

1 6) 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

金辻宏明

【目的】 *Flavobacterium psychrophilum* を原因菌とするアユ冷水病は近年、非常に問題となっており、早急に対策を講じる必要がある。現在アジュバントを併用したホルマリン不活化菌体(FKC)注射ワクチンで効果が認められているが、個体ごとへの注射作業があることからより簡便な浸漬ワクチンの開発が切望されている。一方、FKCを用いた浸漬ワクチンの効果は低く、他の有効な浸漬ワクチンも見あたらない。そこで、本研究ではワクチンの免疫原性を強化するためFKCのハプテン化およびタンパク質の結合方法について検討した。

【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*F. psychrophilum* SG990302株を用いた。FKCの作製は以下のようにして行った。供試菌を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200mlの改変サイトファーガ液体培地(MCY)に接種して15°Cで振盪しながら24h種培養し、10 lのMCYへ接種して攪拌しながら15°Cで24h本培養を行い、8,000rpm (10,800×g) で30min遠心分離して菌体を得た。FKCは菌体を0.765%NaClを含む10mMリン酸($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$)緩衝液(PBS : pH7.0)1 lに再浮遊させ、0.3%量のホルマリンを加えて4°Cで24h攪拌しながら固定して作製した。

菌体の免疫原性強化はヘモシアニンの結合またはトリニトロフェニル化(TNP化)によって行った。まずヘモシアニン【Sigma:H-7017】は次に述べるようにタンニン酸法でFKCと結合させた。20mgのヘモシアニンを2.5mlの蒸留水に溶解し、0.02%タンニン酸を含むPBSを2.5ml加えて37°Cで20min反応させた。反応後、あらかじめ8,500rpm (8,900×g) で遠心して150mM PBpH6.4で1回洗浄し、5mlの150mM PBに再浮遊させたFKC浮遊液をヘモシアニン液と混合し、37°Cで20minインキュベートした。その後8,500rpm (8,900×g) で遠心分離し、沈渣をPBSで2回洗浄し、ヘモシアニン結合FKCとした。結合の有無はジフェニルチオカルバゾンで銅を染色して検出した。FKCのTNP化はLittle and Eisen (1966)の方法で行った。反応は5gの菌体を200mlの0.2Mホウ酸緩衝液pH9.2に浮遊させた菌液とトリニトロベンゼンスルホン酸Na【和光純薬】0.2gを混合して攪拌しながら15°Cで24h行った。反応後、8,500rpm (8,900×g) で遠心分離し、沈渣をPBSで2回洗浄し、TNP化FKCとした。

【結果】 ヘモシアニンとFKCはタンニン酸法によって図1に示すように反応させた。反応の確認はヘモシアニンと結合させたFKC上の銅をジフェニルチオカルバゾンでキレートして検出を行い、その結果を図2に示した。FKCは薄い茶色に染色されており、結合していると判断された。また、FKCをトリニトロベンゼンスルホン酸Naと反応させたところ、図3に示すように菌体は黄変し、TNP化していると判断された。以上のことからFKCとヘモシアニンはタンニン酸法で、TNP化はLittle and Eisen (1966)の方法で行えると判断された。また、タンパク質であれば今回行ったタンニン酸法によってFKCと結合させることは可能ではないかと推察された。

文献) J. R. Little and H. N. Eisen: Preparation and Characterization of Antibody Specific for 2,4,6-Trinitrophenyl Group, *Biochem.*, 11, 3385-3395 (1966).

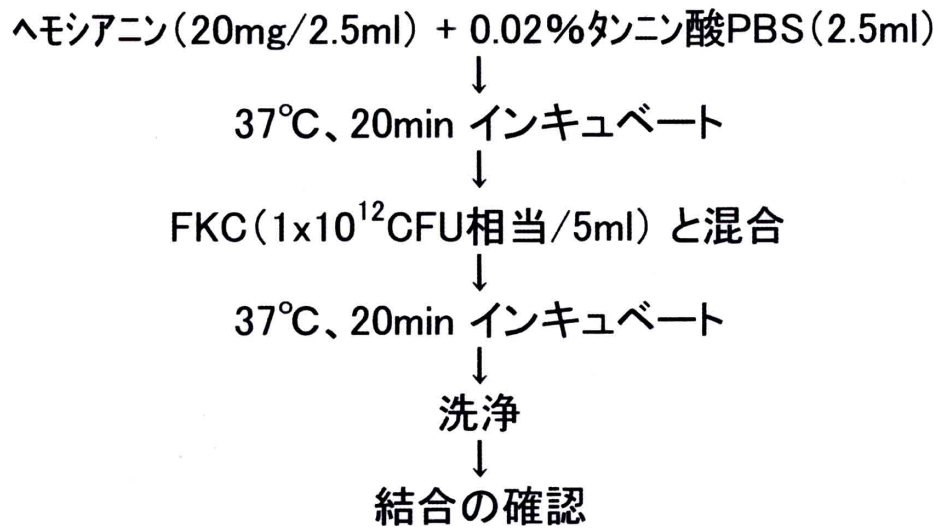


図1. タンニン酸法によるFKCとヘモシアニンの結合方法.

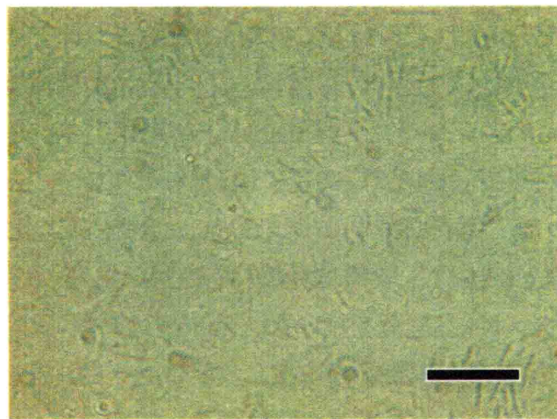


図2. ヘモシアニンを結合したFKCのジフェニルチオカルバゾンによる銅染色. Bar: 10 μm.

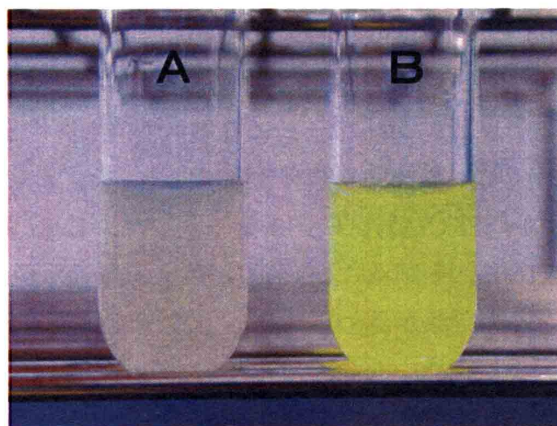


図3. トリニトロフェニル化したFKCの黄変像.
A: FKC, B: TNP化FKC.