

偏性嫌気性菌 *Clostridium perfringens* の迅速診断法に関する研究

日大生産工（院） ○富木 雅義

日大生産工（院） 齋藤 仁，日大生産工 小森谷 友絵・神野 英毅

1. 緒言

C. perfringens (*Clostridium perfringens*) は、腸管内、土壌など自然界に広く分布し、種々の毒素産生能により分類される偏性嫌気性グラム陽性桿菌の一種である。本菌はヒトへの感染症として、食中毒、ガス壊疽等が知られており、その主な病原因子は A 型菌である。さらに、家畜を含めた動物に対しても致死性的感染症を引き起こすため、その予防や治療が重要視されている。本菌の検出法には、培養法、遺伝子学的手法である PCR 法等があるが、これらの手法には操作の簡易化、時間の短縮が求められている¹⁾。一方で、迅速な検出が可能な免疫学的手法はエンテロトキシンが対象のため、一部の A 型菌のみが検出対象となる²⁾。また、*C. perfringens* の全菌型が産生する毒素である α 毒素は抽出が困難であり、回収量が微量なことが課題となる。

本研究では、遺伝子組換え技術を用いて α 毒素の精製の簡易化及び大量培養することで抗原を作製し、抗体を得ることで簡便かつ高感度な免疫学的手法の確立を目的とする。

2. 実験方法

【抗原作製】

C. perfringens は、岐阜大学生命科学総合実験センター嫌気性菌実験分野より供与された臨床分離株である *C. perfringens* GAI 9407 株を使用した。

C. perfringens の α 毒素産生遺伝子部位を PCR により増幅し、ベクター pET100/D-TOPO (invitrogen) に組み込み、大腸菌に形質転換した。これに IPTG を作用させることで組換えタンパク質を発現させた。また、このベクター

pET100/D-TOPO には 6 個の His-tag がコードされており、得られる組換えタンパク質には His-tag が修飾される。発現した組換えタンパク質を His-tag に対して親和性のある Ni イオンを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。この精製には Ni Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare) 充填カラムを使用した。得られた精製組換えタンパク質は、LC/MS/MS を用いて同定を行った。

【抗体作製】

精製した組換えタンパク質を脱塩処理後に濃縮を行い、抗原としてマウスに免疫した。Balb/c マウス一匹に対して、抗原量 30~50 μ g をアジュバントと混合し、2 週間に 1 回の割合で投与した。免疫したマウスの脾臓細胞及びミエローマ細胞 (マウス癌細胞 P3U1 株) を PEG (polyethylene glycol) を用いて細胞融合を行い、96 穴プレートにて培養した。目的のハイブリドーマのスクリーニングには ELISA 法 (enzyme-linked immunosorbent assay) を用い、陽性反応を示した培養ウェルに対してクローニングを行った。再度スクリーニングを行い、目的のハイブリドーマ樹立を確認した。

樹立したハイブリドーマから大量のモノクローナル抗体を回収するために、腹水培養法を行った。プリスタン処理を行った Balb/c マウスの腹腔内にハイブリドーマを移植することで、腹水として高濃度のモノクローナル抗体を回収した。得られた腹水は HiTrap Protein G (GE Healthcare) を用いて精製し、IsoStrip (Roche) により抗体のクラスを確認した。クラスを特定した抗体を用いて ELISA を行い、臨床検査への有用性を確認した。

Study on Rapid Diagnosis for *Clostridium perfringens*

Masayoshi TOMIKI, Hitoshi SAITO, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

3. 結果及び考察

【抗原作製】

発現した組換えタンパク質を SDS-PAGE で確認した結果を Fig. 1 に示す。この図より、lane 6-10 の非誘導には見られないバンドが lane 1-5 誘導側に経時的に濃く見られることから、組換えタンパク質の発現を確認できた。この試料を可溶化し、精製した結果が Fig. 2 である。夾雑タンパク質が取り除かれ、目的のタンパク質のみ回収されていることが分かった。この組換えタンパク質を LC/MS/MS で解析した結果、発現タンパク質全アミノ酸の 53% に当たる 15 の α 毒素に特異的なポリペプチド鎖を検出した (Fig. 3)。一般的に、MS の同定では 2 本以上の特異的なポリペプチド鎖が検出されることが基準である。従って、本研究にて発現した組換えタンパク質は α 毒素であることが同定された。また、精製した組換えタンパク質濃度を BCA 法により測定した結果、組換え菌体培養液 60 ml より 0.2 mg の組換え α 毒素の回収に成功した。

【抗体作製】

樹立した抗 α 毒素抗体産生ハイブリドーマの腹水培養を行った。得られた腹水を精製し IsoStrip に掛けた結果、IgG 抗体であることが判明した (Fig. 4)。この抗体を用いて ELISA により反応性を確認した結果、抗体希釈率約 2000 倍まで有用な OD 値が得られた (Table 1)。

4. 結論

発現した組換えタンパク質は α 毒素であることが MS により同定された。組換え菌体培養液 60 ml から 0.2 mg の組換え α 毒素を回収することができた。また、 α 毒素に対して特異的なモノクローナル抗体が得られ、免疫アッセイ系の構築が可能となった。

5. 参考文献

- 1) J. I. Rood, S. T. Cole, *Microbiological Reviews*, **55**, 621 (1991).
- 2) T. Karasawa, X. Wang, *Infection and Immunity*, **71**, 641 (2002).

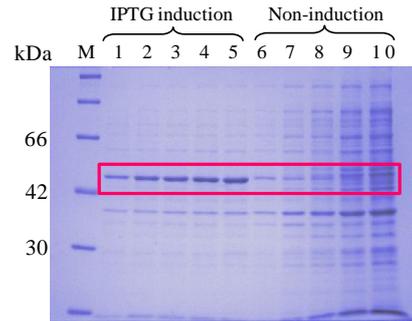


Fig. 1 Expressed protein induced by IPTG in pellet samples

M : Molecular Weight Marker High Range (Wako)
Lane 1 - 5 : IPTG induction incubated from 1h to 5h
Lane 6 - 10 : Non induction incubated from 1h to 5h

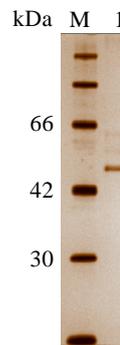


Fig. 2 Purified recombinant α -toxin
M : Molecular Weight Marker High Range (Wako)
Lane 1 : Purified recombinant α -toxin

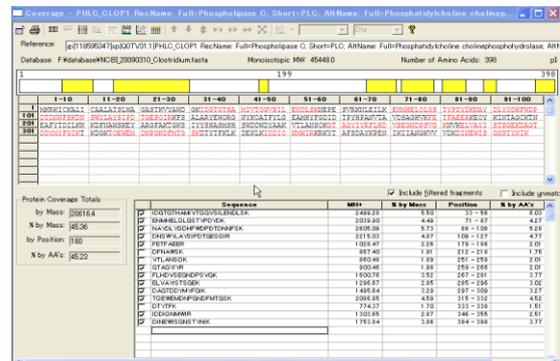


Fig. 3 Identified α -toxin peptides by LC/MS/MS



Fig. 4 Determination of isotype using IsoStrip

Table 1 Reactivity of anti-recombinant α -toxin monoclonal antibody by ELISA

Dilution rate	OD _{492 nm}
1	0.964
10	0.559
10 ²	0.479
10 ³	0.292
10 ⁴	0.098
Negative control	0.064