

## 6) ELISA検出時の冷水病菌体の固定方法と抗原性の関係

金辻宏明

**【目的】** 筆者は前報で冷水病に感染して耐過したアユの血清中抗体と冷水病菌体との反応性酵素抗体免疫測定法(ELISA)で検出するとELISAで行う固相化時のpHがその反応に大きく影響することを見いだした。本報では冷水病菌体の固定方法によってもアユ特異抗体の冷水病菌体との反応に影響を及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した *Flavobacterium psychrophilum* SG990302株および1995年に冷水病で死亡したアユの腎臓から分離された *F. psychrophilum* CS-1株を用いた。培養は改変サイトファーガ寒天培地を用いて4°Cで継代したものを50mLの改変サイトファーガ液体培地(MCY)に接種して15°Cで24時間振盪(100rpm)して行った。蒸留水で630nmの吸光度を0.2に調整した供試生菌液を表1に示す16種類の固定液と1:9の比で混合し、4°Cで16時間静置して固定した。なお用いた固定液と緩衝液は次に示すとおりである。固定液はホルマリン〔和光純薬〕、20%グルタルアルデヒド〔和光純薬、電子顕微鏡用〕、8%パラホルムアルデヒド〔Sigma、P-6148〕(水酸化ナトリウムを加えて溶解)で、緩衝液は10mM リン酸緩衝( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ )食塩(0.85%)水(PBS)pH7.0、10mM 酢酸緩衝( $\text{CH}_3\text{COOH-CH}_3\text{COO-Na}$ )食塩(0.85%)水(CBS)pH4.5、10mM 炭酸緩衝( $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ )食塩(0.85%)水(CBBS)pH9.5である。次に、固定方法の異なる冷水病菌体に対するアユ血中特異抗体をELISAで検出した。まず固相化時のpHを一定にするため、平底の96穴マイクロタイタープレート〔Costar〕に0.1M リン酸緩衝液pH7.0を80  $\mu\text{L}$ 加え、そこに20  $\mu\text{L}$ の各種固定菌液を加え4°Cで16時間固相化後、前報<sup>\*1)</sup>と同様にして2回洗浄、ブロッキング、2回洗浄、PBSで5,000倍希釈した冷水病感染耐過アユ血清<sup>\*2)</sup> 100  $\mu\text{L}$ を加え、室温で2時間反応、2回洗浄、PBSで1  $\mu\text{g/mL}$ に希釈したアユ抗体に対する酵素標識ウサギIgG<sup>\*3)</sup>を100  $\mu\text{L}$ 加えて4°Cで一晩反応、*o*-フェニレンジアミン〔和光純薬〕を基質として発色、反応停止を行って490nmの吸光度を測定した。

**【結果】** 固定法の異なる冷水病菌体の水平感染耐過魚血清との反応性をELISAで調べた結果を表1に、そのグラフを図1に示した。0.3%ホルマリンPBS固定区を1とすると、グルタルアルデヒドを含む固定液で固定した菌体で酸性のpH4.5と同等の高い抗原性を示した。そのほかの固定液では逆に抗原性は低下傾向を示した。このことは、固定の速度の問題か、抗原の立体的構造の保持にアルデヒド基を2つ有するグルタルアルデヒドが有効であった可能性もあり、今後詳細に検討する必要がある。また、酸性pHの緩衝液とグルタルアルデヒドを固定液とした場合、さらに抗原性が増すかもしれないと推察された。なお、SG990302株よりCS-1株の方が抗原性が高い傾向を示した。

- 
- 文献 1) 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)。  
2) 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)。  
3) 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)。

表1. 冷水病菌固定液の種類、pHおよび感染耐過魚との反応性

固定液	pH	抗原性(490nm)		抗原比(対0.3%ホルマリンPBS)	
		990302	CS-1	990302	CS-1
0.3%ホルマリンPBS	7	0.159	0.215	1.00	1.00
0.3%ホルマリンCBS	4.5	0.369	0.628	2.32	2.92
0.3%ホルマリンCBBS	9.5	0.134	0.205	0.84	0.96
0.3%ホルマリンDW	-	0.203	0.179	1.27	0.83
1.0%ホルマリンPBS	7	0.092	0.087	0.58	0.41
5.0%ホルマリンPBS	7	0.047	0.044	0.30	0.20
0.3%グルタルアルデヒド PBS	7	0.295	0.644	1.85	3.00
1.0%グルタルアルデヒド PBS	7	0.223	0.717	1.40	3.33
2.0%酢酸Ca・0.3%ホルマリン	-	0.060	0.035	0.38	0.16
0.3%グルタルアルデヒド DW	-	0.345	0.594	2.17	2.76
0.3%パラホルムアルデヒド PBS	7	0.014	0.096	0.09	0.45
1.0%パラホルムアルデヒド PBS	7	0.017	0.041	0.10	0.19
0.2%酢酸Ca・1.0%ホルマリン	-	0.010	0.071	0.06	0.33
0.3%パラホルムアルデヒド DW		0.015	0.097	0.10	0.45
PLP固定液 <sup>※1, 2)</sup>	6.2	0.079	0.088	0.50	0.41
1/10 PLP固定液	6.2	0.061	0.079	0.38	0.37

1) PLP: periodate-lysine-paraformaldehyde液.

2) McLean, I.W. and Nakane, P. K. : *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1077(1974).

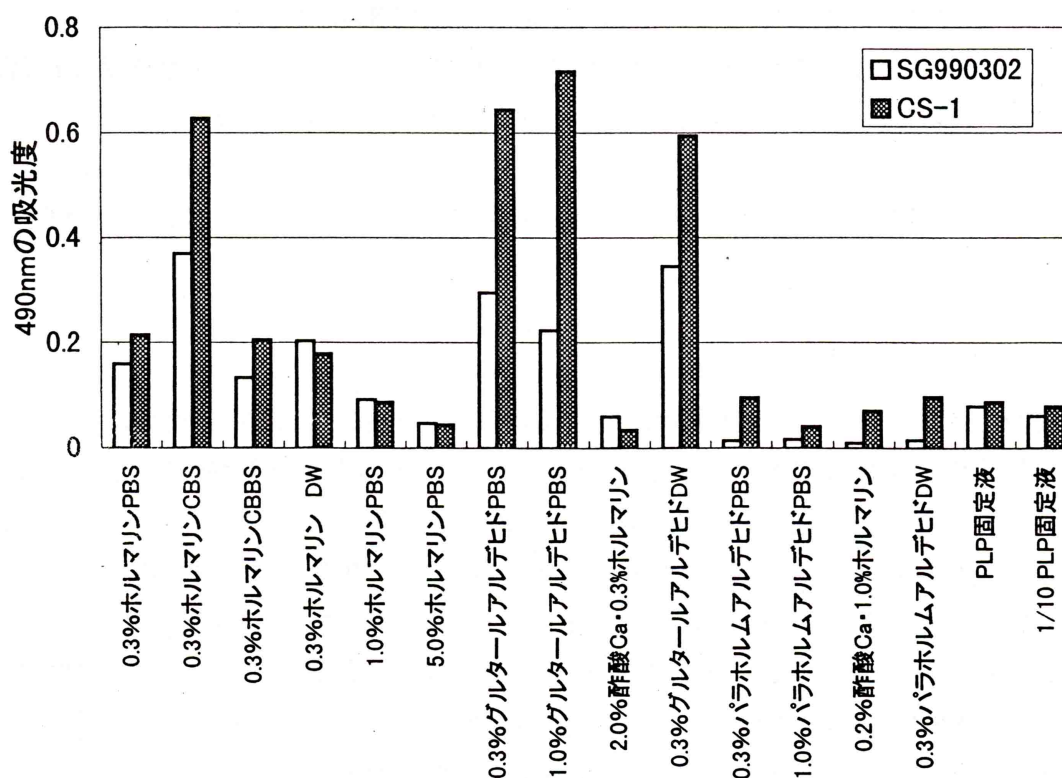


図1. いくつかの固定液で固定した冷水病菌体のELISAによる冷水病水平感染耐過アユ血清との反応性.