ELISA によるブリ血清中の抗 *Pasteurella piscicida* LPS 特異抗体の定量

松原 明政・三原 茂・楠田 理一

(1984 年 11 月 14 日受理)

Quantitation of Yellowtail Serum Antibody Specific for *P. piscicida* LPS Using the ELISA Technique

Akimasa MATSUBARA,*¹ Shigeru MIHARA,*¹ and Riichi KUSUDA*²

Quantitation of antibody (Ig) in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* serum against *P. piscicida* LPS was carried out by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Pure LPS extracted from *P. piscicida* was immobilized on Polystyrene bead (LPS-bead). Diluted yellowtail serum was added to the LPS-bead complex. The yellowtail antibody-coupled LPS-bead was incubated with anti-yellowtail Ig rabbit Fab' conjugated with peroxidase and enzyme activity bound on the bead was measured.

Using 3 sera differing in agglutination titer from yellowtail immunized with formalin-killed *P. piscicida*, within assay variation was small showing a mean coefficient of variation of 4.4 to 13.7%.

Specific antibody in sera from non-immunized yellowtail was determined. The result showed that the range of specific antibody concentration for 23 non-immunized fish was 6.0 to 30.0 $\mu\text{g/ml}$. In sixty-five immunized by immersion the specific Ig concentration was 5.9 to 112.5 $\mu\text{g/ml}$ and in 25 fish intraperitoneally immunized the specific Ig concentration was 97.0 to 1,030.0 $\mu\text{g/ml}$. There was high correlation ($r=0.944$) between the concentration of specific antibody and agglutination titer of the sera against formalin-killed *P. piscicida* cells.

著者らはブリの類結節症原因菌 *Pasteurella piscicida* のワクチンの研究を行っているが、その免疫防御効果を判定するためには、抗体価を調べる重要な手段となる。

一般に魚類血清中の抗体価の測定には、凝集反応法が用いられている。しかし、この測定法は簡便ではあるが、小型魚では測定に必要な血清量が得られなかったり、菌体抗原によっては非特異的な凝集がみられることがあり、判定を困難にする場合が多い。¹⁾ そこで、著者ら²⁾ は高感度な酵素免疫測定法 (ELISA) を用いて、ブリ血清中の免疫グロブリン (Ig) を定量すれば、免疫応答の観察ができるのではないかと考えて、正常な 10 から 110 g のブリ血清中の Ig を測定した。その結果、ブリ血清中の Ig は 0.10~1.84 mg/ml の範囲となり、個体差の大きいことが明らかとなった。したがって、Ig 量の個体差が大きいブリ稚魚のような場合には、抗原に対

する特異的な抗体だけを定量することが必要であると考えられる。哺乳類では ELISA を用いて特異抗体を測定した数多くの報告があり、³⁻⁸⁾ 本測定法は凝集反応法と較べて感度においてすぐれていることが知られている。魚類ではニジマス血清中の *Aeromonas salmonicida* および *Vibrio anguillarum* に対する本法による抗体の検出の報告があり、その有用性が示唆されている。⁹⁾

そこで、本報では ELISA を用いて *P. piscicida* に対する特異抗体の定量を試みた。この菌体の表層抗原はおもに LPS と考えられるので、LPS を固相化してブリ血清中の特異抗体 (Sp. Ig) を定量した。

材料および方法

LPS の精製 1.5% 食塩加 BHI (Difco) ブイヨン培地に、前培養した *P. piscicida* 5866 株を移植し、25°C で 48 時間培養した。培養液を遠心して集菌後、生理食

*¹ アース製薬株式会社技術部 (Technical Research Department, Earth Chemical Company Ltd., 3218, Sakoshi, Ako, Hyogo 678-01, Japan).

*² 高知大学農学部水産病理学講座 (Fish Disease Laboratory, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783, Japan).

塩水で3回洗浄して得られた菌体から、Westhal 法によって LPS 抽出液を得た。抽出液を $80,000\times g$ で6時間遠心分離し、沈殿物を可溶化したのち、 $105,000\times g$ で3時間遠心分離を行い、セタブロン (Cetavlon: Cetyltrimethylammonium Bromide) で処理して蒸留水に透析後、凍結乾燥を行って LPS を精製した。

LPS 固相化ビーズの作製 LPS を生理食塩水に溶かした $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 溶液 180 ml に直径 6.4 mm のポリスチレンビーズ (和光純薬) を加え、吸引しながら1昼夜反応させた。生理食塩水で1回ビーズを洗浄したあと、残っているビーズ上の吸着活性を阻止するために、生理食塩水で希釈した2%馬血清を加え、3時間反応させた。そして、0.1%牛血清アルブミン、 0.14 M 食塩および0.001%チメロサルを含む pH 7.4 の 0.05 M リン酸緩衝液 (緩衝液 A) でビーズを3回洗浄したのち、緩衝液 A 中に 4°C で保存した。

ブリ血清 ワクチン未処理、*P. piscicida* ホルマリン不活化菌体ワクチンで浸漬処理および同ワクチン腹腔内処理して免疫した3種のブリ (*Seriola quinqueradiata*) から常法にしたがって血清を分離し、Sp. Ig を定量した。なお、分離した血清は0.2%になるようにアジ化ナトリウムを添加し、 4°C で保存して定量に供した。

未処理魚には飼育初期の約 30 g の小型魚23尾を用いた。浸漬処理には約 90 g のブリを使用し、1魚体あたりホルマリン不活化菌体ワクチン 1×10^8 細胞海水懸濁液に1回浸漬して3週間後に採血したもの20尾、1回浸漬後2週間後に再度浸漬して1週間後に採血したもの23尾、1週間ごとに3回浸漬して1週間後に採血したもの22尾から血清を分離した。腹腔内処理には約

90 g のブリを使用し、ホルマリン不活化菌体ワクチンを腹腔内に1週間間隔で4回注射して1週間後に採血したもの25尾から血清を分離した。なお、注射量は3回目まではそれぞれ1魚体あたり 1×10^8 細胞、4回目には1魚体あたり 5×10^8 細胞とした。

特異抗体の精製 2 ml の抗 *P. piscicida* ブリ血清に $5\times 10^{11}/\text{ml}$ ホルマリン不活化菌体浮遊液 2 ml を加え、 25°C で2時間反応させた。次にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で菌体の洗浄を10回繰り返し、最後の沈殿に 3 M 尿素を含む PBS 溶液を加え懸濁後、 4°C で1時間反応させた。反応後、尿素を除くために、ただちに Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals) に通して Sp. Ig を精製した。なお、この標品の純度は抗ハマチ血清ウサギ血清 (HVR-113) を用いて、免疫電気泳動法で分析した。また、標品の特異性を検討するために、この標品を *P. piscicida* ホルマリン不活化菌体で吸収後、遠心して上清中の Ig および吸収前の Ig を定量した。そして、両者の Ig 量の差から標品中の Sp. Ig を算出した。Ig 量の測定は前報²⁾の方法にしたがって行った。

ELISA $12\times 75\text{ mm}$ のポリスチレンチューブを用いて、緩衝液 A で1チューブあたり $4.8\sim 1,200.0\text{ ng}$ の Sp. Ig 2倍希釈系列をつくった。また、同時に緩衝液 A で300から9,200倍に適当に希釈したブリ血清検体を用意した。液量はすべて1チューブあたり $300\text{ }\mu\text{l}$ とした。そして、これらのすべてに LPS 固相化ビーズを1個加え、 37°C で2時間反応させた (第1反応)。PBS でビーズを3回洗浄し、次に緩衝液 A を $200\text{ }\mu\text{l}$ 、パーオキシダーゼ標識抗ブリ Ig ウサギ Fab' (Fab'-HRP) を $100\text{ }\mu\text{l}$ 加え、 37°C で2時間反応を行った (第2反応)。

Fig. 1. Effect of temperature on yellowtail antibody binding to LPS-bead after 2 h incubation. Fab'-HRP binding to antibody-coupled LPS-bead was performed for 2 h at 37°C . Three sera differing in agglutination titer were diluted 300-fold and Ig amount in $300\text{ }\mu\text{l}$ was measured by ELISA.

Fab'-HRP は前報²⁾ で用いたものと同じものを使用した。PBS で 3 回洗浄後、それぞれのビーズを別の新しいチューブに移し、酵素反応を行った。すなわち、pH 5.0 の 0.2 M クエン酸-リン酸 2 ナトリウム緩衝液に過酸化水素およびオルトフェニレンジアミン (*o*-phenylenediamine) をそれぞれ 0.005%, 0.25% になるように添加し、その 500 μ l を加え 25°C で 30 分間反応を行った (第 3 反応)。そして、3 ml の 1 N 硫酸を加え反応を停止し、492 nm で吸光度を測定した。

結 果

抗 *P. piscicida* ブリ血清から得られた Sp. Ig 標品の

純度を免疫電気泳動分析した結果、1 本の沈降線だけが形成され、Ig 以外のブリ血清成分は認められなかった。また、その特異性を検討した結果、標品中の全 Ig 量の約 91% が *P. piscicida* に対する抗体であることがわかった。

ELISA を用いてブリ抗血清 A, B, C, 3 検体をそれぞれ 300 倍に希釈後、LPS 固相化ビーズ上へのブリ Sp. Ig の結合の温度効果について検討を行った。その結果、Fig. 1 に示すように A, B, C 3 検体とも 492 nm の吸光度は 37°C が最も大きくなり、Sp. Ig の反応性が最も高くなることがわかった。次に同様に 3 検体を用いて時間の検討を行った。その結果、Fig. 2 に示すように反応

Fig. 2. Effect on time on the amount of yellowtail antibody binding to LPS-bead after incubation at 37°C. Fab'-HRP binding to antibody-coupled LPS-bead was performed for 2 h at 37°C. Three sera were diluted 300-fold and Ig amount in 300 μ l was measured by ELISA.

Fig. 3. Concentration comparison of purified yellowtail antibody to yellowtail antiserum showing Fab'-HRP binding to antibody-coupled LPS-beads. Agglutination titer of serum used here was 16,384.

開始後 30 分までにブリ血清中の抗体の多くは、ビーズ上の LPS に結合し、その後の反応はゆるやかに進んだ。したがって、以後の Sp. Ig の測定は第 1 反応、第 2 反応とも 37°C、2 時間で行った。

Table 1. Precision of ELISA for antibody against *P. piscicida*

	Yellowtail serum		
	A	B	C
Antibody ($\mu\text{g/ml}$)	19.2	60	470
	19.2	56	480
	20.5	62	472
	18.0	60	510
	20.7	68	570
	19.2	60	570
	19.2	54	570
	20.5	58	605
	20.6	63	540
	20.8	59	570
	19.0	62	615
	20.7	56	800
	19.0	60	617
	19.3	62	570
	18.7	62	618
Mean	19.6	60.1	571.8
S.D.* ¹	0.87	3.3	78.7
C. V.* ²	4.4	5.5	13.7

*¹ Standard deviation.

*² Coefficient variation (S.D./Mean X 100).

次に本測定系を用いて、精製した Sp. Ig の標準曲線およびブリ抗血清の希釈曲線を Fig. 3 に示した。Sp. Ig は 1 チューブあたり 4.8~1,200 ng までの 2 倍希釈系列を作製したときの吸光度の値を、ブリ抗血清は 300~73,600 までの 2 倍希釈系列を作製したときの吸光度の値をプロットした。本測定系の最小検出感度は 1 チューブあたり約 10 ng であった。また、用いたブリ抗血清の凝集抗体価は 16,384 であった。

次に測定系の精度を検討するために、ブリ抗血清 A, B, C 3 検体を 300 倍に希釈後、各検体について 15 回測定し、血清中の Sp. Ig を算出した。そして、各検体の測定における偏異係数 (C.V.) を求めた。その結果、Table 1 に示すように血清 A, B, C の平均 Sp. Ig はそれぞれ 19.6 $\mu\text{g/ml}$, 60.1 $\mu\text{g/ml}$, 571.8 $\mu\text{g/ml}$ であった。また、そのときの C.V. は検体 A では 4.4%, B では 5.5%, C では 13.7% となり、各検体とも測定値の変動幅が小さいことがわかった。

次に非免疫ブリおよび実験的に *P. piscicida* 菌体で免疫したブリから分離した 113 検体の血清について、Sp. Ig を定量を定量するとともに、凝集抗体価を測定し、その相関性について検討した。凝集抗体価の測定はマイクロタイター法を用い、反応は 25°C で 2 時間さらに 4°C で 12 時間放置後、その凝集像を観察した。その結果を Fig. 4 に示した。Sp. Ig は 5~1,030 $\mu\text{g/ml}$, 凝集抗体価は <4~32,768 の範囲にあった。両者間の相関係数は

Fig. 4. Correlation between antibody concentration (ELISA) and agglutination titer in yellowtail sera.

Table 2. The range of antibody concentration and agglutination titers against *P. piscicida* in sera of yellowtail

Treatment	Number of Samples	Agglutination titer (1:)	Antibody ($\mu\text{g/ml}$)
Non-immunized	23	<4(<4)* ³	6.0–30.0 (15.3)* ³
Immunized			
One immersion* ¹	20	4–32 (8.3)	5.9–42.0 (18.0)
Two immersion	23	4–128 (14.7)	11.5–105.0 (33.8)
Three immersion	22	8–256 (41.1)	12.8–112.5 (43.0)
Four intraperitoneal injection* ²	25	512–32,768 (7,181.2)	97.0–1,030.0 (587.6)

*¹ Fish were immersed for three minutes with ten liter of 1×10^9 cells/ml per one immersion.*² Fish were immunized with one injection of 5×10^9 cells/fish after three injections of 1×10^9 cells/fish.*³ Figures in parentheses indicate geometric mean.

$r=0.944$ となり、きわめて高い相関係性を示した。また、Table 2 に示すように、非免疫群の血清 Sp. Ig および凝集抗体価の平均はそれぞれ $15.3 \mu\text{g/ml}$, <4 であった。それに対し、浸漬 1 回免疫群では、それぞれ $18.0 \mu\text{g/ml}$, 8.3, 2 回免疫群では $33.8 \mu\text{g/ml}$, 14.7, 3 回免疫群では $43.0 \mu\text{g/ml}$, 41.1 であった。そして、腹腔内注射免疫群では、 $587.6 \mu\text{g/ml}$, 7181.2 の高い値を示した。

考 察

ブリの血清 Ig の凝集抗体活性は $20 \sim 25^\circ\text{C}$ で最も高く、 $37 \sim 45^\circ\text{C}$ では低下することが知られている。¹⁰⁾ 今回の ELISA における Sp. Ig の LPS への結合は 20°C や 25°C よりも、 37°C において高い反応性が認められた。抗体は IgM 様の 4 量体であるが、凝集を引き起こすための反応と、単に固相 LPS への結合反応とは結合の様式が異なるのではないと思われる。また、反応に用いた抗原および抗体の量が ELISA と凝集反応法とではかなり異なるので、それが原因となるかもしれない。LPS 固相上へのブリ Sp. Ig の結合は、反応開始後 30 分までにその大部分が結合し、反応はそのあと 4 時間後までゆるやかに進んだ。そこで、測定感度や測定誤差を考慮し、測定時間を短縮するために第 1 反応は 2 時間とした。第 2 反応は前報²⁾の結果にしたがい、 37°C で 2 時間とした。

ブリ血清中の *P. piscicida* LPS に対する Sp. Ig の測定は、精製したブリ Sp. Ig の標準曲線を作成し、同時に測定した検体の 492 nm の吸光度から算出するが、定量的な測定には標準曲線とブリ抗血清の希釈曲線が相関することが必要である。われわれの行った結果は標準曲線の 1 チューブあたり $20 \sim 400 \text{ ng}$ の範囲では、十分にその条件を満たしているものと考えられる。免疫ブリ血清 3 検体中の Sp. Ig の定量を各検体につき 15 回行ったところ、各検体測定の偏異係数 (C.V.) は 4.4%, 5.5%, 13.7% となり、良好な結果が得られた。この場合の

ELISA の吸光度はそれぞれ 0.085, 0.155, 0.356 で、チューブ当たり約 20 mg, 60 mg, 570 mg に相当する。C.V. が 13.7% と他の 2 検体よりやや大きい理由は、おそらく標準曲線の測定域からややずれているためと考えられる。

菌体抗原に対する抗体の測定としては凝集反応法が一般的であるが、測定感度は低く凝集像もさまざまで、正確な抗体価を測定することはむずかしい。マイクロタイター法による凝集抗体価の測定は、血清量として $20 \sim 25 \mu\text{l}$ 測定時間で十数時間を要した。今回の ELISA による結果では $1 \mu\text{l}$ 以下の血清量で、約 5 時間後には測定が可能であり、凝集反応法よりもすぐれていると考えられる。正常ブリにホルマリン不活化菌体を腹腔内注射あるいは浸漬による免疫を行った場合の Sp. Ig は未処理魚の測定値に比べ、明らかに差異がみられた。また、浸漬免疫においては 1 回から 3 回まで処理回数を増すことによって、Sp. Ig が増加することが認められた。したがって、本測定系は特に浸漬法による比較的低い免疫応答レベルでの測定に有用であると考えられる。

ELISA は哺乳類の細菌感染症や寄生虫症の免疫学的な診断や研究に広く用いられている。哺乳類の感染症における抗原に対する抗体を ELISA で測定した場合の測定感度については、CARLSSON ら⁹⁾が腸チフスの診断のために *Salmonella* の O 抗原に対する抗体測定を行った報告があり、ELISA が凝集反応法よりも 100 倍以上感度において高いとしている。

今回われわれは LPS を固相化し、それに対するブリ血清中の抗体を測定した。その結果、本法による測定値と凝集抗体価との間に高い相関性が示されたことから、本法は凝集反応法ではむずかしいと思われる体表粘液や腸管粘液中に産生される抗体の測定にも有用であると考えられる。また、*P. piscicida* LPS の代わりにほかの病原菌の表層抗原や、種々の可溶性抗原を固相化すれば、その抗原に対する抗体の測定が可能であると思われる。

特に細菌の中で A-layer に関係すると思われる自己凝集を示すものについては、凝集反応法では測定が困難であるが、ELISA による測定は可能である。¹⁾ したがって、本法は感度においても、また応用範囲の広さからも、凝集反応法よりもすぐれており、ブリの特異抗体の定量法としてより適していると思われる。

文 献

- 1) T. K. KORHONEN, H. LEFFER, and C. S. EDEN: *Infect. Immun.*, **32**, 796-804 (1981).
- 2) A. MATSUBARA, S. MIHARA, and R. KUSUDA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 921-925 (1985).
- 3) H. E. CARLSSON, A. A. LINDBERG, S. HAMMARSTRÖM, and Å. LJUNGGREN: *Int. Archs Allergy appl. Immun.*, **48**, 485-494 (1975).
- 4) A. M. SVENNERHOLM: *Int. Archs Allergy appl. Immun.*, **49**, 434-452 (1975).
- 5) K. CRANFORS: *J. Clin. Microbiol.*, **9**, 336-341 (1979).
- 6) C. E. FARSHY, G. C. KLEIN, and J. C. FEELEY: *J. Clin. Microbiol.*, **4**, 327-331 (1978).
- 7) G. C. SAUNDERS and E. H. CLINARD: *J. Clin. Microbiol.*, **3**, 604-608 (1976).
- 8) M. J. BLASER and D. J. DUNCAN: *Infect. Immun.*, **44**, 292-298 (1984).
- 9) H. CHART, T. W. PEARSON, and T. J. TRUST: *J. Immunol. Methods*, **68**, 19-24 (1984).
- 10) 福田 穰・楠田理一: 日水誌, **48**, 921-926 (1982).