



19867

豚大腸菌サブユニットワクチンに関する研究

2. 線毛抗原の定量化

○葛谷 光隆、池田 礼子、児玉 義勝 (ゲン・コーポレーション 岐阜ラボ)

線毛抗原を主体とするサブユニットワクチンでは、抗原量の測定および調節による品質管理が必要である。そこで演者らは迅速、簡便で感度の高いELISA法を用い、線毛抗原の定量化を確立し、それを用い種々の抽出条件における抗原量を測定したので報告する。

ELISA法には、サンドイッチ法を用いた。固相およびペルオキシダーゼ標識抗線毛抗体には、線毛特異抗血清の γ -グロブリン分画を使用した。精製線毛をスタンダードとして定量化を行ったところ、K88およびK99とも、 $0.097 \mu\text{g/ml} \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$ の範囲において測定可能であった。

そこで次に、菌体からの線毛の抽出条件を抽出方法、および緩衝液組成の両面から検討した。抽出方法としてホモゲナイズ、 60°C 30分の加熱および100w5分の超音波処理を行った。緩衝液は0.1M トリス緩衝液 pH8.0を使用し、それに塩化ナトリウムを1Mに加えたもの、およびTween80を0.01%

に加えたものを用い、9種類の異なった抽出条件を比較した。抽出条件の評価には、ELISA法によって測定した線毛抗原量、および比活性(抗原量を全体の蛋白量で割った値)を用いた。

その結果、K88の抽出量は0.01% Tween80加トリス緩衝液で超音波処理した場合が最も多く、 10^{12} の菌体より 3.5mg の線毛が抽出された。一方、比活性ではいずれの緩衝液においても、ホモゲナイズ処理が0.2~0.4と他の処理(0.02~0.12)に比べて高く、不純タンパクの混入が少ないことがわかった。K99では、1M塩化ナトリウム加トリス緩衝液で熱処理した場合に、 8×10^{11} の菌より 1.7mg と最も多くの線毛が抽出され、比活性も0.07であり他の場合(0.01~0.03)に比較して高かった。現在987Pの抗原定量化用ELISA、および抽出条件による差異について検討中であり、その結果もあわせて報告する。

V-16

子牛大腸菌ワクチンの感染防御試験

○阪野哲也、清水幹夫、山本純也(全農家衛研) 古谷 武(日ワク)

子牛大腸菌症予防を目的として、1-ロツバ等で使用されている大腸菌不活化ワクチン(RM社IIFA研究所: K99, FY及び31Aの因子を含有、第101回本学会発表)の有効性を攻撃試験によって確認した。
感染防御試験: 免疫群では、分娩3~5週間前の妊娠牛(ホルスタイン種)に本ワクチン1ドーズ(5ml)を皮下注射した。出生後3時間までに子牛に初乳2,000mlを給与し、4時間経時に各菌株の培養液(10^{10} CFU/ml) 200mlを経口攻撃し、1週間観察した。非免疫群の母牛から生れた子牛にも同様な処置をした。わが国での分離大腸菌のK99+ST₁株(B/243)、31A株(B/2468)及びFY株(B/734)の単独または混合攻撃を行った。非免疫群の子牛(2頭)はK99+ST₁株攻撃により中~重度の下痢が発症したが、死亡はなかった。31A株(2頭)またはFY株(1頭)の単独攻撃では子牛は無症状に推移した。K99+ST₁株に31A株(1頭)又は31A株とFY株(3頭)を混合攻撃した場合には、子牛は激しい下痢を呈し、敗血症に陥り、2~4日後に瀕死状態になったので、屠殺解剖した。一方、免疫群の

子牛(4頭)はこれらの攻撃に対して無症状に推移し、本ワクチンが有効であることが示された。

抗体価: K99, FY及び31Aの凝集抗体価は、免疫群の母牛血清と初乳及び子牛血清中で6~10(log₂)と上昇していた。非免疫群ではいずれも3(log₂)であった。
攻撃菌株の排菌: 前腸便への排菌は非免疫群の子牛では7日以上続いたが、免疫群では4日以内であった。

攻撃菌株の牛体内分布: 4頭の瀕死子牛を屠殺し、菌株の臓器内分布を調べた。K99+ST₁株は消化管内(十二指腸、空腸、回腸)に、FY株と31A株は心、肝、腎、心臓、腸間膜リンパ節に優勢に検出された。菌株の検出は抗血清(HIA法)によるスライド凝集反応で行った。

以上から、FY株、31A株はK99+ST₁株と混合攻撃した場合に、子牛でのK99+ST₁株による発症を重篤化し、また敗血症をおこさることが小さされた。そして、本ワクチンはこれらの攻撃を予防する効果のあることが確認された。