

2) 冷水病感染耐過アユが認識し、注射ワクチン接種アユの 認識しない冷水病菌体抗原の存在

金辻宏明

【目的】 筆者は前報で*Flavobacterium psychrophilum* を原因菌とする冷水病の水平感染攻撃で生残したアユはホルマリン死菌(FKC)注射ワクチン接種アユと異なる特異抗体産生をしていることを明らかにした。本報ではさらに認識抗原の差を酵素抗体免疫測定法(ELISA)によって詳細に検討した。

【方法】 供試菌には*F. psychrophilum* SG990302株を用いた。培養は供試菌を50mLの改変サイトファー液体培地(MCY)に接種して15°Cで24時間振盪(100rpm)して行った。培養後これまでの報告¹⁾と同様にしてFKCとし、超音波破壊を行った後、25,400×gで15分間冷却遠心して上清を超音波破壊FKC上清とした。粗リポ多糖(LPS)はフェノール水を用いた方法²⁾で抽出した。生菌抽出画分は、培養生菌から60°Cで溶出する成分³⁾とした。超音波破壊FKC、LPSおよび生菌抽出画分は10mM リン酸緩衝食塩水pH 7.0で平衡化したSephacryl S-200 [Pharmacia] カラム(1.77cm²×100cm : BIO-RAD)に2mLを展開し、同緩衝液によって溶出させてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。3mL分取した画分は280nmの吸光度、糖含量⁴⁾およびタンパク質含量(ブラッドフォード試薬による発色)を測定した。冷水病水平感染耐過アユ⁵⁾および注射ワクチン接種アユ⁶⁾はこれまでの報告と同様に水平感染攻撃3週間後に生残したものおよびワクチンを注射して6週間後のものを用い、これらアユより常法に従って血清を分離し、供試アユ血清を得た。各種ゲル濾過画分の供試アユ血清およびウサギ抗血清⁷⁾との反応性はELISA⁸⁾で調べた。

【結果】 FKC超音波破壊上清のゲル濾過画分の280nmの吸光度、糖およびタンパク含量を測定した結果を図1に、ゲル濾過画分と供試アユ血清との反応性を調べた結果を図2に示した。高分子画分にはまず糖が、僅かに遅れてタンパク質の主要なピークが認められ、ウサギ抗血清は強く、感染耐過アユおよび注射ワクチン接種アユ血清は非常に弱く反応した。LPSのゲル濾過画分の280nmの吸光度、糖およびタンパク含量を測定した結果は図3に、ゲル濾過画分と供試アユ血清との反応性を調べた結果は図4に示すとおりで、高分子の主要な糖のピークが検出され、ウサギ抗血清とだけ反応した。生菌抽出画分のゲル濾過画分の280nmの吸光度、糖およびタンパク含量を測定した結果は図5に、ゲル濾過画分と供試アユ血清との反応性を調べた結果は図6に示すとおりで、高分子に糖およびタンパク質の主要なピークが認められ、低分子画分にも糖およびタンパク質の低いピークがいくつか認められた。高分子画分は注射ワクチン接種アユ血清およびウサギ抗血清と反応し、感染耐過アユ血清とは反応しなかった。また、低分子画分とは水平感染耐過アユ血清だけが反応した。したがって、水平感染耐過アユと注射ワクチン接種アユの認識する抗原は種類が異なると考えられる。

-
- ※ 1) 金辻宏明：冷水病菌体を用いた免疫原性強化ワクチン作製方法の検討，平成14年度滋賀水試事報，186-187(2003)。
 - ※ 2) O. Westphal and K. Jann: Bacterial Lipopolysaccharides. Extraction with Phenol-Water and Further Applications of the Procedure. by R. L. Whistler, J. N. BeMiller and M. L. Wolfrom, "Methods in Carbohydrate Chemistry" Vol. V, Academic Press, New York, 83-91 (1965)。
 - ※ 3) 金辻宏明：冷水病原因菌に対する水平感染耐過アユおよび注射ワクチン接種アユ血中特異抗体の特殊性，平成15年度滋賀水試事報，in press, (2004)。
 - ※ 4) Hodge, J. E. and B. T. Hofreiter (1962): Methods in carbohydrate chemistry, Vol. 1(Whistler R. L. and Wolfrom M. L. eds.), p338, Academic press.
 - ※ 5) 金辻宏明・二宮浩司・山本充孝・遠藤誠：冷水病耐過アユの抗病性，平成14年度滋賀水試事報，204-205, (2003)。
 - ※ 6) 金辻宏明：ハプテン化および免疫原性強化した冷水病菌体ワクチンの有効性，平成14年度滋賀水試事報，188-189(2003)。
 - ※ 7) 金辻宏明：アユ抗体および冷水病菌体に対するウサギ抗血清の作製と酵素標識，平成14年度滋賀水試事報，216-217(2003)。
 - ※ 8) 金辻宏明：酵素抗体免疫測定法(ELISA)によるアユ冷水病菌体検出系の作製，平成14年度滋賀水試事報，218-219(2003)。

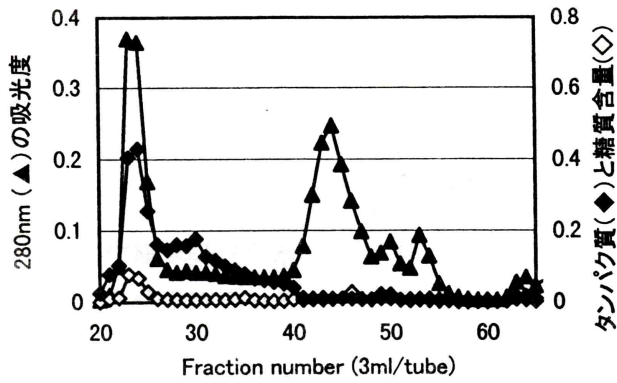


図1. Sephacryl S-200カラムを用いた冷水病菌FKC超音波破壊物の分画パターン、タンパクおよび糖含量。
 -▲-: 280nmの吸光度, -◆-: タンパク質含量,
 -◇-: 糖成分含量。

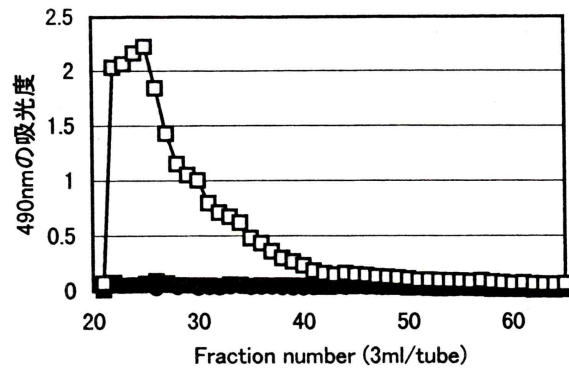


図2. Sephacryl S-200カラムで分画した冷水病菌FKC超音波破壊物に対するアユおよびウサギ特異抗体のELISAによる検出。
 -●-: 水平感染耐過アユ血清, -■-: FKC注射ワクチン接種アユ血清, -□-: FKC注射ウサギ抗血清。

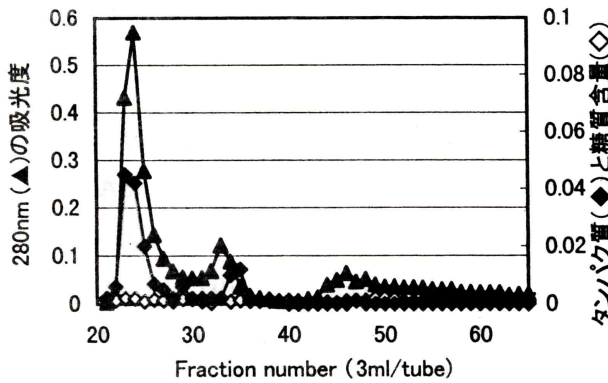


図3. Sephacryl S-200カラムを用いた冷水病菌体LPSの分画パターン、タンパクおよび糖含量。
 -▲-: 280nmの吸光度, -◆-: タンパク質含量,
 -◇-: 糖成分含量。

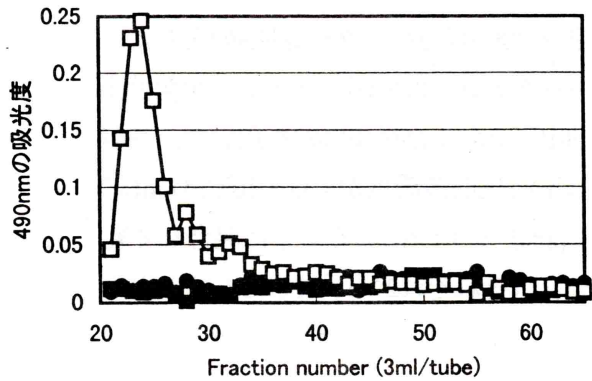


図4. Sephacryl S-200カラムで分画した冷水病菌体LPSに対するアユおよびウサギ特異抗体のELISAによる検出。
 -●-: 水平感染耐過アユ血清, -■-: FKC注射ワクチン接種アユ血清, -□-: FKC注射ウサギ抗血清。

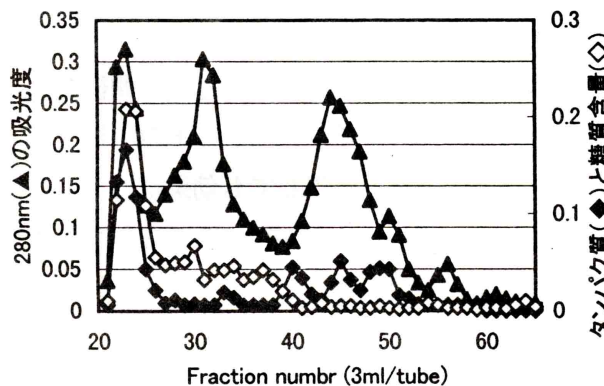


図5. Sephacryl S-200カラムを用いた冷水病菌体生菌抽出画分に分画パターン、タンパクおよび糖含量。
 -▲-: 280nmの吸光度, -◆-: タンパク質含量,
 -◇-: 糖成分含量。

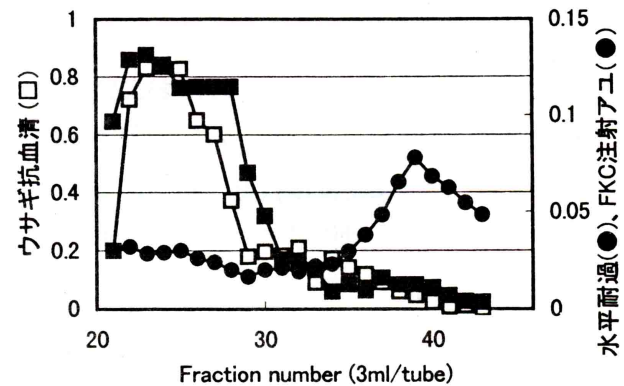


図6. Sephacryl S-200カラムで分画した冷水病菌体生菌抽出画分に対するアユおよびウサギ特異抗体のELISAによる検出。
 -●-: 水平感染耐過アユ血清, -■-: FKC注射ワクチン接種アユ血清, -□-: FKC注射ウサギ抗血清。