

資料

Surface Plasmon Resonance センサーを使用した レジオネラ属菌の迅速検出法

渡辺祐子¹, 板垣康治², 大屋日登美¹,
岡崎則男¹

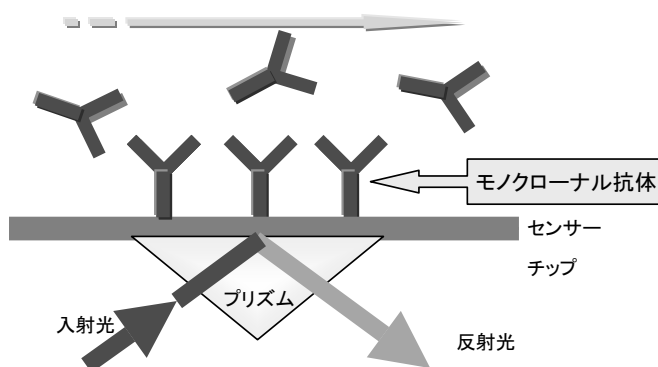
Rapid Detection of Genus *Legionella* by Surface Plasmon Resonance Sensor

Yuko WATANABE, Yasuharu ITAGAKI,
Hitomi OHYA and Norio OKAZAKI

温泉や冷却塔水などの環境水中のレジオネラ属菌の検出には培養法^{1,2)}が使用されているが、レジオネラ属菌は発育が遅いため、結果を得るまでに10日近くを要する。このため、レジオネラ属菌の迅速検出法の必要性から、遺伝学的手法をはじめELISA、蛍光抗体法などを利用した検査法が検討され、現在、これらの方法を応用した市販キットも存在する。今回、これまでの検出法とは全く異なる手法を用いたSurface Plasmon Resonanceセンサー(SPRセンサー)によるレジオネラ属菌の迅速検出法を検討する機会を得たので概略を報告する。

SPRセンサーは抗原・抗体複合物等の結合物質を迅速に検出する装置である。抗原あるいは抗体を金属薄膜に蒸着したセンサーチップ表面に固定化し、このセンサー

モノクローナル抗体の固定化



チップ上に固定化された抗原あるいは抗体に作用する物質を含む試料を一定量流し、抗原抗体反応を起こさせ、この時生じる微妙な金属表面の変化を表面プラズモン共鳴*という光学現象を用いて検出し、センサグラムと呼ぶグラフにより表示する。このように従来の細菌検査法と異なり、定性試験と同時に既知濃度の試料をもとに作製した検量線を用いて定量検査を行うことができる。さらに、光学的な変化を直接検出する手法であるため標識を行う必要が無く、短時間で測定できるとともに少量の試料で検出することが可能という特徴を有している。

(* : 表面プラズモン共鳴とは、ある特定の角度から入射した光は金属表面プラズモンと共鳴し吸収されるが、このとき金属膜の表面で抗原抗体反応等が発生すると、反射光が高感度に変化するという原理を利用している(図1).)

測定装置はBiacore 3000(ピアコア社製)を使用し、センサーチップとしてCM5チップ(カルボキシルメチル基を導入)を用いた。抗体は、抗*Legionella pneumophila*血清群1(以下*L.pneumophila*SG1)モノクローナル抗体マウス(以下MAB)IgG1(Biogenesis), MAB IgG3(PROGEN), MAB IgM (Biogenesis)の3種と同じく抗*L.pneumophila*血清群1-14ポリクローナル抗体ヒツジ(以下PAb) IgG(CORTE)を使用した。供試菌株として*L.pneumophila* SG1 ATCC 33152 及び*L.dumoffii* ATCC 33279を使用した。

測定試料(抗原)は各菌株をBCYE 寒天培地にて36, 3日間培養後コロニーをPBS (pH7.2)に浮遊させ、マクファーランド4の濃度になるように調整し、この菌液を95 10分間加熱した。さらに、加熱菌液の2分の1を超音波破碎処理(BRANSON 250D)して破壊菌を作

抗原抗体反応と反射光の変化

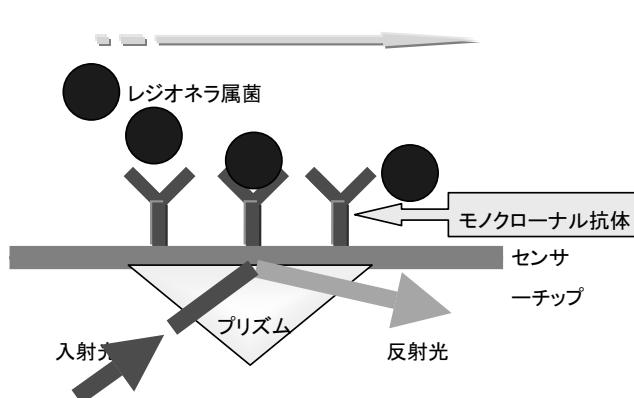


図1 SPRセンサーの測定原理

1 神奈川県衛生研究所 微生物部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
2 神奈川県衛生研究所 理化学部

り、加熱菌、加熱破壊菌の2種類の抗原液を準備した。なお、感染被害の危険防止を考慮し、測定には生菌を使用しなかった。測定時にこれらの抗原液を移動相 (1mM HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Surfactant P20) で希釈し、 1×10^7 CFU/ml 相当の抗原液とした。これらを更に希釈し、 2×10^6 , 1×10^6 , 2×10^5 , 1×10^5 CFU/ml 相当の抗原液を作製した。

次に使用抗体について、レジオネラ属菌との反応性をELISAで確認した。ELISAは、概ね Helbig らの報告³⁾に従ったが、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識の抗マウスIgG1抗体 (ICN Biomedicals, Inc) 及び抗ヒツジIgG抗体 (ICN Biomedicals, Inc) を、基質としては p-nitrophenylphosphate (Bio-Rad) を用いた。

まず、各抗体の *L.pneumophila*SG1 に対する反応性を確認したところ、MAb IgG3, PAb IgG は良好な反応性を示した。MAb IgG1 は MAb IgG3 に比べ10分の1程度の反応性であったが、破壊菌抗原に対しては全菌体抗原より強く反応した。非特異反応の有無を確認する目的で *L.dumoffii* の反応性をみたが、各抗体に対する反応性は低かった。なお、MAb IgM については、2次抗体の入手ができなかったため確認をしなかった。

Biacore 3000の操作手順としては、まず、センサーチップ (CM5チップ) を装置にセットし、移動相を用いて装置の安定化を行った。使用抗体は、固定化溶液 (10mM 酢酸ナトリウム pH4.5) でタンパク質量10~15 μ g/ml になるように希釈した後、図2のような手順でアミノカップリング薬 (50 μ M-Ethyl-3-carbodiimide hydrochloride, 200 μ M N-hydroxysuccinimide) でチップの活性化、抗体の固定及び1 μ M ethanolamine-HClによるブロッキングを行い、固定化をした。チップ接触時間は通常、活性化、固定化の順に各7分ずつ行うが、今回は、固定化

量を多くするため固定化時間を15分とした。上記抗体の内、MAb IgG3と Pab IgG 抗体は固定化できなかった。

次に測定を行ったが、測定条件は Biacore3000の既定条件に従った。同一抗体による繰り返し測定を行うため、センサーチップ上で結合した抗原を解離溶液 (10mM グリシン-塩酸緩衝液) で解離した。MAb IgG1との結合抗原は解離したが、MAb IgM との結合抗原はセンサーチップに固定した MAb IgM も同時に解離することから、通常5 μ l/minの移動相の流速を10 μ l/min にあげて洗浄することにより解離させた。

SPR センサーによる *L.pneumophila*SG1測定結果を図3のセンサグラムと表1及び表2に示した。測定結果は、センサーチップ上の質量変化をピアコア独自の単位であるリゾナンスユニット (RU) で表した。(1000RU = 1m²当たり 1 ng の変化) 検出限界は暫定的にシステムのシグナル強度10RUとしたところ検出限界は、ともに 2×10^5 であった。MAb IgG 1 に対する反応は加熱菌に比べ加熱破壊菌の反応が高く、ELISAの結果と同様であった。

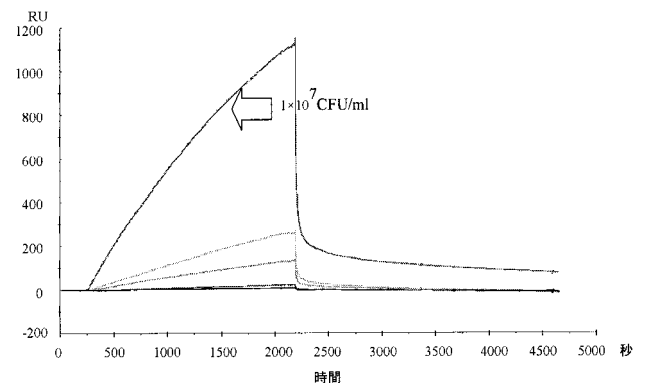


図3 *L.pneumophila*SG1を検出したセンサグラム (モノクローナルIgM固定化)

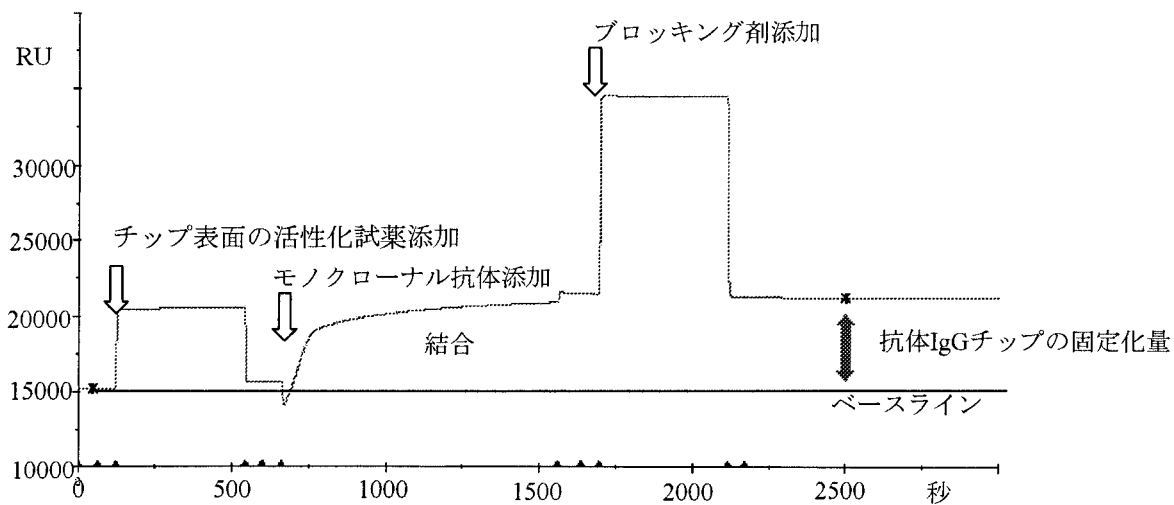


図2 モノクローナルの抗体固定の手順

表1 モノクローナル抗体 IgG1をセンサーチップに固定時の *L.pneumophila* の結合量

<i>L.pneumophil</i> 濃度(CFU/ml)	1×10^5	2×10^5	1×10^6	2×10^6	1×10^7
加熱菌 (RU)	5.3	12.45	83.19	171.39	712.86
加熱破壊菌 (RU)	5.96	28.21	148.43	272.96	802.21

表2 モノクローナル抗体 IgM をセンサーチップに固定時の *L.pneumophila* の結合量

<i>L.pneumophila</i> 濃度(CFU/ml)	1×10^5	2×10^5	1×10^6	2×10^6	1×10^7
加熱菌 (RU)	6.7	18.7	128	255.5	1086.6

このように、SPR センサー (Biacore3000) による *L.pneumophila*SG1の検出は可能であり、検出限界は 2×10^5 CFU/mlであった。しかし、この方法の検出感度は培養法によるそれ (10CFU/100ml) と比べて10万分の1と低く、実用に供するには今後大幅な改善が必要と思われる。今回使用した4種の抗体のうち、3種は事前にELISAで *L.pneumophila*SG1に対する反応性を確認しており、その結果から全ての抗体がSPRセンサーでの使用が可能と考えられたが、MAb IgG3とPAb IgG抗体はセンサーチップに固定することが出来なかった。従って、SPRセンサーの感度向上には反応性の高い抗体の模索と同時にセンサーチップ上への固定化方法の検討が必要と考えられた。

謝 辞

今回の実験を進めるに当たり、ピアコア社営業部大橋誠様に多大なご協力を得たことを記し、関係各位に深謝します。

(平成16年7月28日受理)

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局企画課監修：新版レジオネラ症防止指針，財団法人ビル管理教育センター，東京 (1997)
- 2) 水質試験等調査専門委員会：上水試験方法2001年版，社団法人日本水道協会，東京 (2001)
- 3) Jurgen Herbert Helbig, John B.Kurtz, Maddalena Castellani Pastoris, Carmen Pelaz, Paul Christian Luck : Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies:possibilities and limitations for division of the species into serogroups, J.Clin.Microbiol, 35 :2841-2845(1997)