

V-13

大腸菌線毛抗原のラテックス凝集反応による検出

(高橋欣也, 三井正朗, 神岡 稔 (日生研))

哺乳豚の下痢症の起因菌となる毒素原性大腸菌 (ETEC) は、多くの場合特定の線毛抗原 K99, K88あるいは 987P を保有する。これらの ETEC を迅速に同定する方法としてラテックス凝集反応が応用できるかどうかを検討した。

ラテックス試薬は、K99, K88 および 987P 保有菌でそれぞれ免疫した家兎抗血清を、K99 と K88 は相互に、987P については 18℃ 発育菌で吸収後、精製して得た γ -グロブリン分画をラテックス粒子に吸着させて作製した。供試菌株は、いろいろな条件で発育させ、その浮遊液及び菌体抽出液とそれらの希釈系列を反応に用いた。

ラテックス凝集反応の術式は次のとおりである。供試材料 25 μ l をガラス板上にのせ等量のラテックス試薬を滴下後、2 分間ゆっくりとプレートを傾けて両者を

混和して凝集の有無及びその程度を判定した。比較のため、市販の抗線毛血清による凝集反応も行った。陽性のものについては完全凝集するまでの時間も記録した。

その結果、各線毛抗原に対する特異性は高くかつ強い凝集を示し反応時間も短かかったが、菌体抗原による反応及び非特異反応はほとんど認められなかった。また線毛保有菌の浮遊液の希釈系列では、菌数 10^7 cfu/ml まで凝集した。更に培養条件による線毛抗原の発現の差が観察された。抗線毛血清による凝集反応で反応した菌はラテックス凝集反応で強くかつ短時間で凝集した。

以上の成績から、ラテックス凝集反応は線毛抗原証明法として応用できるものと思われる。なお下痢便中の線毛抗原の検出については現在検討中である。

V-14

豚大腸菌サブユニットワクチンに関する研究

1. 線毛の精製および特異抗血清の作成

葛谷 光隆、池田 礼子、石井 博、横山 英明、○児玉 義勝 (ゲン・コーポレーション 岐阜ラボ)

豚の早発性大腸菌症の予防には、抗線毛抗体を初乳を介して仔豚に与える、受身免疫が有効であると考えられている。これまで、不活化全菌体ワクチンによる予防効果が報告されているが、われわれは、より確実で安全であると思われる、線毛抗原を主体とするサブユニットワクチンの検討を目的として、線毛の精製および特異抗血清の作成を行った。

線毛の精製には、米国のサルズベリ社より分離された O157:K88(LT)、O101:K99(ST) および O9:K103 (987P-ST) の 3 種の菌株を用いた。それぞれの菌を MINCA 培地で増殖させて回収し、ホモゲナイズ処理後、遠心した上清を粗抽出液とした。K88 および K99 は、粗抽出液を限外濾過により濃縮後、Sephacryl S300 を用いたゲル濾過および DEAE Sephadex を使用したイオン交換クロマトグラフィにより精製された。987P は Isaacson ら (1981) の方法に従い、塩化マグネシウムを含む緩

衝液で数回沈殿をくり返すことにより精製した。精製 K88、K99 および 987P の分子量は SDS ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE) により、それぞれ 25 kd、19 kd および 20 kd と測定された。

次に、精製線毛をウサギに免疫し特異抗血清を作成した。抗血清の特異性について、寒天ゲル内沈降反応により検討したところ、それぞれの線毛抗原と単一の沈降線を形成し、交差反応は見られなかった。また、ウェスタンブロッティングを行ったところ、線毛抗原の部分に特異的な発色が見られた。

さらに、精製線毛をより簡便に得るため、特異抗体を用いてアフィニティーカラムを作成し、粗抽出液からの精製を検討した。その結果、前述の方法に比較して多量の精製線毛が容易に得られることがわかった。