

18) 冷水病菌体粗リポ多糖 (LPS) と ビブリオ病菌体との結合ワクチン作製方法の検討 I

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、その有効性はやや低く、さらに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。これまでに、我々はヘモシアニンの結合およびトリニトロフェニル化したFKCを作製してワクチンとしての有効性を調べたところ、その効果は低かった。そこで、本研究では一般に免疫原性が高いと考えられているリポ多糖 (LPS) と、抗ビブリオ病効果が高い、すなわちアユにとって免疫原性の高いことが明らかなビブリオ病ワクチンとを結合させる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。培養菌体は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遠心分離して得た。FKCは培養菌体を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。粗LPSは培養菌体からフェノール水を用いたWestpaulの方法 (1965) で抽出した。粗LPSの保存は凍結乾燥後、4°Cで行った。*Vibrio*病菌にはピシバックビブリオ【共立製薬】を市販状態で 1×10^8 cells/mlの濃度として用いた。LPSと*Vibrio*病菌との結合は、粗LPS 20mgと 2×10^{11} cells相当の*Vibrio*病菌をタンニン酸法で反応させて行い、結合状態を冷水病FKCに対するウサギ抗血清を用いた間接蛍光抗体法で染色して確認した。なお、冷水病FKCおよびビブリオワクチンに単染色を施して形態を比較し、冷水病FKCを間接蛍光抗体法によって蛍光強度を5段階 (+++、++, +, ±, -) で比較した。

【結果】 冷水病菌とビブリオワクチンの単染色像を図1に、結合ワクチンの蛍光像を図2に示した。冷水病FKCに対するウサギ抗血清でビブリオワクチン上の冷水病菌体LPSを検出したところ、図2に示すようにFKCの蛍光強度「+++」と比較して「+」とやや弱かったが、ビブリオワクチンの単染色像 (図1) と同じ形態の短桿菌像が明らかに蛍光していた。なお、非結合ビブリオワクチンの蛍光は「-」であった。このことから、ビブリオワクチンと冷水病LPSは結合していると判断された。しかし、どの程度のLPSが反応しているかどうかについては今後検討する必要があると考えられた。

文献) 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).

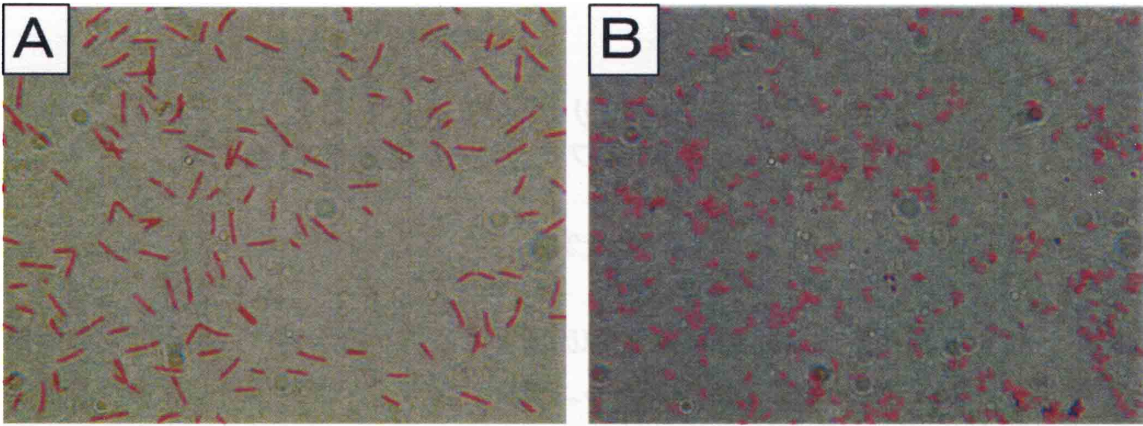


図1. 冷水病菌のFKCとビブリオワクチン(ピシバック
ビブリオ)の単染色像.

A: 冷水病菌, B: ビブリオワクチン.

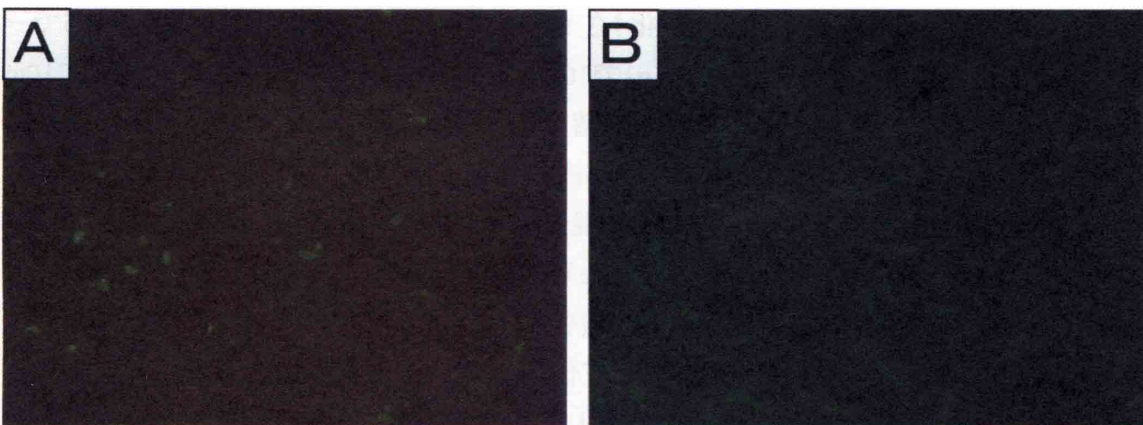


図2. 抗冷水病FKCウサギ抗血清を用いて染色した
冷水病菌体LPSとビブリオワクチン結合ワクチ
ンおよび冷水病FKC.

A: LPS結合ワクチン, B: 冷水病FKC.