

3 2) 酵素抗体免疫測定法(ELISA)によるアユ冷水病菌体検出系の作製

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。この対策の一つにワクチンが考えられるが、開発を行うためには基礎的知見が乏しい。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、酵素抗体免疫測定法(ELISA)による冷水病菌体検出系の開発を試みた。

【方法】 用いた供試菌株(SG990302株)および培養方法およびホルマリン不活化菌体(FKC)の作製方法は前報^{文献)}と同様とした。ELISAは次の2種類の方法で行った。**第1検出法**：まず超音波破壊したFKCを10 μ g/mlになるようpH9.5の50mM 炭酸緩衝液(CBB)で希釈し、ELISAプレート【Corning】の各ウェルに100 μ lを加えて4°Cで16h固相化を行った。ウェルの希釈液を除去後、0.05%のTween20【Sigma : P-1379】を含むリン酸緩衝食塩水(PBS)pH7.0(PBS -T)を各ウェルに200 μ l加えて3min、2回振盪させて洗浄(以後洗浄とする)した。洗浄液を除去後、1%のウシ血清アルブミン【Sigma : A-7030】を含むPBS(BSA-PBS)を200 μ l加えて室温で30minブロッキングを行った。2回洗浄後、PBSで0.5、1および2.0 μ g/mlになるように希釈した冷水病菌に対するHRP標識ウサギIgG(HRP-IgG)を各ウェルに100 μ l加えて4°Cで16h静置した。2回洗浄後、次に示す基質溶液を200 μ l加えて室温で30min発色させた。基質溶液は0.1Mクエン酸と0.2M リン酸水素2ナトリウムを混合してpHを5.0に調整したクエン酸緩衝液150mlにo-フェニレンジアミン【和光純薬】60mgを溶解させ、5%過酸化水素水100 μ lを加えて作製した。発色後、6N 硫酸を各ウェルに50 μ lを加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダー【BIO-RAD : Model 550】で490nmの吸光度を測定した。

第2検出法は、まずCBBで10 μ g/mlに希釈した冷水病菌体に対するウサギIgGを各ウェルに100 μ l加えて4°Cで16h固相化後、2回洗浄した。前述と同様にBSA -PBSで30 minブロッキングを行い、2回洗浄した。その後、PBSで10 μ g/mlに希釈した超音波破壊FKCを各ウェルに100 μ l加えて室温で2h反応させた。2回洗浄後、0.5、1または2.0 μ g/mlのHRP-IgGを各ウェルに100 μ l加えて4°Cで16h静置した。2回洗浄後、基質溶液を200 μ l加えて室温で30min発色させた。発色後、6N 硫酸を各ウェルに50 μ lを加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで490nmの吸光度を測定した。

【結果】 2種類の検出法で検出した結果はそれぞれ図1および2に、検出イメージを図3Aおよび図3Bに示した。2種類の検出法の両者ともに固相化した超音波破壊FKCの濃度が5~1000ng/mlでおおむね直線を示した(それ以上のFKC濃度では発色は横ばいとなる)。HRP-IgGの濃度別にみると、第1および2測定法ともFKC濃度が10ng/ml以上でそれぞれほぼ直線を示した。5ng/mlの濃度も含めるとHRP標識IgGの濃度は1 μ g/mlがよいと判断された。

以上の結果から、冷水病菌体を2種類のELISAによって検出すると、HRP-IgGが1 μ g/mlの条件下では5~1000ng/mlの範囲で定量が可能であると考えられた。

文献) 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)。

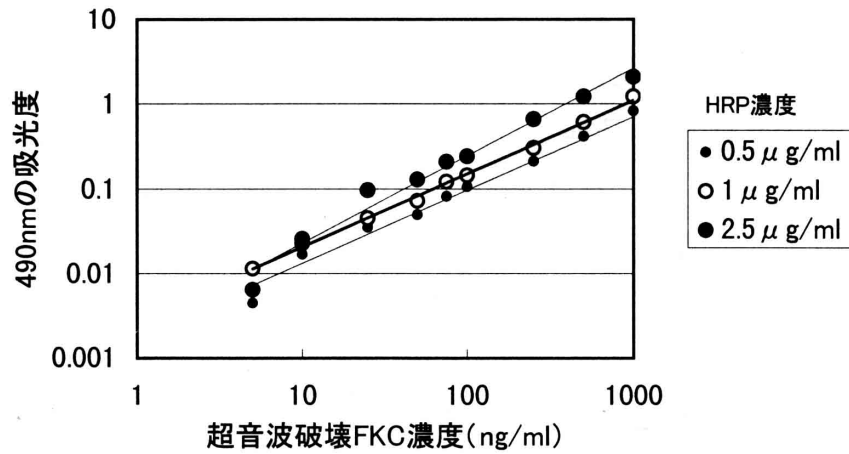


図1. 超音波破壊FKCを固相化し、FKCに対する酵素標識IgGで検出したときの検量線.

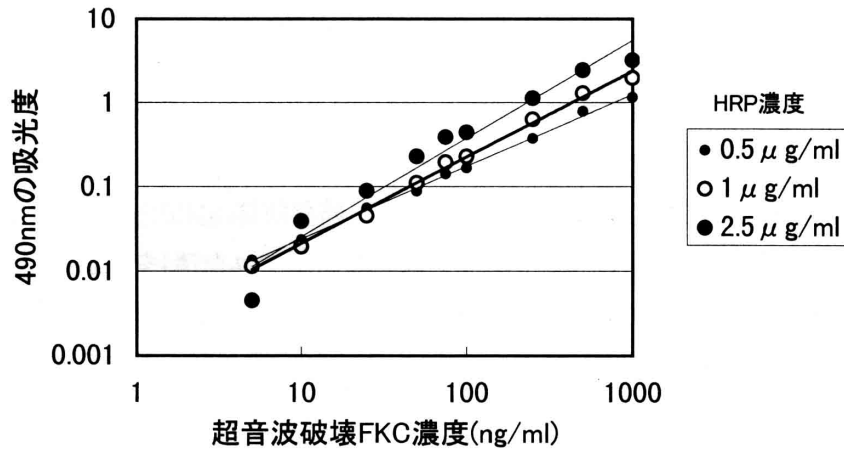


図2. ウサギIgGを固相化したプレートに超音波破壊FKCを反応させ、FKCに対する酵素標識IgGで検出したときの検量線.

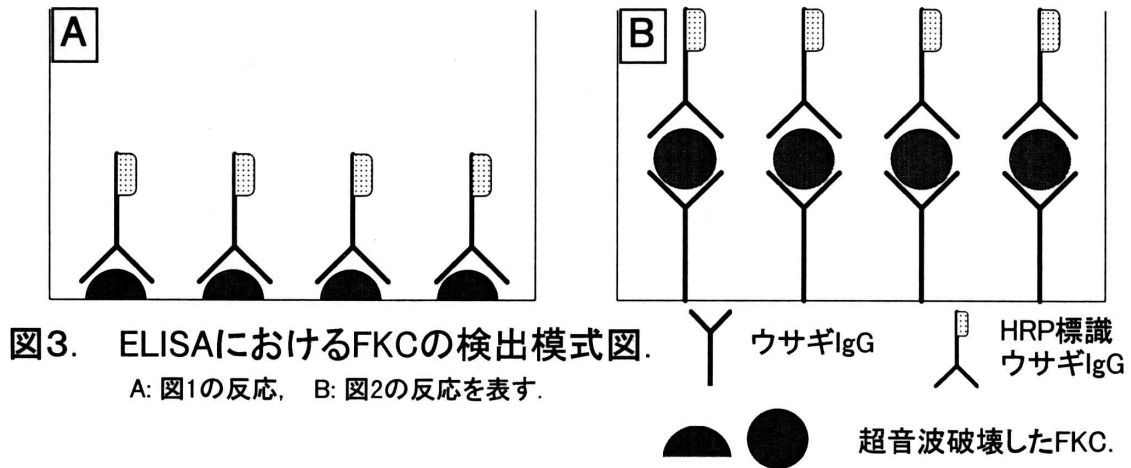


図3. ELISAにおけるFKCの検出模式図.

A: 図1の反応, B: 図2の反応を表す.