原 著

E. Coli J-5 株に対するモノクローナル抗体を用いての
LPS の定量の試み (第 1 報)

和田 誠次 西 阪 誠 泰 梁 間 真 江 口 次 郎
 安 達 高 久 飴 野 靖 杉 村 武 嗣 山 上 征 二
 岸 本 武 利 前 川 正 信 寺 野 由 剛*

大阪市立大学泌尿器科 同第 2 生理学*

key words : ELISA, monoclonal antibody, E. Coli J-5

〈要旨〉

E. Coli J-5 株をマウスに免疫し、Myeloma cell (Ag8X63) との間でポリエチレングリコールを用いて細胞融合し、3 種のモノクローナル抗体 (MoAb) を得た。これらの MoAb は他のグラム陰性桿菌である *Pseudomonas* や *Salmonella minnesota* R595 と強い交叉反応を示し、Dot blot 法にて lipid A に陽性を示した。

これらの MoAb を用いて competition ELISA 法により E. Coli J-5 の濃度の測定を試みたところ、10 ng/ml~10 μ g/ml において、standard curve で直線性を得た。標準曲線での各点における %CV は平均 6.2% (4.3~8.3%) と良好で、尿を用いての回収率は良好であった。そこで、敗血症にて死亡した患者血清、急性腎盂腎炎患者尿および透析液中の E. Coli J-5 濃度を測定したところ、それぞれ 540 ng/ml, 40 ng/ml および 検出限界以下であった。

Micro ELISA for measuring E. Coli J-5 concentration using monoclonal antibody

Seiji Wada, Nobuyasu Nishizaka, Makoto Harima, Jirou Eguchi, Takahisa Adachi, Yasushi Ameno, Takeshi Sugimura, Seiji Yamagami, Taketoshi Kishimoto, Masanobu Maekawa, Yoshitake Terano*
 Department of Urology, Department of Physiology*, Osaka City University Medical School

Spleen cells of mice immunized with E. Coli J-5 and myeloma cells (Ag8X63) were fused using 50 % polyethyleneglycol. Consequently, three different monoclonal antibodies (MoAb) were obtained. These MoAb crossreacted with other gram negative rods such as *pseudomonas* and *salmonella minnesota* R595, and a positive reaction was found against lipid A in Dot blot analysis. 10 ng/ml to 10 μ g/ml of E. Coli J-5 was found to be accurately measurable by the competition ELISA using these MoAb against lipid A. The %CV for each point on the standard curve using the competition ELISA ranged from 4.3 to 8.3 % with an average of 6.2 %. The recovery rate of E. Coli J-5 from urine samples was excellent. Using the competition ELISA, E. Coli J-5 could be measured without any interference from inhibitors and potentiators. We measured the E. Coli J-5 concentration of the plasma from a patient who died from sepsis, the urine sample of a patient with acute pyelonephritis and the dialysate at the inlet of the dialyzer during hemodialysis. The concentration was 540 ng/ml, 40 ng/ml and less than 10 ng/ml, respectively.

緒言

長期透析例が増加すると共に、近年透析アミロイド症や手根管症候群の原因物質として β_2 -microglobulin (β_2 -MG)^{1,2)} が注目されるようになってきた。

β_2 -MG は分子量が約 12,000 で直径が約 30 Å であり、従来の Cuprophane 系の膜 pore size がせいぜい 20 Å 程度であったため、除去不能であったが、その size を 40~50 Å さらに種類によっては、80~100 Å まで大きく

和田 誠次 大阪市立大学泌尿器科 〒545 大阪市阿倍野区旭町 1-5-7 (06-645-2166)

(受付 : 平成 3 年 9 月 30 日, 受理 : 平成 3 年 10 月 28 日)

し、限外濾過による大量の除水と大分子量物質の除去を可能とした high flux 膜が開発されるようになった。しかしながら、high flux 膜は除水効果や溶質除去効果において従来の膜と比較してまざっていることに異論はないものの、backfiltration³⁾ がおこるため、透析液中より中・高分子量物質の流入、なかでもエンドトキシンの流入の可能性が問題となってきた^{4,5)}。

ところで、エンドトキシンの定量法としては従来より Limulus test があるが、定量が困難なため、その後、合成基質法 (Toxicolor)⁶⁾ や最近ではエンドトキシンの特異的に反応する Endotoxin specific test (Endospecy)⁷⁾ が開発されてきた。

今回、我々は E. Coli J-5 株に対するモノクローナル抗体 (MoAb) を用いた競合性 ELISA 法よりエンドトキシンの定量法を開発したので報告したい。

方法および結果

1. MoAb の作成

5 週齢の雌性 Balb/C マウス (日本クレア) に E. Coli J-5 由来の 50 μ g の LPS (Sigma, St. Louis, USA) を初回は Freund complete adjuvant (Difco, Detroit, USA)

に懸濁し、2 回目以降は Freund incomplete adjuvant (Difco) に懸濁してマウスの頸部皮下に 2 週毎に免疫し、3 回免疫終了 1 週間後に尾静脈より採血し、ELISA 法により抗体価を確認後、50 μ g の LPS を生食に溶解して腹腔内に最終免疫した。3 日後に高抗体価を示した 3 匹のマウスより、無菌的に脾臓を摘出して細胞浮遊液を作成、Balb/C 由来の myeloma cell, Ag8X63 との間で 50 % polyethelenglycol (Boehringer Mannheim, Germany) を用いて細胞融合した。Hybridoma cell を 2 週間 HAT 含有 RPMI 1640 液 {100 u/ml PG (明治), 100 μ g/ml SM (明治), 15 % FCS (GIBCO, New York)}, 10 日間 HT 含有 15 % FCS 添加 RPMI 1640 液にて CO₂ incubator (5 % CO₂, 95 % Air, high humidity, 37°C) で培養し、feder cell として Balb/C マウスの胸腺細胞を用いて 2 回の限界希釈後、3 種の MoAb を産生する cell line (5A, 6A, 12B) を確立した。IgG のサブセットを Serotec 社・isotyping kit (Serotec, Oxford, England) にて検索した結果、いずれも IgG₃ であった。さらに ELISA 法にて IgG の light chain について検討した結果、いずれもカッパー chain であることが判明した。次いで、E. Coli J-5, Salmonella minnesota R595, Pseudomonas に対する交叉反応を ELISA 法にて検討した結果、いずれの株種についても高い交叉反応を示すことがわかった (図 1)。

そこで、Dot blot 法にて E. Coli J-5 の構成成分である lipid A を抗原として検索したところ、3 種の cell line とも陽性を示した (図 2)。

2. 競合性 ELISA の standard curve

そこで、E. Coli J-5 標準液を作成すると共に、マウス腹水中より得た 3 種の MoAb を硫酸塩析および Sephadex G25 (Sigma) を用いて精製し、凍結乾燥した。

種々の条件下で standard curve について検討したところ、100 ng の E. Coli J-5 を 0.05 M NaCO₃, 0.02 % MgCl₂, pH 9.6 に調節した coating buffer にて coating した EIA 用 plate (Coster-3590, Cambridge, USA) を用いて、24 時間同量の E. Coli J-5 標準液と 10 μ g/ml に PBS にて調整した MoAb をエンドトキシン free のガラスチューブを用いて 4°C にて preincubation し、

図 1 Cross reactivity of MoAb against gram negative rods

図 2 Dot blot analysis of obtained MoAb using lipid A

図3 Standard curve of MoAb against E. Coli J-5

20% BSA, 0.02% $MgCl_2$ 添加 PBS-Tween 20 (PBST) にて室温で1時間 blocking した EIA plate の各 well に 100 μ l ずつ添加, 2時間室温にて incubate, その後 PBST にて洗浄後二次抗体として 1/1,000 の Biotinated goat anti-mouse IgG (Sigma) を室温にて添加し, 1時間反応させる. PBST にて洗浄後, 1/2,000 の Avidin alkaline phosphatase (Dakopatts, Denmark) を室温にて添加し, 3時間反応させ, 最後に p-nitrophenyl disulphate tablet を添加し, 405 nm にて吸光度を測定した条件が最良のものであった(図3). 直線性を有する 10 ng/ml より 10 μ g/ml まで, この standard curve を用いて E. Coli J-5 濃度が測定できることがわかった. この assay において, % coefficient of variation (%CV) を検討したところ, %CV は標準曲線の各ポイントにおいて平均 6.2% (4.3~8.3%) と良好であった. さらに, 正常者血清および尿に既知量の E. Coli J-5 を添加してその濃度を測定したところ, 血清では PBS にて 10 倍に希釈した場合, 表のごとく良好な回収率が得られることがわかった.

なお, ELISA では triplicate にてすべての実験を行った.

3. E. Coli 含有尿, 敗血症血清および透析液中の E. Coli J-5 濃度

Standard curve 作成と同様に, 同量の抗体と超音波で処理した未知の sample を standard curve 用 sample と E. Coli J-5 標準液を共に 24 時間ガラスチューブを用いて preincubation した.

その後の操作は standard curve 作成時と同様に行った. Standard curve を基にして敗血症にて死亡した患者血清, 大阪市立大学附属病院泌尿器科外来を受診した急性腎盂腎炎患者のうち, E. Coli を培養にて 10⁵以上認めた患者尿中および大阪市立大学附属病院人工腎室より回収した透析液の E. Coli J-5 濃度を計算したところ, それぞれ 540 ng/ml, 40 ng/ml および検出限界以下であっ

表 Recovery experiment for measurement of exogenous E. Coli J-5 added to 1/10 normal human sera and urine

	E. Coli J-5 added (ng/ml)	Measured
1/10 normal human sera	160	180 $\pm$ 30
	630	700 $\pm$ 80
	2,500	2,300 $\pm$ 600
Normal human urine	160	160 $\pm$ 20
	630	710 $\pm$ 70
	2,500	2,200 $\pm$ 400

た.

考察

従来の透析膜である Cuprophane 系膜で観察される補体の活性化や一過性の白血球減少などの生体適合性に対する疑問や手根管症候群など長期透析合併症の治療には, 尿素窒素やクレアチニンなどの低分子物質だけでなく, 中・高分子物質の除去が必要である. さらに短時間透析や高い除去効率の透析をめざし, high flux 膜が開発されるようになった. しかしながら, 従来の膜では考えられなかった backfiltration が起こることがわかってき, エンドトキシンの透析液より体内への流入が問題となってきた.

今回, E. Coli J-5 株をマウスに免疫し, 良好な MoAb が得られたため competition ELISA 法により直接, 透析液や血清中のエンドトキシン濃度を測定する方法を開発した.

問題点としては, エンドトキシンが他の抗原と異なりポリエチレンよりなる Enzyme immunoassay 用プレートには附着しにくいことである. そのため, standard curve において直線性が 10 ng/ml~10 μ g/ml の領域でしか得られず, 特にエンドトキシンで問題となる 10~100 pg/ml 濃度までは感度をあげることができなかった. しかし, 今回敗血症により死亡したと考えられる患者血清, E. Coli を多量に含む急性腎盂腎炎尿より直接 E. Coli J-5 濃度を測定できたことや, 表で示したごとく, 回収率が尿中および血清を 10 倍希釈した場合に非常に良好であったことより, 今後既知濃度の E. Coli J-5 添加により十分逆算が可能と考えられた. 他のエンドトキシン定量法として Limulus test, Toxicolor 法, Endospecy 法があるが, Limulus test は半定量的検査方法であり, 定量的測定をめざし, Toxicolor 法が開発されたが, これらの方法はエンドトキシンだけでなく, factor G にも反応することがわかってきた⁹⁾. そこでエンドトキシンのみと反応する Endospecy 法が開発されたが, 血中に存在する serine protease やその inhibitor などがカ

プトガニ凝固因子や合成基質に影響を与えるため、検体の前処置とし過塩素酸処理 (PCA) が行われるが、PCAにより除去した沈殿中にもエンドトキシン活性が認められる⁹⁾など未だ問題点が多い。我々の competition ELISA 法においても血清を希釈せず用いた場合には、回収率はよくなかった。その原因としては、まず添加した E. Coli J-5 が血清中の種々の物質と結合してしまうためと思われる。しかしながら、MoAb は腹水中より容易に多量に入手することが可能であり、放射性物質も使用せず、2日間の assay で再現性も良好で今後、種々の分野で応用が可能なことより、さらに精度を上げたい。

文献

- 1) Gejyo F, Odani S, Yamada T, Honma N, Saito H, Suzuki Y, Nakagawa Y, Kobayashi H, Maruyama Y, Hirasawa Y, Suzuki M, Arakawa M : β_2 -microglobulin, a new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis. *Kidney Int* 30 : 385-390, 1985
- 2) Fenves AZ, Emmett M, White MG, Greenway G, Michaels DB : Carpal tunnel syndrome with cystic bone lesions secondary to amyloidosis in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2 : 130-134, 1986
- 3) Schmidt M, Baldamas CA, Schoeppe W : Back-filtration in hemodialysers with highly permeable membranes. An in vitro and in vivo investigation. *Blood Puri* 2 : 108-114, 1984
- 4) Curtis JR, Wing AJ, Coleman JC : *Bacillus cereus* bacteraemia : A complication of intermittent hemodialysis. *Lancet* i : 136-138, 1967
- 5) Bernick JJ, Port FK, Favero MS, Brown DG : Bacterial and endotoxin permeability of hemodialysis membranes. *Kidney Int* 16 : 491-496, 1979
- 6) Iwanaga S, Morita T, Harada T, Niwa M, Takada K, Kimura T, Sakakibara S : Chromogenic substances for horseshoe crab clotting enzyme, its application for the assay of bacterial endotoxin. *Hemostasis* 7 : 183-188, 1978
- 7) Obayashi T : Addition of perchloric acid to blood samples for colorimetric limulus test using chromogenic substrate : Comparison with conventional procedures and clinical application. *J Lab Clin Med* 104 : 321-330, 1984
- 8) 青山悦子, 野沢章夫, 山田誠一, 金沢 司, 大和田滋, 石田尚志, 中村正夫, 山本光祥 : エンドトキシンの新しい比色定量法の検討と透析膜由来のリムルステスト陽性物質について. *臨床検査* 31 : 321-325, 1987
- 9) 吉田昌男, 高橋和彦, 平田陸正, 稲田捷也, 菊地 充, 田中重則, 田村弘志 : 合成基質を用いたエンドトキシンの微量定量法について. エンドトキシン研究の新しい展開. 織田敏次監修 (羊七社) p 35-44, 1986