

3 1) 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

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。当場では16種類の新規ワクチンを作製してその効果を調べたところ従来の注射ワクチンを上回るものはなかったが、冷水病菌にアユを浸漬すると一定条件下で冷水病に抗病性を示すことを明らかにした。ゆえに、冷水病ワクチンの開発には基礎的知見の集積が急務であると考えられる。そこで、本研究では冷水病に対するアユの免疫応答を明らかにする一環としてアユ抗体および冷水病菌体に対する抗血清を用いた免疫学的分手法を開発するため、血中アユ抗体および冷水病菌体に対するウサギ抗血清を作製し、ウサギ抗体(IgG)を精製して酵素を標識した。

【方法】 アユ抗体は前報^{*)}と同様にして精製した。供試ホルマリン死菌(FKC)には*F. psychrophilum* SG990302株の培養液に0.3%量のホルマリンを添加して作製した。アユ抗体およびFKCに対するウサギ抗血清はそれぞれタンパク質量で50 $\mu\text{g/ml}$ のIgMおよび630nmの吸光度をpH7.0のリン酸緩衝食塩水(PBS)で0.8に調整したFKCを用いて Freundの不完全アジュバント【Difco】と等量混合して抗原液を調製し、免疫は4週間間隔で2回、体重約2.5kgのウサギの背部皮下に2ml、左右臀部筋肉内にそれぞれ1ml接種して行った。採血は初回免疫6週間後に行い、常法にしたがって血清を分離した。血清は使用まで-85°Cで保存した。IgGはウサギ抗血清10mlからDEAE-Affi Gel Blue【Bio-Rad】カラム(2cm²×30cm)を用いたイオン交換クロマトグラフィーで精製(方法はメーカー指定)した。精製IgGの濃度は280nmの吸光度が1.33のとき1mg/mlとして計算した。精製IgGは次に示すように過ヨウ素酸法で西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)【Sigma:P-8125】を標識した。まず蒸留水に溶解した4mg/mlのHRP溶液3mlに0.1M 過ヨウ素酸Na 600 μl を加え、室温で20min攪拌して糖鎖を酸化させた。その後、HRP溶液は1mM 酢酸緩衝液pH4.5で一晩透析した。同日IgGが24mg含まれる容積の精製標品をポリエチレングリコール(PEG)20,000で8mg/mlになるように濃縮し、10mM 炭酸緩衝液(CBB)pH9.5で一晩透析した。それぞれ透析後、20 μl の0.2M CBB pH9.5を加えたHRP溶液とIgG溶液を混合し、室温(約25°C)で2h攪拌した。つぎに氷中で4mg/mlの水素化ホウ素Na 300 μl と混合して4°Cで2h静置(還元)して反応を安定化させた。その後PBS pH 7.0で一晩透析し、PEG20,000で2mlに濃縮した。この濃縮液をSephacryl S-200に展開し、PBSで溶出させてHRP標識IgGと未反応HRP、精製IgG標品中のトランスフェリンを分離させるためのゲル濾過クロマトグラフィーを行った。

【結果】 ウサギ抗血清からDEAE-Affi Gel Blueを用いたイオン交換クロマトグラフィーで精製した結果を図1に示した。主要なピークが1つ認められ、分画番号14~39をプールし、精製IgGとした。プールした精製標品の280nmの吸光度は0.998、タンパク量で0.75mg/mlであった。精製IgGにHRPを過ヨウ素酸法で標識後、未反応画分をゲル濾過クロマトグラフィーで分画した結果を図2に示した。すなわち、280nmの吸光度で主要なピークが2つ(IgGとトランスフェリン)、同様に405nmでは3つが認められ、両吸光度値の第1ピークが重なっていた。この重なっているピーク(分画番号24~28)をHRP標識ウサギIgGとした。なお、プールした標識IgGのタンパク量は0.50mg/mlであった。

文献) 金辻宏明: アユ血清中抗体 (IgM) の粗精製, 平成 14 年度滋賀県水産試験場事業報告, in press (2003).

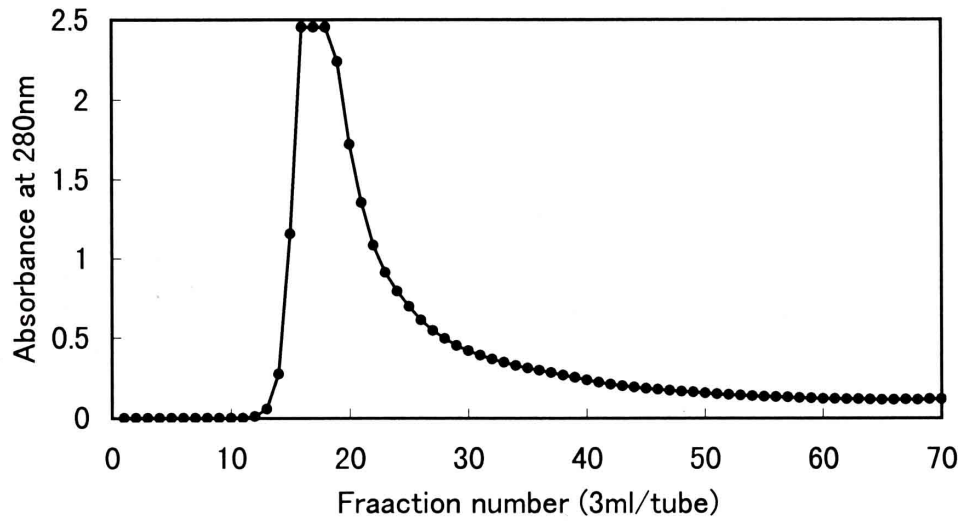


図1. DEAE Affi-Gel Blueを用いたイオン交換クロマトグラフィーによるウサギIgGの精製.

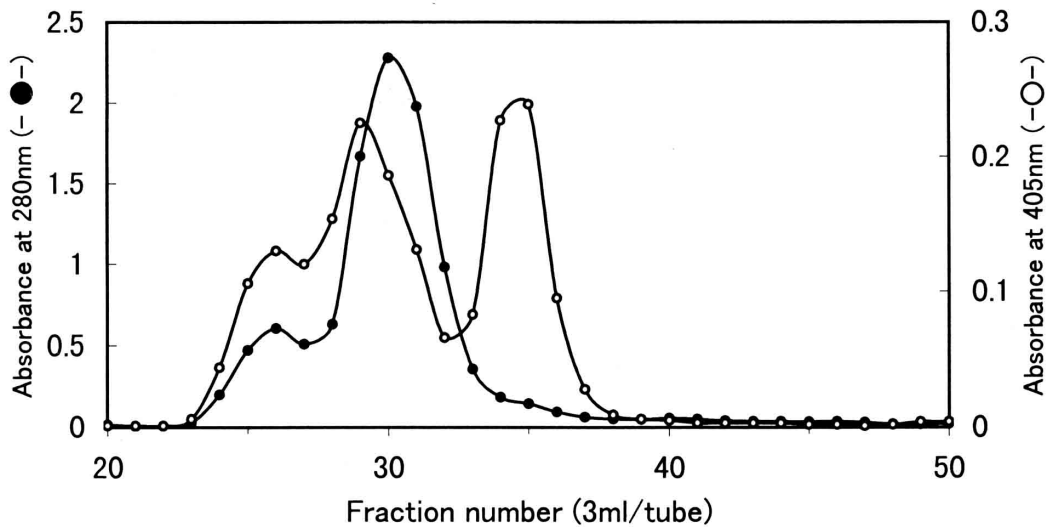


図2. Sephacryl S-200を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによる酵素標識IgG反応物中の未反応酵素の分離.