

## 5) 冷水病菌をELISAで検出する場合の抗原固相化条件の影響

金辻宏明

【目的】 筆者はこれまでに酵素抗体免疫測定法(ELISA)によってアユ冷水病菌体に対するアユ血清中の特異抗体検出系を作製した。本報告ではELISAで冷水病菌体抗原を固相化するときのpHが冷水病感染耐過魚血清との反応性に大きな影響をおよぼすことを見いだしたので報告する。

【方法】 供試菌には1999年3月2日に冷水病で死亡したアユの腎臓から分離された*Flavobacterium psychrophilum* SG990302株を用いた。培養は供試菌を前報と同様にして培養、不活化してホルマリン不活化死菌(FKC)を作製<sup>\*)</sup>した。次に、冷水病菌体に対するアユ血中特異抗体の検出を次に示すELISAで固相化条件を変更して行った。まず、平底の96穴マイクロタイタープレート〔Costar〕に蒸留水を75  $\mu$ L加え、マクファーランド濁度で5に調整した供試FKCを75  $\mu$ L加えて2倍段階希釈系列を作製した。次にこの希釈系列に0.2M 炭酸緩衝液pH9.5または0.2M酢酸緩衝液pH4.5を25  $\mu$ L加え、この時点で630nmの吸光度を測定して濁度を調べたのち、4°Cで24時間固相化を行った。次に前報<sup>\*)</sup>と同様にして2回洗浄、ブロッキング、2回洗浄を行ってリン酸緩衝食塩水pH7.0(PBS)で5,000倍希釈した冷水病感染耐過アユ血清<sup>\*)</sup> 100  $\mu$ Lを加え、室温で2時間反応させた。反応後、2回洗浄し、PBSで1  $\mu$ g/mLに希釈したアユ抗体に対する酵素標識ウサギIgG<sup>\*)</sup>を100  $\mu$ L加えて4°Cで一晩反応させた。反応後、 $\alpha$ -フェニレンジアミン〔和光純薬〕を基質として前述<sup>\*)</sup>と同様に発色させ、反応停止後、490nmの吸光度を測定した。つぎに、ELISAで抗原(FKC)を固相化するときの緩衝液と抗原の濃度について検討した。上述と同様にして1,000~7.8mMになるよう酢酸緩衝液50  $\mu$ Lをタイタープレートに加え、前試験と同様の濃度になるように原液および蒸留水で希釈したFKCの2倍段階希釈系列液50  $\mu$ Lを加えて4°Cで24時間反応させた。その後、前述と同様に2回洗浄、ブロッキング、2回洗浄、感染耐過アユ血清との反応および2回洗浄を行い、アユ抗体に対する酵素標識ウサギIgG<sup>\*)</sup>を100  $\mu$ L加えて37°Cで1時間反応させ、2回洗浄後、発色停止および490nmの吸光度の測定を行った。

【結果】 pHの異なる緩衝液に浮遊させたFKCの2倍段階希釈系列液の濁度を測定した結果を図1に、感染耐過魚血清との反応性を図2に示した。濁度はpH9.5のアルカリ性緩衝液中ではやや減少傾向を示したが、影響は少ないと考えられる。またpH4.5の酸性の緩衝液を用いて感染耐過魚血清と反応させると、非常に高い値を示した。次に、固相化時の酢酸緩衝液の濃度の影響を調べた結果を図3に示した。酢酸緩衝液の濃度は感染耐過魚血清の反応に対して特に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、ELISAでFKCを検出する場合、pHの影響は極めて大きく、酸性条件下で反応を促進可能と判断された。このことは冷水病菌体抗原の形状がpHによって変化する可能性を示唆しており、ワクチン開発に重要な知見になり得るかもしれないと考えられる。なお本研究の結果からELISAでのFKC固相化はマクファーランド濁度5のFKC浮遊液を50mM酢酸緩衝液pH4.5で50倍希釈が至適条件と考えられた。

- 
- 文献 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) 金辻宏明：酵素抗体免疫測定法による冷水病菌に対するアユ血中特異抗体検出系の作製，平成14年度滋賀水試事報，220-221 (2003)。  
3) 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)。  
4) 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)。

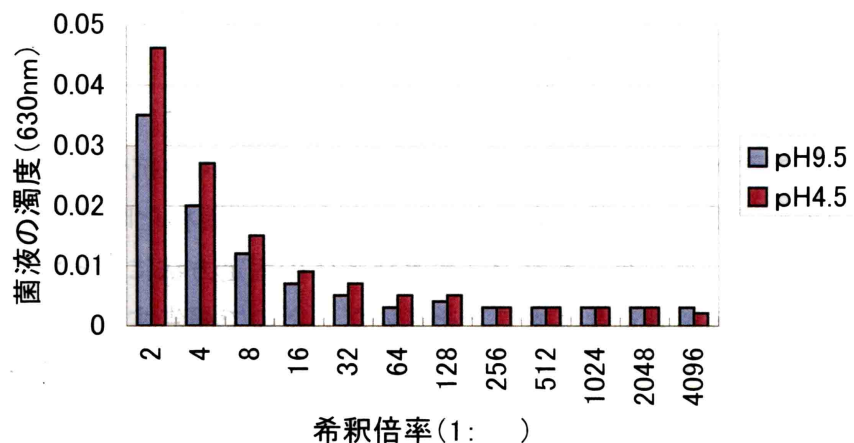


図1. 酵素抗体免疫測定法(ELISA)による菌体抗原固相化時の濁度.

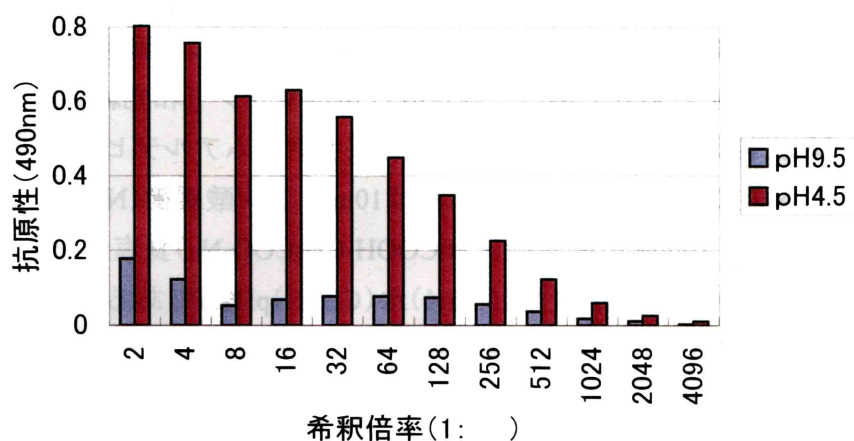


図2. ELISAによる冷水病水平感染耐過アユ血清を用いた冷水病菌体の検出における固相化緩衝液のpHの影響.

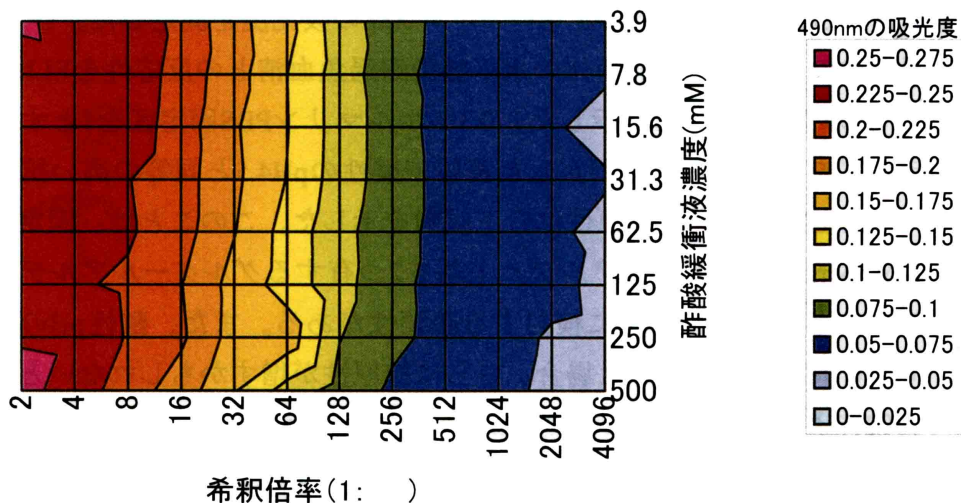


図3. ELISAによる冷水病水平感染耐過アユ血清を用いた冷水病菌体の検出における濁度および固相化緩衝液濃度の影響.