

19) 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Ⅱ

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、リポ多糖(LPS)と、ビブリオ病菌体の結合はタンニン酸法によって可能であると報告している。¹⁾ 本研究ではより化学結合が安定な過ヨウ素酸法によってLPSとビブリオ病菌体の結合が可能かどうかについて検討した。

【方法】 用いた供試菌株(SG990302株)、培養方法、FKCの作製方法は前報²⁾と同様とした。粗LPSは培養菌体からフェノール水を用いたWestphalの方法³⁾で抽出した。粗LPSの保存は凍結乾燥後、4℃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 1×10^9 cells/mlの濃度として用いた。LPSと*Vibrio*病菌との結合は、図1に示すようにして行った。まず、LPS 8mgを蒸留水(DW)に溶解し、LPS溶液に0.1M 過ヨウ素酸Na 200 μ lを加え、室温で20min攪拌して反応(酸化)させた。その後、1mM 酢酸緩衝液pH4.5で一晩透析した。つぎに、10,000rpm(12,300 \times g)で10min遠心して集菌し、同様に遠心して10mM 炭酸緩衝液pH9.5で2回洗浄したビブリオ病菌体を、同緩衝液1mlに浮遊させ、あらかじめ、20 μ lの0.2M炭酸緩衝液pH9.5を加えたLPS溶液と混合して室温(約25℃)で2h攪拌した。つぎに、氷中で水素化ホウ素Na 100 μ lと混合して4℃で2h静置(還元)することで反応を安定化させた。その後、10,000rpm(12,300 \times g)で10min遠心してPBS pH 7.0で同様に2回洗浄した。洗浄菌体をPBSに浮遊させてLPS結合ワクチンとした。なお、LPSをタンニン酸法で結合したワクチンは前報¹⁾と同様にして作製した。結合状態は冷水病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、蛍光強度を5段階(+++, ++, +, \pm , -)で比較して確認した。

【結果】 冷水病菌体LPSを過ヨウ素酸法およびタンニン酸法で結合し、蛍光抗体法で染色した結果を図2に示した。すなわち、過ヨウ素酸法で結合させるとその蛍光強度は「 \pm 」と非常に弱かった。タンニン酸法では蛍光強度は「+」と過ヨウ素酸法による結合ワクチンより強い蛍光を示した。このことからLPSをFKC等に結合させる場合はタンニン酸法で行うと可能であると判断された。しかし、タンニン酸法で結合させるとその結合は経時的に解離すると予想され、本ワクチンが有効と判断されれば過ヨウ素酸法での結合反応条件を改良して本法を用いるべきではないかと考えられた。

-
- 文献 1) 金辻宏明：冷水病菌から抽出した粗リポ多糖(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，平成14年度滋賀水試事報，in press (2003).
2) 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，in press (2003).
3) 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).

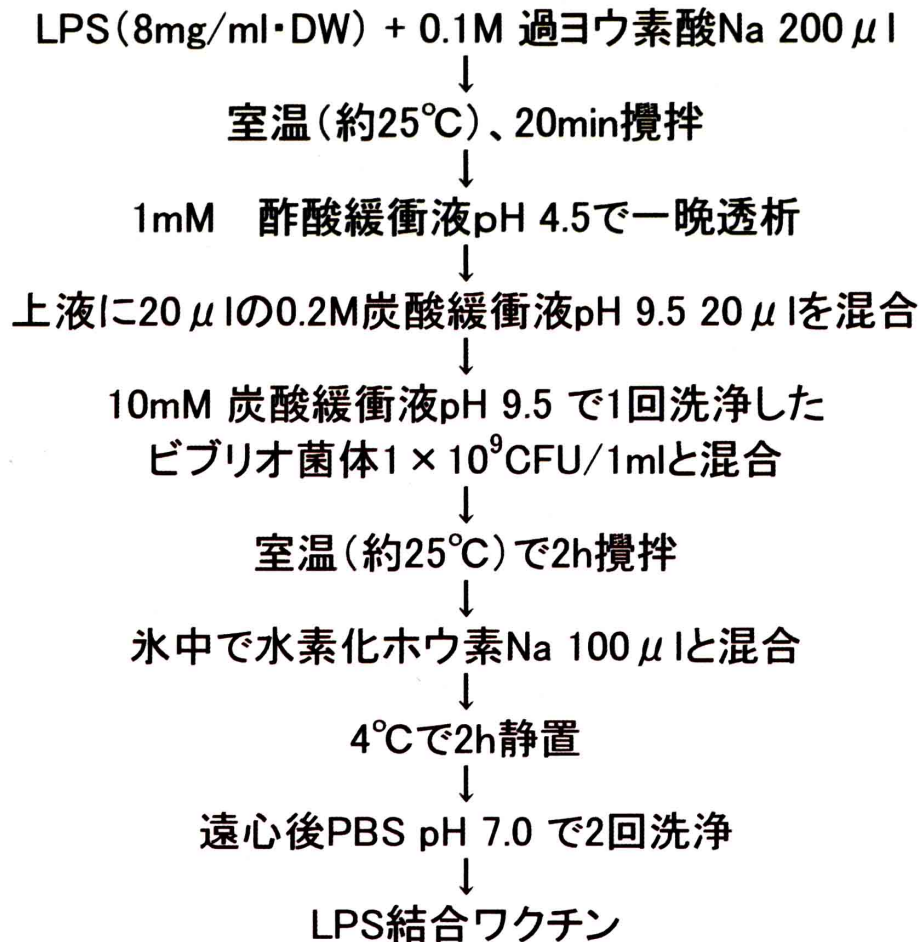


図1. 過ヨウ素酸法によるLPSとFKCの結合方法.

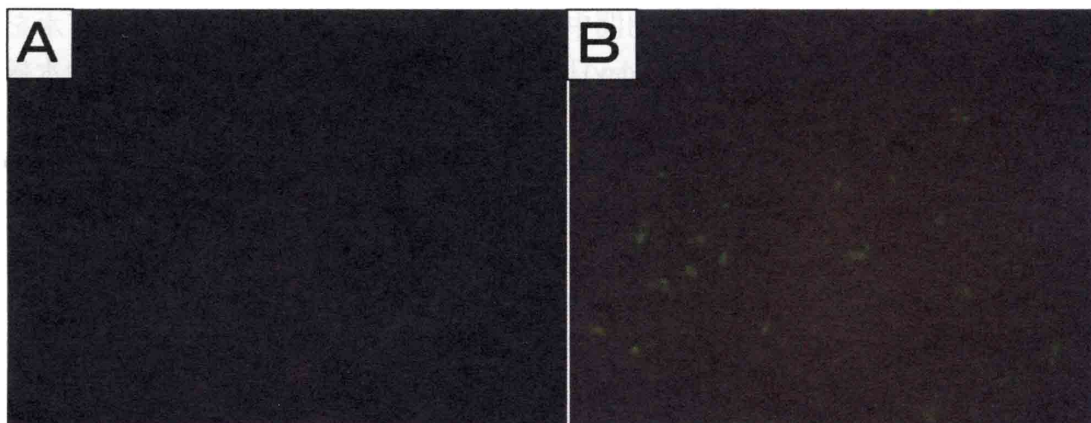


図2. 過ヨウ素酸法およびタンニン酸法で冷水病菌体LPSとビブリオ病菌体を結合させたときの蛍光抗体法によるLPSの結合状態の比較.

A: 過ヨウ素酸法, B: タンニン酸法.