豚丹毒菌のELISA用抗原の作製

渡邊隆之¹⁾ 佐藤久聡¹⁾ 小林栄樹¹⁾山岸郭郎²⁾ 斉藤 博¹⁾

(平成2年5月7日受付・平成2年8月24日受理)

Preparation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Antigen for the Enzyme-linked Immunosorbent Assay

TAKAYUKI WATANABE*, HISAAKI SATO, SHIGEKI KOBAYASHI, HIROO YAMAGISHI and HIROSHI SAITO (* Department of Veterinary Microbiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Kitasato University, Sambongi, Towada, Aomori 034)

SUMMARY

Growth agglutination (GA) has been used for detecting the antibodies to swine erysipelas. However, it often takes much time to judge, with additional inconveniences entailed using live cells from the Marienfelde strain, a virulent strain of *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

In this experiment, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used for the detection of the antibodies and examination for several kinds of cell components antigens.

Three antigens with highly specific reactivity in ELISA were selected for measuring the antibodies to *E. rhusiopathiae*. They were ultrasonicated antigen, EDTA treated antigen and alkaline extracted antigen.

Each antigen showed the cut-off absorbency for positive serum, which was the mean absorbency of antibody negative sera, and three times the standard deviation. The values are 0.419 in ultrasonicated antigen, 0.337 in EDTA treated antigen and 0.693 in alkaline extracted antigen, respectively. Ultrasonicated antigen and EDTA treated antigen had a definite correlation between ELISA antibody and GA antibody titers.

These result suggest that the ultrasonicated antigen is useful for detecting the antibodies to swine erysipelas. — **Key Words** : swine erysipelas, ELISA.

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 43, 743~747 (1990)

要 約

豚丹毒の抗体検出法には生菌発育凝集反応 (GA) が行われるが、判定に時間を要する。そこで、抗体の検出法として Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) に着目した。本実験では菌株 (血清型: 5) を用いて、超音波処理菌体抗原、ホモジナイズ菌体抗原、加熱抽出抗原、SDS 可溶化抗原、SDC 可溶化抗原、Triton X-100 可溶化抗原、NP-40 可溶化抗原、アルカリ抽出抗原、EDTA 処理菌体抗原、TCA 処理菌体抗原、尿素処理菌体抗原およびペプチドグリカン抗原を作製した。高い反応特異性がみられた3種の抗原を用い陽性限界値を求めた結果、超音波処理菌体抗原では0.419、EDTA 処理菌体抗原では0.337、アルカリ抽出抗原では0.693となった。アルカリ抽出抗原を除いた2種の抗原を用いたELISA抗体価と生菌発育凝集素価の間には相関が認められた。抗原量および高い反応性等から考察すると、超音波処理菌体抗原が優れていることが示唆された。

¹⁾ 北里大学獣医畜産学部 (十和田市三本木字前谷地 149-2)

²⁾ 北里研究所附属家畜衛生研究所 (柏市松ヶ崎 1139-1)

Key Words : 豚丹毒, ELISA.

豚丹毒は家畜伝染病予防法に制定されており、獣医領域において重要な疾病である。わが国における本病の予防対策としては弱毒生菌ワクチンの接種が広く行われているが、いまだに本病の発生は後をたない。著者らは豚丹毒菌に対する感染防御機構の解析を行うことを目的として、液性抗体検出のための Enzyme-linked im-

munosorbent assay (ELISA) 法を試みた。

材料および方法

使用菌株

ELISA 用抗原として豚丹毒菌、県株（血清型：5）を使用し、生菌発育凝集反応（GA）は豚丹毒菌、Marienfelde 株を使用した。

県株（血清型：5）および Marienfelde 株（血清型：1a）の培養法

保存菌株を 0.3% Tris, 0.1% Tween 80 加, Tryptic Soy 液体培地 pH 7.8（基礎液体培地）5 ml に接種し、37℃ 24 時間 seed culture 後、基礎液体培地 1,000 ml に接種、37℃ 24 時間静置培養し生理食塩液で 3 回遠心洗浄（10,000 ×g, 20 分間）した。

ELISA 用抗原の作製

超音波処理菌体抗原：湿菌 1 g を再蒸留水 10 ml に浮遊、超音波発生装置（Insonator Model 200 M, 久保田製作所）で、200 W, 9 KHz, 30 分間超音波処理し遠心分離（15,000 ×g, 30 分間）後の上清を抗原とした。

ホモジナイズ菌体抗原：湿菌 1 g を再蒸留水 10 ml に浮遊、Universal Homogenizer（日本精機）で 18,000 rpm, 20 分間ホモジナイズし遠心分離（15,000 ×g, 30 分間）後の上清を 1/10 に濃縮した。

加熱抽出抗原：湿菌 1 g を再蒸留水 10 ml に浮遊、100℃ 30 分間加温処理し、遠心分離（15,000 ×g, 30 分間）後の上清を 1/10 に濃縮した。

SDS 可溶性抗原^{9,17)}：湿菌 1 g を 4% SDS 溶液 10 ml に浮遊、37℃ 24 時間攪拌、遠心分離（15,000 ×g, 30 分間）後の上清を 0.02 M NaHCO₃ 溶液で 24 時間透析し、1/10 に濃縮した。

SDC 可溶性抗原：湿菌 1 g を 1% SDC 溶液 10 ml に浮遊、37℃ 24 時間攪拌、遠心分離（15,000 ×g, 30 分間）後の上清を 24 時間透析し、1/10 に濃縮した。

Triton X-100 可溶性抗原⁹⁾：湿菌 1 g を 2% Triton X-100 溶液 10 ml に浮遊、37℃ 24 時間攪拌、遠心分離（15,000 ×g, 30 分間）後の上清を 24 時間透析し、1/10 に濃縮した。

NP-40 可溶性抗原：湿菌 1 g を 0.5% NP-40 溶液 10 ml に浮遊 37℃ 24 時間攪拌、遠心分離（15,000 ×g, 30 分間）後の上清を 24 時間透析し、1/10 に濃縮した。

アルカリ抽出抗原⁹⁾：湿菌 1 g を 0.01 N NaOH 溶液 10 ml に浮遊、4℃ 24 時間攪拌、遠心分離（15,000 ×g, 30 分間）後の上清を 0.01 N HCl で pH 7.2 に修正後、24 時間透析し、1/10 に濃縮した。

EDTA 処理菌体抗原⁹⁾：湿菌 1 g を 1 mM EDTA 溶液 10 ml に浮遊、37℃ 24 時間攪拌、遠心分離（15,000 ×g, 30 分間）後の上清を 24 時間透析し、1/10 に濃縮した。

TCA 処理菌体抗原¹⁰⁾：湿菌 1 g を 5% TCA 溶液 10 ml

に浮遊、37℃ 24 時間攪拌、遠心分離（15,000 ×g, 30 分間）後の上清を 48 時間透析し、1/10 に濃縮した。

尿素処理菌体抗原⁹⁾：湿菌 1 g を 8 M 尿素溶液 10 ml に浮遊、37℃ 24 時間攪拌、遠心分離（15,000 ×g, 30 分間）後の上清を 24 時間透析し、1/10 に濃縮した。

ペプチドグリカン抗原：微生物の化学分類実験法¹⁰⁾に準じた。湿菌を Braun のホモジナイザー（2,820 rpm, B. Braun Melsungen）で 20 分間処理し、5% TCA 溶液、0.1% トリプシン溶液に反応させ遠心洗浄後沈渣を凍結乾燥した。

ELISA 抗原の蛋白質量の測定

作製した ELISA 抗原の蛋白質量は BCA 法¹⁴⁾で測定した。

使用血清

抗体陽性血清：北里研究所付属家畜衛生研究所より分与を受けた陽性血清（11 検体）および本学部付属農場管理の豚（53 検体）で生菌発育凝集素価が 64 倍以上のものをを用いた。なお、生菌発育凝集素価が 128 倍を示した血清の一つを陽性対照とした。

抗体陰性血清：北里研究所付属家畜衛生研究所より分与を受けた SPF 豚（成田 SPF, 50 日齢）の血清（4 検体）および本学部付属農場管理の豚（47 検体）で生後 1 週齢で生菌発育凝集素価が 8 倍以下のものを陰性血清とし、この中から任意に選択した 1 検体を陰性対照とした。

生菌発育凝集反応（GA）

96 well マイクロプレートに基礎液体培地を 0.025 ml、被検血清を 0.25 ml 加えて 2 倍階段希釈し、Marienfelde 株（血清型：1a）菌液を 0.025 ml ずつ加え 37℃ 24 時間培養後、各 well の凝集の有無を西村らの方法¹²⁾で判定し、生菌発育凝集素価とした。

ELISA の術式

抗原の固相化：フラット型 96 well ポリスチレン製マイクロプレート（豊島製作所）を用い 0.05 M 炭酸緩衝液 pH 9.6 で希釈した抗原を 100 μl/well ずつ入れ、4℃ 24 時間固相化した。

マスキング：抗原を捨てた後、再蒸留水で 4 倍希釈した Block Ace（雪印乳業）を 100 μl/well ずつ入れ、37℃ 1 時間マスキングした。

洗浄：0.05% Tween 20 加 PBS⁻（pH 7.2）を用い、ELISA 用プレート洗浄機（Sera Washer-MW 96 SD（Ⅲ）、バイオテック）で 4 回洗浄した。

一次反応：再蒸留水で 10 倍希釈した Block Ace で 100 倍希釈した可検血清（豚）を 100 μl/well ずつ加え、37℃ 1 時間反応させた。

洗浄：0.05% Tween 20 加 PBS⁻ で 4 回洗浄した。

二次反応：再蒸留水で 10 倍希釈した Block Ace で希釈したペルオキシダーゼ標識抗体（Peroxidase con-

図1 超音波処理抗原を用いた抗原および標識抗体の最適濃度の検討

図2 各菌体抽出抗原の最適濃度の比較検討 (超音波, ホモジナイズ, 熱抽出)

jugated IgG fraction rabbit anti-swine IgG, heavy & light chains specific, 26918, Cappel) を $100 \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ加え, 37°C 1 時間反応させた。

洗浄: 0.05% Tween 20 加 PBS⁻ で 4 回洗浄した。

発色: 基質液 (o-Phenylenediamine 0.02 g を 0.1 M クエン酸 - 0.2 M Na_2HPO_4 の 1 : 1 混合液 50 ml に入れ, 30% H_2O_2 0.01 ml を加えた) を $100 \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ加え, 遮光して 25°C 30 分間発色させた。

反応停止: 3 N 硫酸を $100 \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ加え反応を停止させた。

吸光度測定: ELISA リーダー (Microplate Reader Model 3550, Bio Rad) を用い, 490 nm の波長で吸光度 (OD) を測定した。

陽性限界値の設定

超音波処理菌体抗原は $0.1 \mu\text{g}/\text{well}$, アルカリ抽出抗原, EDTA 処理菌体抗原は $10 \mu\text{g}/\text{well}$ 固相化し, 1 : 100 希釈した 37 検体の生菌発育凝集反応陰性血清を用い, 1 : 15,000 のペルオキシダーゼ標識抗体を用いて ELISA を実施した。陽性限界値は, CHENG らの方法³⁾ に従い OD 値の平均値に標準偏差を 3 倍した値を加算し

図3 各菌体抽出抗原の最適濃度の比較検討 (TCA, 尿素, ペプチドグリカン)

図4 各菌体抽出抗原の最適濃度の比較検討 (アルカリ, EDTA, TX-100)

た値とした。

ELISA 抗体価の測定

超音波処理菌体抗原を $0.1 \mu\text{g}/\text{well}$, EDTA 処理菌体抗原を $10 \mu\text{g}/\text{well}$ 固相化し, 1 : 100 より 1 : 25,600 まで 2 倍階段希釈した一次血清および 1 : 15,000 に希釈したペルオキシダーゼ標識抗体を用いて ELISA を実施し, 前述の陽性限界値以上の OD 値を示した血清の最高希釈倍数の逆数を ELISA 抗体価とした。

成績

超音波処理菌体抗原を用いた抗原およびペルオキシダーゼ標識抗体の最適濃度の検討の結果を図 1 に示した。本抗原の最適濃度は $0.1 \mu\text{g}/\text{well}$, ペルオキシダーゼ標識抗体の最適希釈倍数は 1 : 15,000 とし以下の実験に用いた。

1 : 100 希釈一次血清, 1 : 15,000 希釈ペルオキシダーゼ標識抗体を用いた各抗原の最適濃度の検討結果を図 2, 3, 4, 5, に示した。超音波処理菌体抗原, SDS 可溶化抗原, アルカリ抽出抗原, EDTA 処理菌体抗原は陽性血清と陰性血清の OD 値の差が大きかった。

強い抗原性を示した超音波処理菌体抗原 ($0.1 \mu\text{g}/\text{well}$), SDS 可溶化抗原 ($10 \mu\text{g}/\text{well}$), アルカリ抽出

図5 各菌体抽出抗原の最適濃度の比較検討 (SDS, SDC, NP-40)

図6 各菌体抽出抗原の反応特異性 (超音波, アルカリ, EDTA, SDS)

抗原 (10 $\mu\text{g}/\text{well}$), EDTA 処理菌体抗原 (10 $\mu\text{g}/\text{well}$) について反応の特異性を調べた結果を図6に示した。いずれの抗原を用いた ELISA でも高い反応特異性がみられたが, SDS 可溶化抗原では陽性血清と陰性血清の OD 値の差が少なかった。

反応特異性が高い超音波処理菌体抗原, アルカリ抽出抗原, EDTA 処理菌体抗原について陽性限界値を求めた結果を図7に示した。陽性限界値は, 超音波処理菌体抗原が 0.419, EDTA 処理菌体抗原が 0.337, アルカリ抽出抗原が 0.693 となった。

陽性限界値の低い超音波処理菌体抗原, EDTA 処理菌体抗原を用いた ELISA による抗体価と, 生菌発育凝集素価との相関を図8, 9に示した。いずれの抗原を用いても, ELISA 抗体価と生菌発育凝集素価の間には相

図8 ELISA 抗体価と GA 抗体価との相関 (超音波処理菌体抗原)

図7 超音波処理菌体抗原, アルカリ抽出抗原, EDTA 処理菌体抗原を用いた ELISA での陽性限界値の設定

図9 ELISA抗体価とGA抗体価との相関 (EDTA処理菌体抗原)

図10 超音波処理菌体抗原ELISA抗体価とEDTA処理菌体抗原ELISA抗体価との相関

関が認められた。

超音波処理菌体抗原およびEDTA処理菌体抗原を用いたELISA抗体価の相関を図10に示した。2つの抗体価の間には高い相関性が認められた。

考 察

ELISAは、感度、精度、簡便さともに優れており^{18,20,21)}、細菌、ウイルスに対する抗体の検出に広く用いられている^{1-2,6-8,11,15,17)}。豚丹毒菌の抗体調査では、いまだに生菌発育凝集反応(GA)^{5,19)}、死菌凝集反応(AT)¹³⁾が用いられているが、ともに判定には判定者の主観が入り易く、判定に時間がかかるという問題点がある。KIRCHHOFFら⁸⁾、CHIN and EAMENS³⁾、EAMENSら⁴⁾は豚丹毒菌に対する抗体の検出法にELISAを用いている。われわれも豚丹毒菌に対する抗体価測定法としてのELISAに着目し、特にその抗原について検討を加

えた。試験した抗原のうち、超音波処理菌体抗原が微量で最も高い抗原性と特異性を示した。生菌発育凝集素価とELISA抗体価の間には統計学的に高い相関性が認められ本法が生菌発育凝集反応に代わりうる方法である可能性が示唆された。いっぽう、陰性血清のOD値は若干高い傾向が認められた。

ELISA法が生菌発育凝集反応に代わる豚丹毒菌の抗体価の測定方法であることを示すには、更にワクチン接種豚を用いた感染防御能あるいは生菌発育凝集反応との比較試験等の検討が必要と考えられる。

引用文献

- 1) BLACK, J. R., BLACK, W. J., and CANNON, J. G.: *J. Infect. Dis.*, 151, 650~657 (1985).
- 2) CHENG, Y. Q., LEE, L. F., SMITH, E. J., and WITTER, R. L.: *Avian Dis.*, 28, 900~911 (1984).
- 3) CHIN, J. C., and EAMENS, G. J.: *Aust. Vet. J.*, 63, 355~359 (1986).
- 4) EAMENS, G. J., CHIN, J. C., and NICHOLLS, P. J.: *Aust. Vet. J.*, 66, 216~220 (1989).
- 5) HEUNER, F.: *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.*, 70, 341~344 (1957).
- 6) HOHDATSU, T., EIGUCHI, Y., IDE, S., et al.: *Vet. Microbiol.*, 13, 93~97 (1987).
- 7) HOHDATSU, T., EIKI, T., IDE, S., and YAMAGISHI, H.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 48, 1045~1048 (1986).
- 8) KIRCHHOFF, H., DUBENKROPP, H., KERLEN, G., et al.: *Vet. Microbiol.*, 10, 549~559 (1985).
- 9) 小林幹彦: 多糖の分離・精製法. 松田和雄 編, 5~46, 学会出版センター, 東京 (1987).
- 10) 近藤正一, 杉村克治: 日獣誌, 14, 111~135 (1935).
- 11) MAYER, S., and BRUNNER, H.: *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. infektiöskr. Hyg. I. Orig. A.*, 248, 469~478 (1981).
- 12) NISHIMURA, Y., SATO, U., HANAKI, T., and KAWASHIMA, H.: *Jpn. J. Vet. Med.*, 22, 241 (1960).
- 13) 瀬戸健次, 安藤敬太郎, 西村 豊, ほか: 動薬検年報, 4, 54~62 (1965).
- 14) SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., et al.: *Anal. Biochem.*, 150, 76~85 (1985).
- 15) TAKAI, S., KAWAZU, S., and TSUBAKI, S.: *Am. J. Vet. Res.*, 46, 2166~2170 (1985).
- 16) TALKINGTON, F. D., KLEVEN, S. H., and BROWN, J.: *Avian Dis.*, 29, 53~70 (1985).
- 17) 内田欣哉: 微生物の化学分類実験法. 駒形和男 編, 5~25, 学会出版センター, 東京 (1982).
- 18) VOLLER, A., BIDWELL, D. E. and BARTLETT, A.: *Bull. World Health Organ.*, 53, 55~65 (1976).
- 19) WELLMANN, G.: *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, 61, 1~19 (1954).
- 20) WESTCOTT, R. B., FARRELL, C. J., and SHEN, D. T.: *Am. J. Vet. Res.*, 45, 178~179 (1984).
- 21) 保井孝太郎: 単クローン抗体ハイブリドーマとELISA. 岩崎辰夫ほか著, 144~169, 講談社サイエンスフィク, 東京 (1983).