内細菌科に属する菌種間での違いは非常に少ない。一方, O 側鎖は, 菌種, 血清型により構成される糖の種類, 組み合わせが異なり, 菌種, 血清型特有の抗原性を担っている。そこで, mAb 414B が LPS のどの部位 (リピド A あるいは O 側鎖) を認識するのかを検討した。

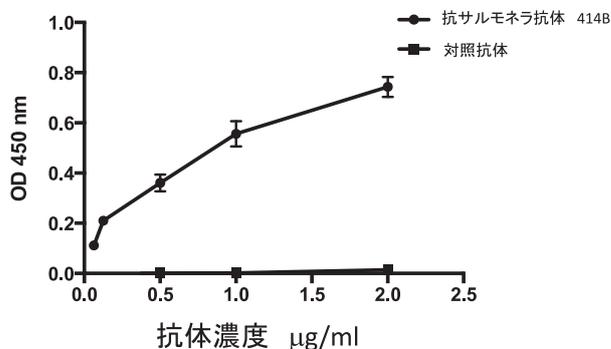


図 1. ST (S.Typhimurium : O4 群) 由来リポ多糖 (LPS) に対する抗サルモネラ O4 モノクローナル抗体を用いたエライザ。

ST 由来 LPS を固相化し, 開発した抗サルモネラ O4 モノクローナル抗体を各種濃度でエライザを実施した。

1) 農研機構 動物衛生研究所 細菌・寄生虫研究領域

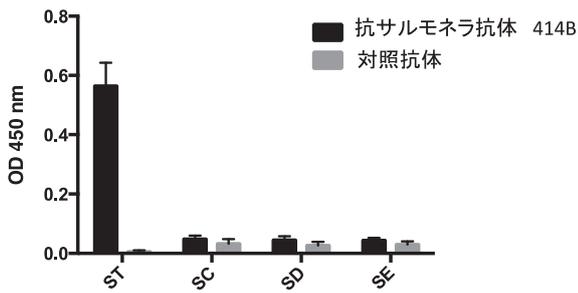


図2. 抗サルモネラ O4 モノクローナル抗体の特異性
異なる血清型由来のリポ多糖 (LPS) を固相化し、開発した抗サルモネラ O4 モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ法エライザを実施した。ST (S. Typhimurium : O4 群), SC (S. Choleraesuis : O7 群), SD (S. Dublin : O9 群), SE (S. Enteritidis : O9 群)。

S. Typhimurium (O4 群) の他に他の血清型である S. Choleraesuis (O7 群), S. Dublin (O9 群), S. Enteritidis (O9 群) の LPS を固相化し、mAb 414B を用いてエライザを実施したところ、mAb 414B は S. Typhimurium 由来の LPS に特異的に反応することがわかった (図2)。以上

の結果から、我々が作製した mAb 414B は O4 群サルモネラの O 側鎖 (O4 抗原) を認識することが示唆された。

2. 抗サルモネラ O4 抗体検出用競合エライザ法の開発

mAb 414B を用いた競合エライザ法を開発した。mAb 414B が認識する S. Typhimurium 由来の LPS を固相化 (37°C 1 時間) し、0.5% bovine serum albumin/ PBS-T でブロッキングした。その後、検体 (血清) を加え 37°C 1 時間反応させた。次に、作製した mAb 414B で 37°C 1 時間反応後、HRP 標識抗マウス抗体で反応させた。そして、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 発色液で発色させ、OD 450 nm で検体の抗体価を測定した (図3)。本研究により、mAb 414B を用いた、抗サルモネラ O4 抗体検出用競合エライザ法を確立させた (図4)。また、我々が開発した mAb 414B を用いた競合エライザ法は、192 倍希釈した抗サルモネラ血清においても判定が可能であることが明らかとなった (図4A)。以上の結果から、微量な血清でも診断を行うことが可能であることが示唆された。

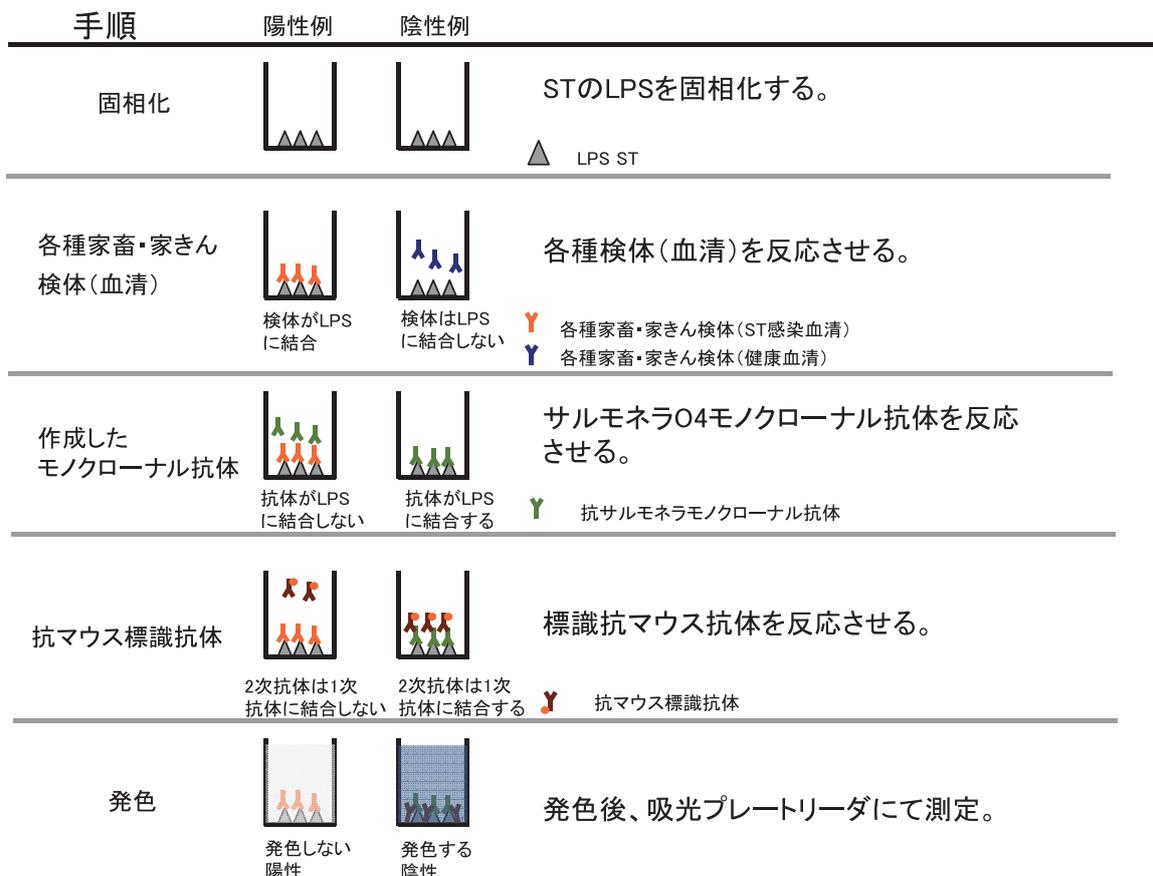


図3. 抗サルモネラ O4 抗体検出用競合エライザ法の手順
陽性は発色せず、陰性は発色する。

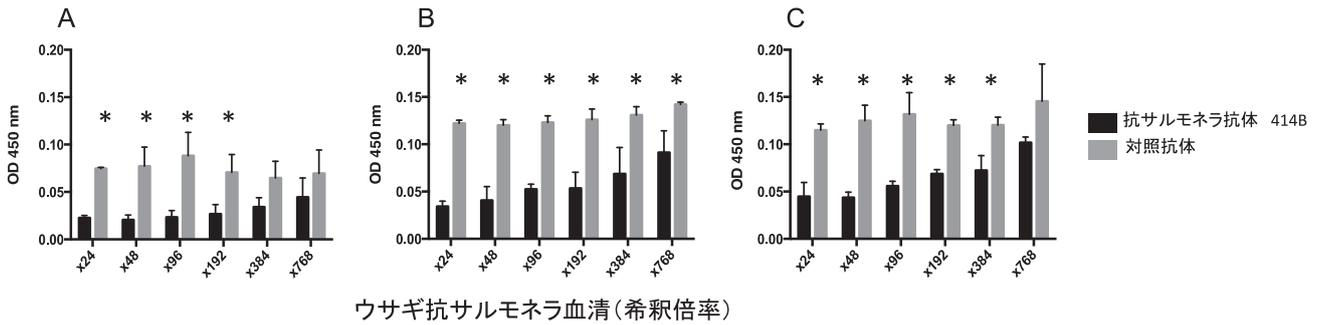


図4. 抗サルモネラ O4 抗体検出用競合エライザ法

開発した抗サルモネラ O4 モノクローナル抗体を用いて、競合エライザを実施した。(A) 414B 1.0 µg/ml, (B) 414B 2.0 µg/ml, (C) 414B 4.0 µg/ml. *, p < 0.05 (Student's t-test)

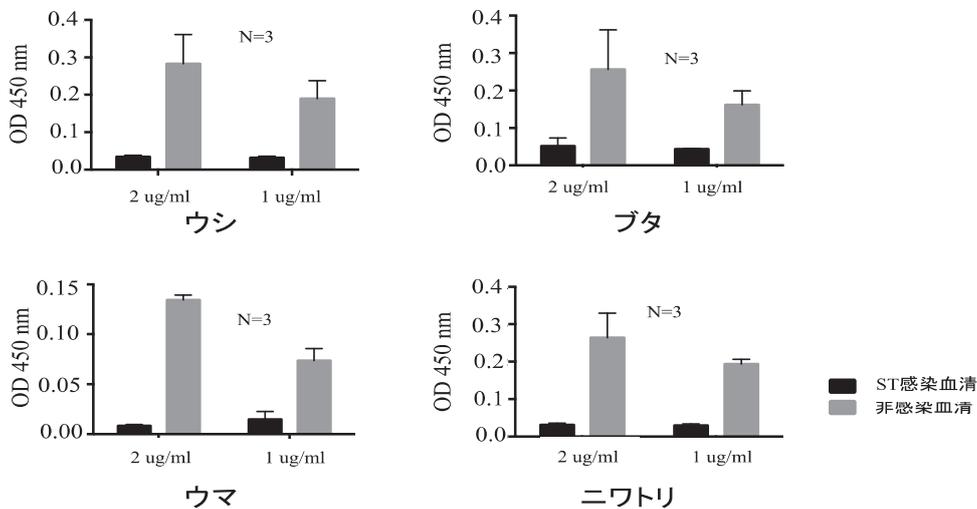


図5. 本検出法を用いた各種動物のサルモネラ感染抗体(抗サルモネラ O4 抗体)の検出本モノクローナル抗体(2 µg/ml, 1 µg/ml)を用いてウシ, ブタ, ウマ, ニワトリの血清と競合エライザを実施した。

3. 本検出法を用いた各種動物のサルモネラ感染抗体の検出

確立した mAb 414B を用いた抗サルモネラ O4 抗体検出用競合エライザ法が家畜の血清に応用可能か検討した。S. Typhimurium が感染したウシ, ウマ, ブタ, ニワトリの血清を用いて、我々が開発した抗サルモネラ O4 抗体検出用競合エライザ法を実施した(図5)。mAb 414B を用いた抗サルモネラ O4 抗体検出用競合エライザ法はウシ, ウマ, ブタ, ニワトリの血清において、S. Typhimurium の感染の有無が検出可能であることがわかった。以上の結果から我々が開発した mAb 414B を用いた競合エライザ法は様々な家畜に対しても利用が可能であることが示唆された。

考察及び残された課題

我々が開発した抗サルモネラ O4 抗体検出用競合エライザ法は各動物に対する 2 次抗体の作製が不要で、あらゆる動物種に対応が可能である。サルモネラ属は各種の哺乳動物、鳥類の他、爬虫類や両生類に感染することから、本研究で開発した検出法は、家畜の他、ペットなどにも使用が期待できる⁴⁾。また、標識 2 次抗体が存在しない動物にも対応が可能であることから、希少な哺乳動物の他、爬虫類や両生類などにも使用が可能である⁵⁾。

我々が開発した抗サルモネラ O4 抗体検出用競合エライザ法で使用した抗サルモネラ O4 抗体はモノクローナル抗体(mAb 414B)を用いており、ポリクローナル抗体よりも交差反応が少なく、親和性が均一であり安定供給が可能である。また、本研究で使用した mAb 414B は、少

量の血清でも使用が可能であることから、大量の採血が困難な小型の動物などにも使用が期待できる。

我々が開発した抗サルモネラ O4 抗体検出用競合エライザ法は家畜の生産農場や動物病院の他、動物園などで使用が期待できると考えている。しかしながら、本研究で作製したモノクローナル抗体は O4 抗原にのみ反応する。サルモネラの血清型は 2600 を越えており、様々な血清型が各種動物に感染することがわかっている。したがって、今後は他の血清型の抗体を作製するなどし、様々な血清型に対するサルモネラの検出を目指す必要がある。

謝 辞

本研究は平成 24～25 年度動物衛生研究所重点強化研究課題として実施し、一部は科学研究費補助金(26660254, 2503123)の助成を受けて実施したものである。

引用文献

- 1) Wegener, H.C., Hald, T., Wong, D.L.F., Madsen, M., Koesgaard, H., Bager, F., Gerner-Smidt, P.& Molbak, K.: *Salmonella* control programs in Denmark. *Emerg. Infect. Dis.*9,774-780(2003).
- 2) Nielsen, B., Baggesen, D., Bager, F., Haugegaard, J.& Lind, P. : The serological response to *Salmonella serovars* typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Vet.Microbiol.*47,205-218(1995).
- 3) Aribam, S.D., Ogawa, Y., Matsui, H., Hirota, J., Okamura, M., Akiba, M., Shimoji, Y.& Eguchi, M.: Monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies to O:4 *Salmonella* in the sera of livestock and poultry. *J. Microbiol. Methods.*108,1-3(2015).
- 4) Hoelzer, K., Moreno-Switt, A.I.& Wiedmann M.: Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Vet. Res.*42,34(2011).
- 5) Jang, Y.H., Lee, S.J., Lim, J.G., Lee, H.S., Kim, T.J., Park, J.H., Chung, B.H.& Choe, N.H.: The rate of *Salmonella spp.* infection in zoo animals at Seoul Grand Park Korea. *J. Vet. Sci.*2,177-181(2008).