



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Mycoplasma hyopneumoniaeの種特異抗原に関する研究
Author(s)	森, 康行
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第4007号
Issue Date	1991-12-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3058655
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49745
Type	doctoral thesis
File Information	000000245524.pdf



Mycoplasma hyopneumoniae の
種特異抗原に関する研究

森 康 行

①

Mycoplasma hyopneumoniae の種特異抗原に関する研究

第1章 *Mycoplasma hyopneumoniae* の種特異抗原に関する研究

要旨

材料と方法

結果

第1項 マイコプラズマ感染後の可溶性

第2項 肺由来マイコプラズマ感染後の血清中の抗体

第3項 *M. hyopneumoniae* 感染動物血清中の抗体に関する研究

考察

第2章 *M. hyopneumoniae* に対するモノクローナル抗体の作成

要旨

材料と方法

結果

第1項 モノクローナル抗体のスクリーニング

第2項 抗 *M. hyopneumoniae* モノクローナル抗体の特性

第3項 *M. hyopneumoniae* 感染動物血清中のモノクローナル抗体

の検出

考察

第3章 抗 *M. hyopneumoniae* モノクローナル抗体を用いた豚マイコプラズマ肺炎

森 康 行

要旨

材料と方法

Mycoplasma hyopneumoniaeの種特異抗原に関する研究

緒言

第1章 Mycoplasma hyopneumoniae抗原の分析

要旨

材料と方法

成績

第1項 マイコプラズマ菌体成分の可溶化

第2項 豚由来マイコプラズマ種間の交差反応性の分析

第3項 M. hyopneumoniae 実験感染豚における抗体応答の分析

考察

第2章 M. hyopneumoniae に対するモノクローナル抗体の作出

要旨

材料と方法

成績

第1項 モノクローナル抗体のスクリーニング

第2項 抗M. hyopneumoniaeモノクローナル抗体の性状解析

第3項 M. hyopneumoniae 発育阻止活性を有するモノクローナル抗体
の性状

考察

第3章 抗M. hyopneumoniaeモノクローナル抗体を用いた豚マイコプラズマ肺

炎の血清学的診断と分離菌株の迅速同定

要旨

材料と方法

成績

第1項 モノクローナル抗体を用いたELISAによる豚マイコプラズマ肺炎の血清学的診断

1. ELISAの術式の検討
2. ダブルサンドウィッチELISAの特異性
3. M. hyopneumoniae 実験感染豚における抗体価の推移
4. M. hyopneumoniae 自然感染豚における抗体価の推移
5. M. hyopneumoniaeに対する抗体保有状況の全国調査

第2項 モノクローナル抗体を用いた凝集反応による

M. hyopneumoniaeの同定

考察

総括

参考文献

謝辞

英文抄録

緒言

Mycoplasma hyopneumoniaeによって惹起される豚マイコプラズマ肺炎は、豚の慢性呼吸器病の1つで、現在世界各地で発生しており、マイコプラズマによって惹起される家畜疾病の中では、最も被害の大きい疾病の一つである^{50), 62)}。本病の発生は古くから報告されており、致死率は高くないが、発育の遅延および飼料効率の低下などにより甚大な経済的損失を養豚産業に与えてきている^{21), 24), 47)}。本病の病原体であるM. hyopneumoniaeは、1965年に米国のMareとSwitzer³⁵⁾および英国のGoodwinら¹⁹⁾によって肺病変部より初めて分離され、わが国では、1968年に尾形ら⁴⁵⁾により分離同定されている。M. hyopneumoniaeは極めて宿主特異性が高く、豚のみに感染し肺炎を起こす。感染豚は慢性に経過する事が多く、病理組織学的には、肺の気管支および血管周囲へのリンパ球をはじめとする単核細胞の著しい浸潤が特徴である⁵⁰⁾。

M. hyopneumoniaeを含めマイコプラズマは、細胞壁を持たず外界とは単位膜(unit membrane)と呼ばれる2層の膜で隔てられただけの単純な構造をしているにもかかわらず、その菌体表面の構造、抗原性あるいは病原因子等について不明な点が多い。また、一般の細菌とは異なり、補体非存在下で抗血清によってその発育が阻止されることもマイコプラズマの特徴であるが、発育阻止に関与する抗原は全く解明されていない。M. hyopneumoniaeの表面にはグリコカリックス様の莢膜物質が存在することが知られ⁵⁹⁾、いくつかの単位膜の蛋白成分に対するモノクローナル抗体が作製されている^{40), 63), 66)}。また、これまでに遺伝子組換えにより7種類の膜蛋白の組換え体が作出されている^{28), 30)}。しかし、これらのM. hyopneumoniaeの構成々分の機能、特に病原性との関連については明らかにされていない。豚からはM. hyopneumoniaeの他にM. hyorhinitis、M. flocculare、M. hyosynoviae、M. hyopharyngitis、M. suis等の多くのマイコプラズマが分離されている。これらの中で、M. hyopneumoniae、M. hyorhinitisおよびM. flocculareの3種のマイコプラズマ間には共通抗原が存在することが報告されており^{12), 17)}、特にM. hyopneumoniaeとM. flocculare

間の共通抗原性は他の菌種間に比べて強いことが指摘されている^{41), 42)}。

M. flocculareは、1973年にMeyling³⁷⁾およびFriss¹⁵⁾により豚の呼吸器から分離された種で、発育態度あるいはコロニー形態等はM. hyopneumoniaeに極めて類似しているが、病原性は比較的弱いとされている²⁾。豚由来マイコプラズマ間の交差反応性はマイコプラズマの同定あるいは豚マイコプラズマ肺炎の診断上大きな障害となっている。

本病の診断に関しては、病原体の発見以来、細菌学的、病理学的あるいは免疫学的な種々の方法が検討されてきた。M. hyopneumoniaeを分離同定することは最も基本的な診断法の一つであるが、M. hyopneumoniaeはマイコプラズマの中で最も培養困難な菌種の一つであり、これまでにごく限られた研究室でしか分離に成功していない^{14), 16)}。しかも、初代の分離培養は1ヶ月以上を要するために、迅速診断には適さない。病理学的診断は本病の肉眼的肺病変像と病変部の組織学的所見を指標にして行われている。肉眼的肺病変は、肺の前葉、中葉および中間葉に現れることが多く、正常部と病変部の境界が明瞭になりやすい。更に、組織学的には、リンパ球を主とした高度の細胞浸潤像とリンパ濾胞の過形成が特徴的な所見である。しかし、これらはM. hyopneumoniae感染症に特異的な所見ではなく、多くの病原体による慢性感染症においても一般的にみられるので、病理所見のみから本病を確定診断することはできない。このように、細菌学的及び病理学的診断法は本病の診断法として有効ではあるが、迅速性に欠け確定診断法としても適していない。

これに対し、血清学的にM. hyopneumoniaeに対する特異抗体を検出する方法は迅速で、生前診断法としての有用性も期待されている。このような観点から、M. hyopneumoniaeが病原体として確定されて以来、種々の血清学的診断法の開発が試みられてきた。これまでに、補体結合(CF)反応^{10), 34), 53), 54), 60)}、間接血球凝集反応^{13), 22), 23), 29)}、ラテックス凝集反応⁵⁵⁾、および酵素免疫測定法(ELISA)等多くの手法が本病の診断法として応用されてきた^{4), 11), 40)}。現在CF反応が最も広く野外で応用されているが、このCF反応ばかりでなく他の全ての血清反応が抗体検出感度および特異性に関して、解決され

なければならないいくつかの問題を残している^{36), 58)}。先にも述べたように豚由来マイコプラズマの種間、特に、M. hyopneumoniaeとM. flocculare間の交差反応の問題を解決し、特異性の高い血清学的診断法を開発することが緊要となっている。

一方、本病の予防に関しては、1965年に原因菌M. hyopneumoniaeが発見されて以来多くの報告がある。LamとSwitzer³³⁾は菌体をエーテル、凍結融解、ドデシル硫酸ナトリウム等で抽出して得られた菌体成分をアジュバントと共に筋肉内接種することにより防御効果を認めた。GoodwinとWhittlestone²⁰⁾はホルマリン死菌をアジュバントと共に投与することにより肺病変が軽減されたと報告している。Rossら⁴⁹⁾はM. hyopneumoniaeの培養上清中に感染防御抗原が存在することを見い出したが、同時に菌体を破壊して作製した抗原を接種された豚ではかえって病変が拡大したことを報告している。このようにワクチンによる本病の防御が可能なことは多くの研究者によって示唆されているが、今後、ワクチン接種豚での遅延型過敏症などが関与していると思われる病変の拡大などの問題を解決する必要がある。この問題の解決法として感染防御に有効な成分のみをワクチンとする、いわゆるコンポーネントワクチンの応用が考えられる。例えば、マイコプラズマは抗体によってその発育が阻止されるので、発育阻止に関与する抗原をワクチンとして用いることも可能であろう。

著者らは、M. hyopneumoniae表面の抗原構造、特に特異性の高い抗原物質の特定を目的として本研究を実施した。まず、豚由来マイコプラズマの抗原性を各種マイコプラズマに対する高度免疫豚血清およびM. hyopneumoniae実験感染豚血清を用いてウェスタンブロット法により分析し、M. hyopneumoniaeに特異的な抗原を特定した。さらに、M. hyopneumoniae実験感染豚について、M. hyopneumoniaeの種々の抗原に対する経時的抗体応答を分析することにより、M. hyopneumoniaeの菌体表面に分子量約46キログルトン(Kd)の強い免疫原性を示す特異抗原が存在することを明らかにした。次に、M. hyopneumoniaeの種々の抗原を認識するモノクローナル抗体の作製を試み、M. hyopneumoniae

46Kd抗原に対するモノクローナル抗体の他に、M. hyopneumoniaeを特異的に凝集するばかりでなく、その発育を阻止するモノクローナル抗体の作出に成功した。さらに、M. hyopneumoniae 46Kd抗原に対するモノクローナル抗体を用いたELISAにより同抗原に対する特異的抗体を検出する方法を開発した。また、M. hyopneumoniae凝集モノクローナル抗体を用いた分離菌株の簡易迅速同定法を確立した。

第1章 Mycoplasma hyopneumoniae抗原の分析

要旨

豚由来マイコプラズマ間の血清学的交差反応性およびM. hyopneumoniae抗原に対する感染豚の抗体応答を、ELISAとウェスタンブロット法により分析した。豚由来マイコプラズマとして、M. hyopneumoniae、M. hyorhinis、M. flocculareおよびM. hyosynoviaeを用いたが、M. hyosynoviaeを除く他の3種はTween20処理によりそれぞれの種に対して比較的特異性の高い抗原成分の抽出が可能であった。さらにその抗原をSephacryl-S300を用いてゲル濾過し、その第2峰をELISA用抗原として用いることにより、M. hyopneumoniaeとM. hyorhinis間の交差反応は消失した。しかし、これらの処理によってもM. hyopneumoniaeとM. flocculare間の交差反応は完全に除去することはできなかった。この両種間の交差抗原をウェスタンブロット法により分析したところ、M. hyopneumoniae抗原中の分子量約74キログルトン(Kd)と53Kdの2種の抗原が交差反応性を保有していた。

さらに、Tween20で可溶化されるM. hyopneumoniae抗原中の分子量約96Kd、70Kd、46Kdおよび38Kdの抗原と、M. flocculareの67Kd、56Kdおよび23Kd抗原がそれぞれの種に対して特異性を保有していた。また、M. hyopneumoniae実験感染豚の血清中にはM. hyopneumoniaeの96Kd、76Kd、70Kd、53Kd、46Kdおよび38Kd抗原に対する抗体が検出された。これらの抗体の中で、46Kd抗原に対する抗体が最も早期から検出され、しかも長期間にわたって産生された。このようにM. hyopneumoniaeの46Kd抗原は豚に対して強い免疫原性を示す特異性の高い抗原であることが明らかとなった。

材料と方法

1 供試菌株

供試された菌株は表I-1に示す通りである。

表 I - 1. 供試菌株

次の5株を使用した。

マイコプラズマ	株名	由来
<u>M. hyopneumoniae</u>	J	ATCC25934
<u>M. hyopneumoniae</u>	E-1	野外株
<u>M. flocculare</u>	Ms42	アイオワ州立大学Ross博士より分与
<u>M. hyorhinis</u>	BTS-7	アイオワ州立大学Ross博士より分与
<u>M. hyosynoviae</u>	S16	東京大学山本博士より分与

2 供試培地

山本ら⁶⁴⁾によるBHL培地を使用した。その組成および調製方法は以下の通りである。

ブルセラ・ブロス(GIBCO)	5.8g
ラクトアルブミン水解物(NBL)	2.0g
ハックス液(日水製薬)	500ml
蒸留水	250ml

この基礎培地を115℃10分間高圧滅菌し、以下のものを無菌的に添加して使用した。

SPF豚血清	200ml
25%新鮮酵母抽出液	50ml
アンピシリン(200mg/ml)	5ml

M. hyosynoviaeの培養には上記培地にムチン(Difco)を0.5%の割合に添加した。

3 抗原の作製方法

マイコプラズマは上記の培地を用いて37℃2～3日間振盪培養後、14,000Xg45分間の遠心により菌体を回収した。その後、Rottemの方法⁵¹⁾に従って菌体を洗浄し、最終的に培地量の1/100量のトリス緩衝食塩液に再浮遊させた。このようにして作製した菌液を豚の免疫に用いた。

ゲル電気泳動およびELISA用の抗原は上記菌体浮遊液をTween20処理するこ

とによって作製した。菌体浮遊液と等量の2%Tween20溶液を混合し、37℃30分間感作後14,000Xg 1時間遠心し上清を採取する。その後、上清中のTween20を2回のエーテル処理により除去し、さらにエーテルを窒素ガス噴射により除いた。作製した抗原は使用時まで-80℃に保存した。

4 マイコプラズマに対する豚高度免疫血清の作製

各マイコプラズマ種に対する高度免疫血清は、SPF豚を用いて以下のような方法により作製した。菌体浮遊液と等量のフロイント完全アジュバントを混合し、2ヶ月齢のSPF豚の筋肉内に2週間隔で2回投与（2ml/豚）後、最終投与から5週目に採血して免疫血清を得た。

5 無菌豚での *M. hyopneumoniae* 接種試験

感染実験には、*M. hyopneumoniae* E-1株を用いた。6頭の生後10日齢の無菌豚の鼻腔内に、 5×10^8 CCU*/mlの *M. hyopneumoniae* を含む培養液2mlを2日間隔で3回接種した。接種後、毎週、前大静脈より採血して経過血清を得た。*M. hyopneumoniae* 接種後、5、15および42週目に2頭ずつ剖検し、肺病変の有無を調べた。感染豚は生後2ヶ月齢まで無菌アイソレーター内で飼育し、以降は清浄豚舎内で飼育した。

6 酵素免疫測定法（ELISA）

Tween20処理抗原をSephacryl S-300(Pharmacia)を用いたゲル濾過によりさらに精製し、分画後の第2峰をELISA用抗原とした。抗原をマイクロプレート(Greiner, 655001)に4℃1夜の感作で吸着させた後、被検血清を添加して4℃1夜反応させた。ついで、ペルオキシダーゼ標識抗豚IgG血清（抗HL鎖、Cooper Biochemical）を添加し、室温で2時間反応させた後、酵素基質として2mMの0-フェニレンジアミン二塩酸塩（半井化学）と3%過酸化水素水を加えた。血清および標識抗体の希釈には牛胎児血清5%およびTween20 0.05%添加磷酸緩衝液を用い、各ステップ間の洗浄は生理食塩液で5回行った。

*CCU：Color change unitの略。マイコプラズマの増殖により液体培地のpHが低下し、培地の色調が変化することを利用した菌数表示法のひとつであり、培養が難しく寒天培地上のコニーが極めて小さいためにCFUの算定が困難なマイコプラズマに用いられている。

7 ゲル電気泳動およびウェスタンブロット法

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)はLaemmliの方法³²⁾に準じて、4%濃縮ゲル、10%泳動ゲルの系で行った。Tween20可溶化抗原の泳動は非還元状態下で行った。泳動後、Towbinらの方法⁶¹⁾に準じて分画された抗原を電氣的にニトロセルロース膜へ転写した。転写後、3%スキムミルク添加トリス緩衝食塩液で37℃60分間ブロッキングを行った。その後、膜を2-3mm幅の短冊状に切断し種々の抗血清と3時間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗豚IgG血清との反応を2時間行い、酵素基質としてペルオキシダーゼ発色試薬(BioRad)を用いた。これらの反応はすべて室温条件下、常に振盪しながら行った。

成績

第1項 マイコプラズマ菌体成分の可溶化

M. hyopneumoniae抗原を分析し、血清反应用の抗原を得るためには効率よく

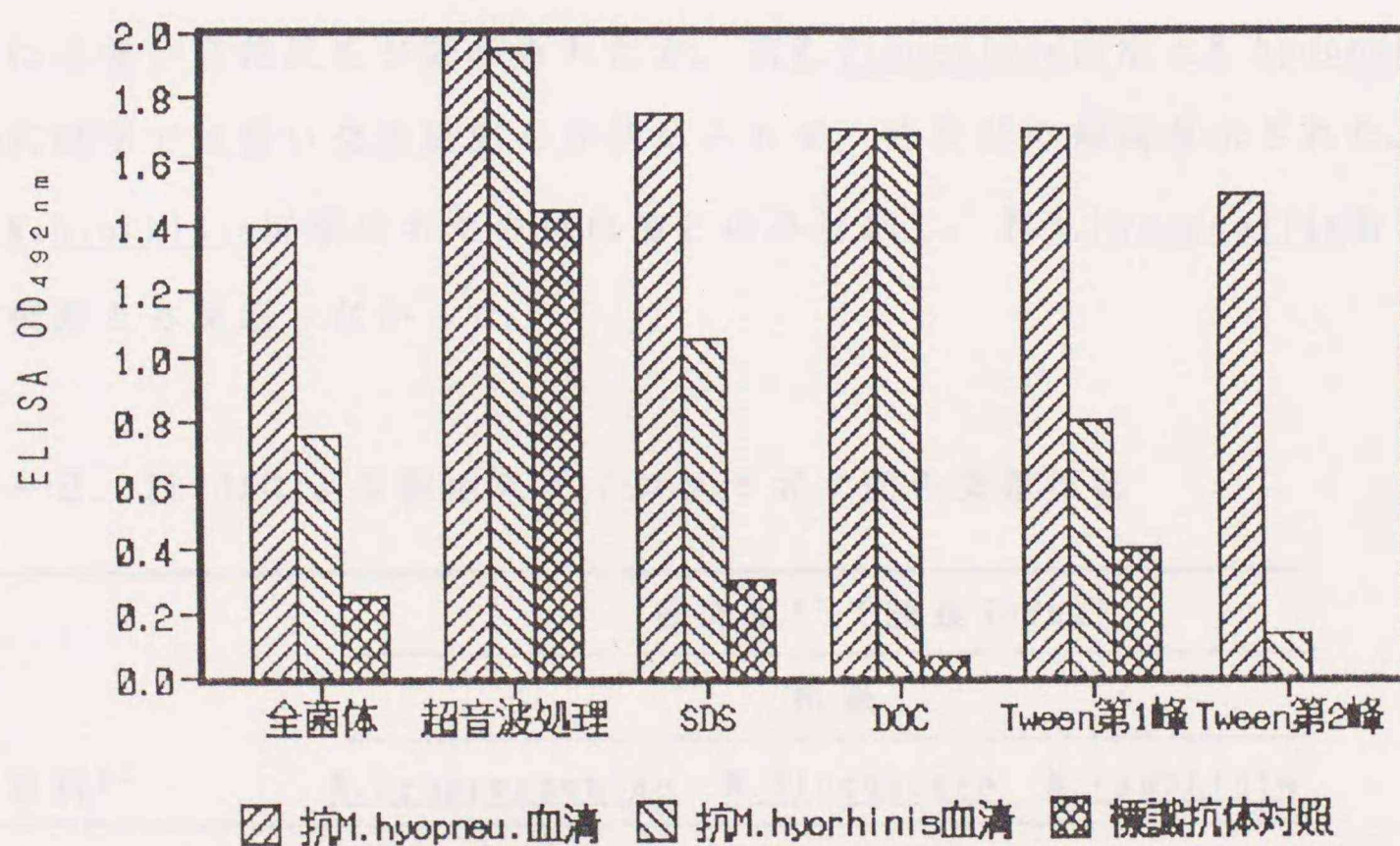


図 I - 1. ELISA用可溶化抗原の特異性の比較

各処理抗原は蛋白濃度を約5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整し、抗M. hyopneumoniae豚血清、抗M. hyorhinis豚血清と反応させた。抗原対照としてペルオキシダーゼ標識抗豚IgG抗体の非特異的吸着を示した。

菌体成分を可溶化する方法を開発することが重要である。そこで、超音波処理、ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)、デオキシコール酸(DOC)およびTween20等の界面活性剤による膜成分の可溶化について検討した。以上の方法について予備試験を行ったところ、Tween20処理により比較的特異性の高い抗原が得られることが示されたので、Tween20処理抗原についてはゲル濾過により抗原をさらに精製した。これらの方法により可溶化された抗原成分について、ELISAによりその特異性を比較検討したところ(図I-1)、Tween20可溶化抗原のゲル濾過第2峰が抗原として最も高い特異性を示した。M.hyorhinisおよびM.flocculareも同様な方法により比較的特異性の高い抗原が得られたが、M.hyosynoviaeはこの方法では抗原を抽出することはできなかった。

第2項 豚由来マイコプラズマ間の交差反応性の分析

Tween20処理後ゲル濾過により精製した抗原と、豚由来マイコプラズマに対する高度免疫血清を用い、ELISAにより豚由来マイコプラズマ間の交差反応試験を行った(表I-2)。その結果、抗M.hyopneumoniae血清とM.flocculare抗原間には強い交差反応が認められたが、抗M.flocculare血清とM.hyopneumoniae抗原間では弱い交差反応しか認められず、片交差の傾向が示された。一方、M.hyorhinis抗原はホモの抗血清とのみ反応し、抗M.hyosynoviae血清はどの抗原とも反応しなかった。

表I-2. ELISAによる豚由来マイコプラズマ間の交差反応

抗血清 ^{a)}	吸光度 ^{b)} (波長492nm)		
	抗原		
	<u>M.hyopneumoniae</u>	<u>M.flocculare</u>	<u>M.hyorhinis</u>
<u>M.hyopneumoniae</u>	1.71	1.31	0.10
<u>M.flocculare</u>	0.33	1.61	0.11
<u>M.hyorhinis</u>	0.08	0.09	1.94
<u>M.hyosynoviae</u>	0.05	0.03	0.02

a)高度免疫豚血清 1:1000希釈

b)2頭の豚血清の平均値

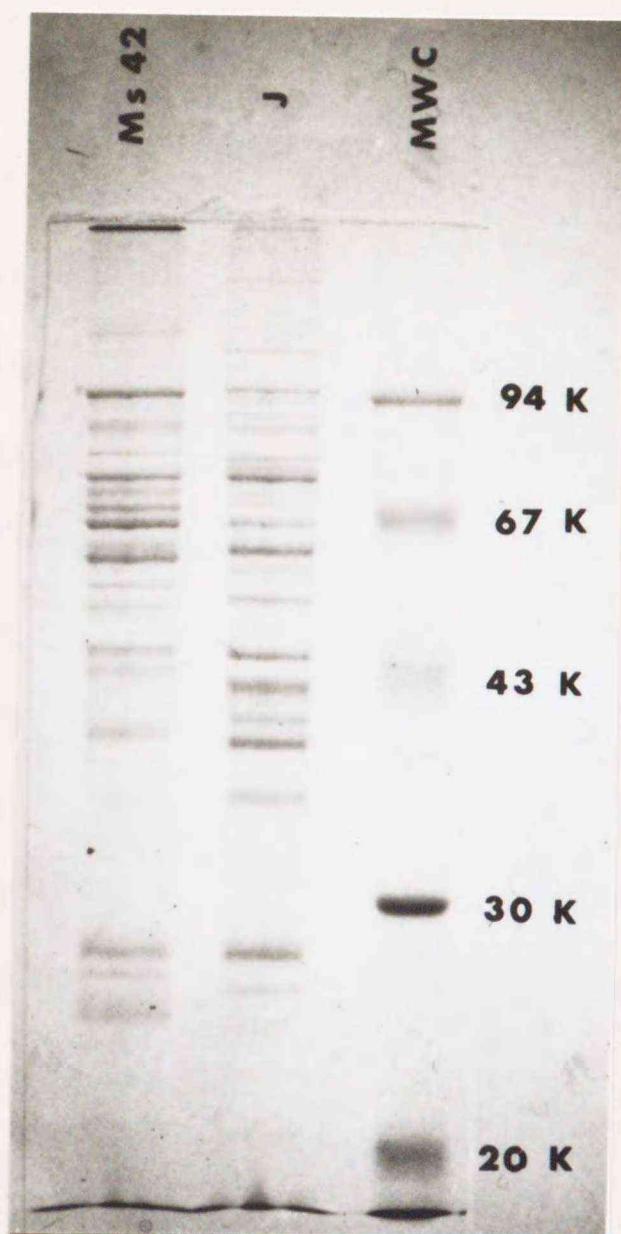
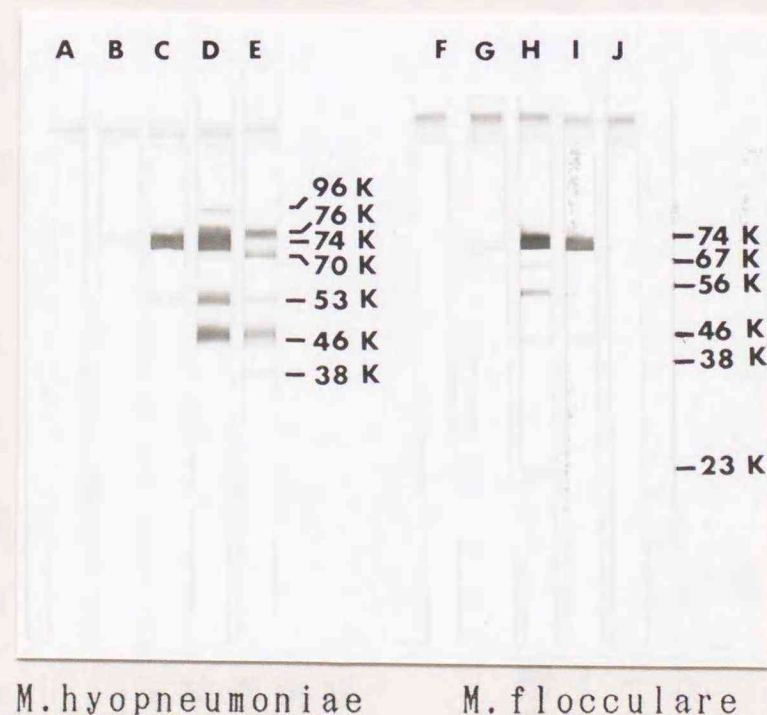


図 I - 2. *M. hyopneumoniae* J 株と *M. flocculare* Ms42 株の SDS-PAGE 像の比較 MWC: 分子量マーカー、94K: Phosphorylase B、67K: BSA、43K: Ovalbumin、30K: Carbonic anhydrase、20K: Trypsin inhibitor

そこで、*M. hyopneumoniae* と *M. flocculare* 間の交差反応性についてウェスタンブロット法によりさらに詳しく検討した。図 I - 2 に *M. hyopneumoniae* と *M. flocculare* の Tween20 可溶化抗原の SDS-PAGE 後の蛋白染色像を示したが、両種とも 20 本以上のバンドが認められ、それらのパターンは類似していた。SDS-PAGE により分画された *M. hyopneumoniae* 抗原をニトロセルロース膜に転写後、抗 *M. hyopneumoniae* 血清および *M. hyopneumoniae* 実験感染豚血清と反応させたところ、7 本の抗原性を有するバンドが検出された (図 I - 3)。



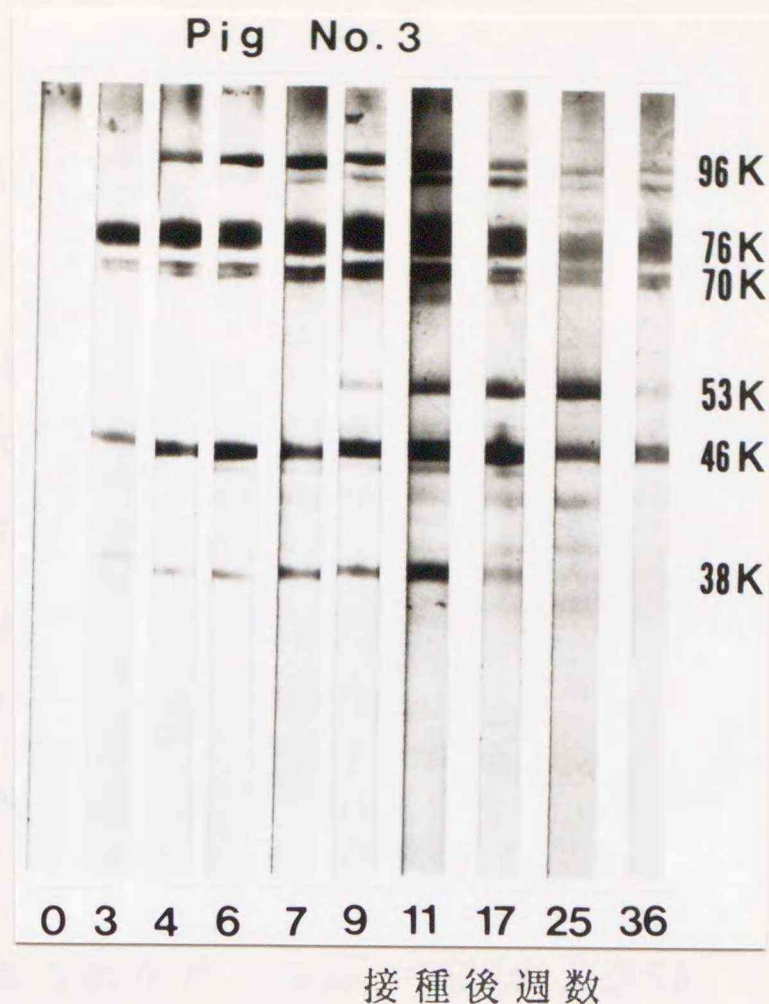
M. hyopneumoniae *M. flocculare*

図 I - 3. ウェスタンブロット法による *M. hyopneumoniae* と *M. flocculare* の交差反応性の解析
各ストリップは以下のような血清と反応させた。標識抗体対照 (A と F)、抗 *M. hyorhinis* 血清 (B と G)、抗 *M. flocculare* 血清 (C と H)、抗 *M. hyopneumoniae* 血清 (D と I)、*M. hyopneumoniae* 実験感染豚血清 (E と J)

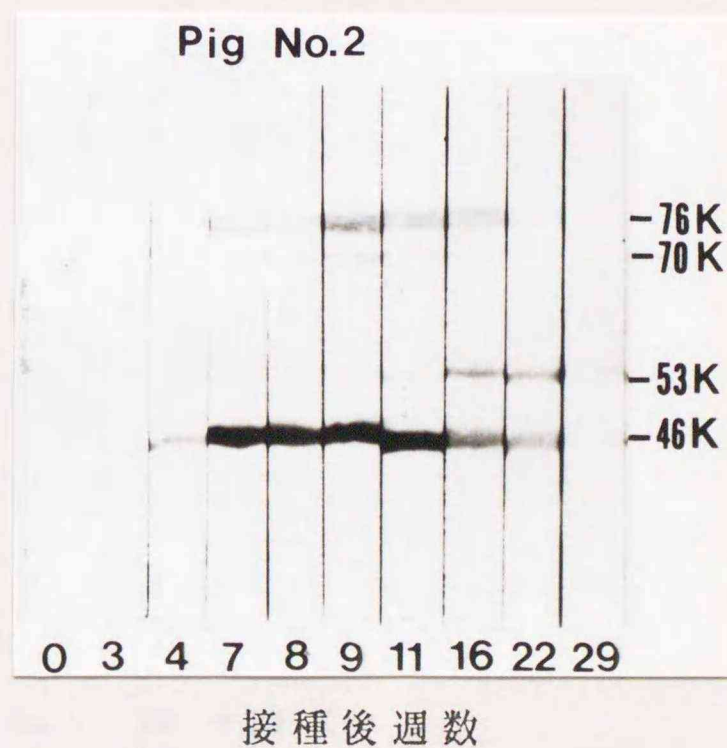
これら7種の抗原の分子量はそれぞれ96Kd、76Kd、74Kd、70Kd、53Kd、46Kdおよび38Kdと計算された。これらのうち、74Kdと53Kd抗原のみが抗M. flocculare血清と反応し、他の抗原は全く反応しなかった（図I-3）。これに対し、M. flocculare抗原では、74Kd、67Kd、56Kd、46Kdおよび23Kdの5本の抗原バンドが抗M. flocculare血清との反応で検出され、これらのうち、74Kdと46Kdの2種の抗原が抗M. hyopneumoniae血清とも反応した。一方、ELISAにおいて交差反応が認められなかった抗M. hyorhinis血清が、M. hyopneumoniaeとM. flocculareの74Kd抗原とウエスタンブロット法でわずかながら反応した。また、M. hyopneumoniaeの74Kd抗原は高度免疫血清と非常に強く反応したが、M. hyopneumoniae実験感染豚の血清ではこの抗原との反応が全く認められなかった。

第3項 M. hyopneumoniae実験感染豚における抗体応答の分析

6頭のM. hyopneumoniae実験感染豚より毎週採血し、抗体応答をウエスタンブロット法により経時的に分析した。鼻腔内接種後9ヶ月間観察した2頭（No.2、No.3）のうちの1頭（No.3）は、Tween20で可溶化された M. hyopneu-

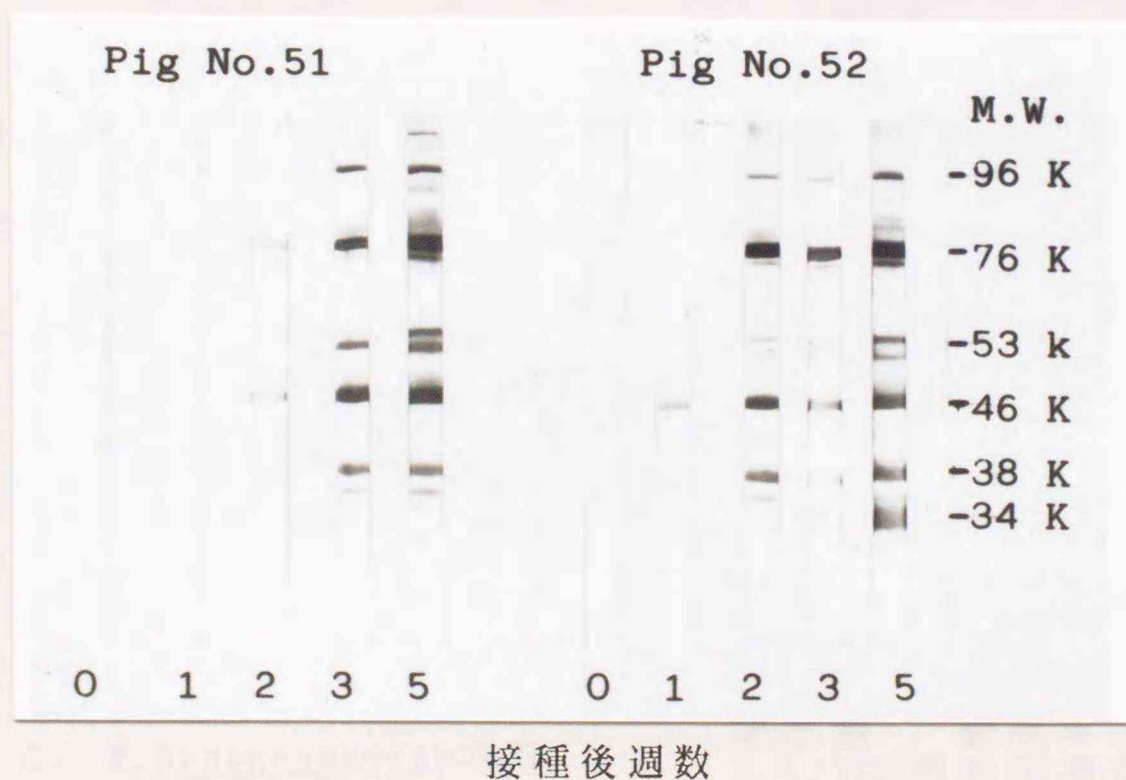


図I-4. M. hyopneumoniae実験感染豚No.3の抗体応答の分析



図I-5. M. hyopneumoniae実験感染豚No.2の抗体応答の分析

moniae 抗原のうち、96Kd、76Kd、70Kd、53Kd、46Kdおよび38Kdの6種の抗原に対して抗体を産生した（図I-4）。これらの抗原のうち、76Kd、70Kdおよび46Kd抗原に対する抗体は接種後3週目に検出され、続いて4週目には96Kdと38Kd抗原に対する抗体も検出された。さらに、53Kd抗原に対する抗体が接種後9週目から観察された。これらの抗原に対する抗体は、接種後11週目頃から次第に消失し、接種後36週目には53Kdおよび38Kd抗原に対する抗体はほとんど検出されなくなった。しかし、96Kd、76Kd、70Kdおよび46Kd抗原、特に76Kdと46Kd抗原に対する抗体は36週目でも検出された。これに対し、もう一方のNo.2の豚の抗体応答はNo.3の豚とは大きく異なっていた（図I-5）。すなわち、46Kd抗原に対して強い抗体応答がみられたが、76Kd、70Kdおよび53Kd抗原に対する抗体応答は弱く、96Kdおよび38Kd抗原に対する抗体は検出されなかった。M. hyopneumoniae鼻腔内接種後、5週目（豚No.5、No.6）と15週目（豚No.1、No.4）に剖検された4頭の抗体応答のウェスタンブロット像は、豚No.3の5週目および15週目までの像と同様で、接種後3週目には76Kd、70Kdおよび46Kd抗原に対する抗体が検出された。

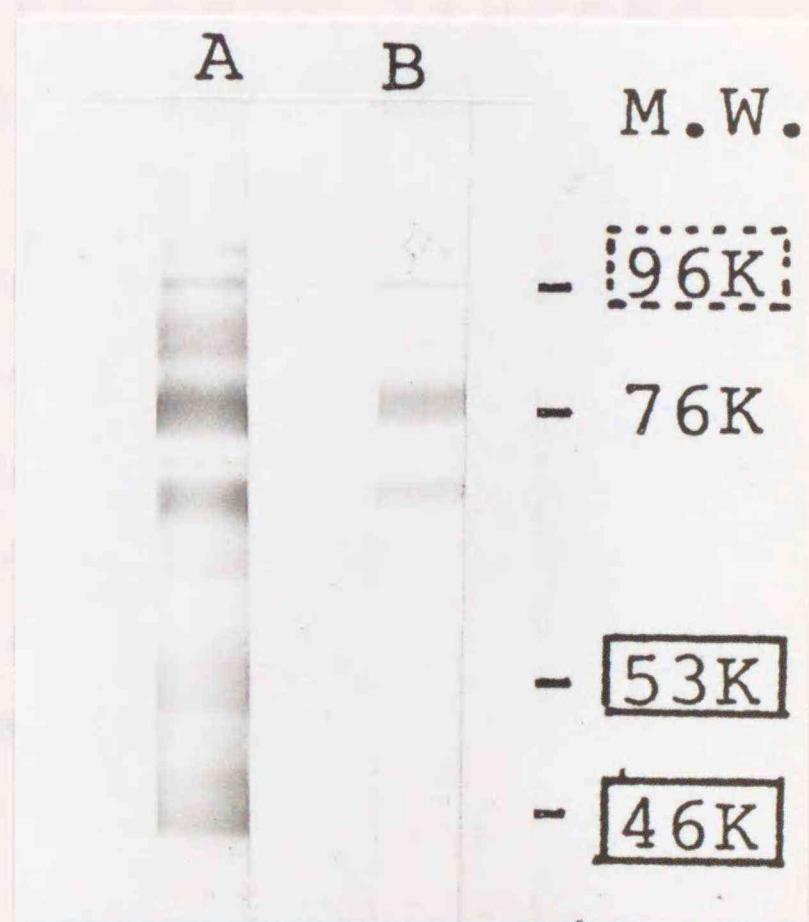


図I-6. M. hyopneumoniae抗原を筋肉内に投与された豚の抗体応答

一方、M. hyopneumoniae抗原を筋肉内に投与された2頭の豚(No. 51、52)のうち、豚No. 52では投与後1週目に46Kd抗原に対する抗体が検出された(図I-6)。さらに、2週目には2頭の豚とも46Kdと76Kd抗原に対する強い抗体応答のあることが確認された(図I-6)。このように、M. hyopneumoniaeを鼻腔内あるいは筋肉内に接種された豚は、その接種ルートの違いにかかわらず本菌の46Kdおよび76Kd抗原に対して早期に抗体応答を示すことが明らかとなった。

考察

本研究によって、M. hyopneumoniaeの種々の抗原に対して豚は個体によって異なった免疫応答を示すことがあることが明らかとなった。M. hyopneumoniaeの76Kd、70Kdおよび46Kd抗原に対する抗体は感染後早期から長期間にわたって産生され、特に46Kd抗原に対してはすべての豚が強い抗体応答を示した。抗血清をM. hyopneumoniaeの無処理の菌体で吸収すると46Kd抗原に対する抗体活性が消失することから、本抗原が菌体表面に存在することが示唆された(図I-7)。一方、M. hyopneumoniaeの96Kd、53Kdおよび38Kd抗原に対する抗体は76Kd、70Kd、46Kd抗原よりも後期に産生され、短期間で消失した。このようにM. hyopneumoniaeの種々の抗原に対する豚の抗体応答の差を明らかにし、強い免疫原性を示す抗原を特定したことは、豚マイコプラズマ肺炎の血清学的診断法開発のための重要な基礎知見となる。また、M. hyopneumoniaeの特定の表面抗原が豚に対し強い免疫原性



図I-7. M. hyopneumoniae 実験感染豚血清の無処理菌体による吸収試験 吸収は1:10希釈した血清に1/100濃縮菌液を1ml添加し、4℃で1夜行った。
A:吸収前、B:吸収後

を示すことが明らかになったことは、特定の抗原を宿主の免疫系が強く認識することを示唆しており、病原体と宿主の免疫系との相互作用を研究する上で興味深い。

豚由来マイコプラズマ間の共通抗原性を分子レベルで分析した報告はこれまでもいくつかある。YoungとRoss⁶⁵⁾は、豚はM. hyopneumoniae抗原の中で分子量110Kd、64Kd、50Kd、41Kdおよび36Kd抗原に対して抗体を産生するが、64Kd抗原のみがM. hyopneumoniaeに対して特異的で、他の四種類の抗原は抗M. flocculareおよび抗M. hyorhinis血清とも反応したと報告している。これに対し、今回の成績はM. hyopneumoniaeの74Kdおよび53Kd抗原が主要な交差反応抗原であることを示した。両者間の相違は、抗原の調製方法および電気泳動条件の異なる点がその主因であると考えられる。また、Minionら³⁸⁾によって指摘されているように、マイコプラズマの交差反応性は使用菌株あるいは培養条件などによって大きく変わることも十分考えられる。

実験感染豚における抗体応答の経時的分析において、豚No. 2とNo. 3のウェスタンブロット像に大きな違いが認められた。すなわち、これは感染豚のM. hyopneumoniaeに対する抗体応答に個体差のあることを示すものと思われる。しかし、今回の6頭の鼻腔内実験感染豚のうち、豚No. 2以外はM. hyopneumoniae接種後3週目には76Kdおよび46Kd抗原に対して強い抗体応答が認められており、筋肉内接種豚についても76Kdと46Kd抗原に対して早期の抗体応答が確められた。このように、M. hyopneumoniaeの76Kdおよび46Kd抗原は強い免疫原性を有する主要な菌体表面抗原であり、特に46Kd抗原に対する抗体は感染後早期から長期間にわたって産生されることが明らかとなった。従って、本抗原に対する抗体はM. hyopneumoniae感染症を診断する上で良好な指標になるとと思われる。

第2章 M. hyopneumoniaeに対するモノクローナル抗体の作出

要旨

M. hyopneumoniae抗原の分析を目的として本菌に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。その結果、12株のM. hyopneumoniaeに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマが得られ、その内の8株がM. hyopneumoniaeに対して特異性の高いモノクローナル抗体産生ハイブリドーマであった。これらのモノクローナル抗体はM. hyopneumoniae抗原との反応パターンから7種類に分類された。M. hyopneumoniae46Kd抗原と反応する5種類のモノクローナル抗体の中で、2種類のモノクローナル抗体はM. hyopneumoniaeと特異的に反応したが、他の3種類のモノクローナル抗体はM. hyorhinisまたはM. flocculareと交差反応性を示した。また、M. hyopneumoniaeの46Kd抗原と反応するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマが最も多く得られ、豚に対して強い免疫原性を示すM. hyopneumoniaeの46Kd抗原がマウスに対しても強い免疫原性を有することが明らかとなった。また、M. hyopneumoniae46Kd抗原と反応するモノクローナル抗体の他に、M. hyopneumoniaeと特異的に反応するモノクローナル抗体が7種類が樹立された。この内、3種類のモノクローナル抗体(E-7-1-4, J-168-1, J-49-1)はM. hyopneumoniaeを特異的に凝集し、さらにモノクローナル抗体E-7-1-4はM. hyopneumoniaeの発育を阻止した。これらの凝集モノクローナル抗体によって認識された抗原は、ヨードサリチル酸リチウムを用いたマイコプラズマの糖蛋白抽出法により抽出可能であり、抗原を蛋白分解酵素処理あるいは過ヨウ素酸処理することによって反応性が失われること、さらに免疫電顕法による解析の結果などから、M. hyopneumoniaeの細胞膜表面の糖蛋白様物質である可能性が示唆された。

材料と方法

1. 抗原

マウスの免疫用抗原にはM. hyopneumoniae J株およびE-1株を用いた。こ

これらの菌株をBHL培地で2～3日間振盪培養後、 $14,000\times g$ 45分間の遠心により集菌した。その後、Rottemの方法⁵¹⁾に従って菌体を洗浄し、最終的に培地量の1/100量のトリス緩衝食塩液に再浮遊させた。このようにして作製した菌液を免疫に用いた。

2. マウスの免疫法

生後8週齢のBALB/cマウスの後肢筋肉内および腹腔内に、抗原とフロイント完全アジュバントとの等量混合物を0.5ml接種した。4週間後に、 56°C 30分間加熱した抗原のみを腹腔内に0.5ml再接種した。

3. 培養液

使用した細胞培養液の組成は以下の通りである。

1)RPMI1640培地

RPMI1640 (白水)	10.2g
L-グルタミン	0.3g
ピルビン酸ナトリウム	0.11g
アンピシリン	100mg
蒸留水	900ml
牛胎児血清	100ml
10%炭酸水素ナトリウム溶液	10ml

2)HAT培地

RPMI1640培地にヒポキサンチン $1\times 10^{-4}\text{M}$ 、アミノプテリン $4\times 10^{-7}\text{M}$ 、チミジン $1.6\times 10^{-5}\text{M}$ となるように添加した。

3)HT培地

RPMI1640培地にヒポキサンチン $1\times 10^{-4}\text{M}$ 、チミジン $1.6\times 10^{-5}\text{M}$ となるように添加した。

4. 細胞融合

Iwasakiら²⁶⁾の方法に準じ、以下のように実施した。

1) マウスミエローマP3/X63-Ag8.U1(P3U1)をRPMI培地を用いて培養し、対数増殖期にある細胞を集め、 37°C に加温した血清無添加RPMI1640培地で洗

浄し血清成分を除く。

2) 免疫したマウスから無菌的に脾臓を摘出し、脾細胞を調製した後、37℃の血清無添加RPMI1640培地で洗浄する。

3) ポリエチレングリコール4000 (PEG、Merck) 2 gをオートクレーブ滅菌し、RPMI1640培地 (血清無添加) を2 ml加えて、37℃の水槽に入れる。

4) ミエローマ 1×10^7 個と脾細胞 1×10^8 個を50 ml遠心管内で混和し、遠心して上清を完全に除去する。

5) 遠心管を振盪することにより細胞を分散させた後、3)で用意したPEG溶液1 mlを添加する。さらに1～2分かけて細胞をよく混ぜ、次にRPMI1640培地 (血清無添加) 10 mlを5分間ほどかけてゆっくりと添加する。

6) 800rpmで5分間遠心し、上清を吸引除去後20 mlのHAT培地を加える。この様にして作製した細胞浮遊液を、96穴マイクロプレートに0.1 ml/ウェルずつ分注後、37℃、5%炭酸ガスふ卵器内で培養する。

7) 培養後1、3日目にHAT培地を0.1 ml/ウェルずつ添加し、6、9、12日目に培地の半量ずつを交換する。

5. モノクローナル抗体のスクリーニングおよび性状解析

ELISA: 抗原として、M. hyopneumoniae J株無処理菌体浮遊液、Tween20可溶化画分およびBHL培地を用いた。これらの抗原を炭酸緩衝液(pH9.5)で希釈後、4℃1夜感作し抗原吸着プレートとした。ハイブリドーマの培養上清を0.1 ml/ウェル添加し室温で3時間感作後、洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIg血清 (Cappel) を添加した。室温で2時間感作したのち、再び洗浄し、基質として2 mMの α -フェニレンジアミン二塩酸塩と3%過酸化水素水を加えた。発色停止液には3 Mの硫酸を用い、波長492 nmで各ウェルの吸光度を測定した。

コロニープロット法: M. hyopneumoniae J株、M. hyorhinis BTS-7株およびM. flocculare Ms-42株をBHL寒天培地に接種し、37℃で5～7日間培養後に形成されたコロニーをImadaら²⁵⁾の方法に準じてニトロセルロース膜に転写した。その後、3%スキムミルク添加トリス緩衝食塩液でブロッキングした

後、ハイブリドーマ培養上清を膜上に3～5 μ lスポットし、室温で30分間感作した。この膜を洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIg血清を添加し、室温で2時間感作した。再び洗浄後、基質として発色試薬(BioRad)を添加し、室温で10～15分間感作後、蒸留水で洗浄して反応を停止させた。

代謝阻止試験：M. hyopneumoniae J株 10^3 CCU/ml含有菌液を抗原として、抗原0.025mlとハイブリドーマ培養上清0.025mlを混合し、さらにモルモット補体を5%に添加したBHL培地0.2mlを加え、37℃5%炭酸ガス下で2週間培養した。

ウェスタンブロット法：M. hyopneumoniae抗原をSDS-PAGEで分画後、Towbinらの方法⁶¹⁾に準じて分画された抗原を電氣的にニトロセルロース膜へ転写した。転写後、3%スキムミルク添加トリス緩衝食塩液(TBS, pH7.5)で37℃60分間ブロッキングを行った。その後、膜を2-3mm幅の短冊状に切断し、ハイブリドーマ培養上清と3時間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIg血清との反応を2時間行い、酵素基質としてペルオキシダーゼ発色試薬(BioRad)を反応させた。これらの反応はすべて室温で、常に振盪しながら行った。

抗原の蛋白分解酵素処理および過ヨウ素酸処理：ELISAにおいて、M. hyopneumoniae抗原をトリプシン(Sigma, Type III)、 α -キモトリプシン(Sigma, Type II)およびメタ過ヨウ素酸ナトリウム(半井化学)処理し、抗原性の変化を調べた。トリプシンおよびキモトリプシンは0.5mg/mlで37℃1時間、過ヨウ素酸は0.005Mで室温1時間処理した。

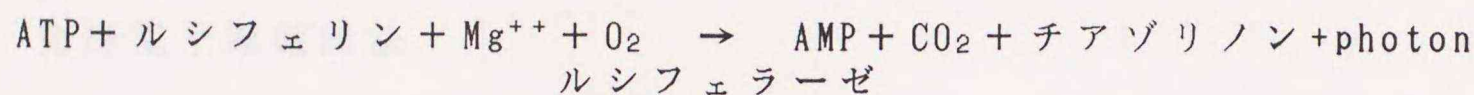
6. ハイブリドーマのクローニングと培養

クローニングは軟寒天法により3回行った。確立されたハイブリドーマ株は牛胎児血清を3～5%に添加したRPMI培地で培養し、その培養上清をモノクローナル抗体として用い、必要に応じて培養上清を硫酸塩析等により濃縮した。また、腹水型モノクローナル抗体の作製はGilletteの方法¹⁸⁾に準じた。

7. アデノシン三リン酸(ATP)測定法

Ureaplasma urealyticumとM.hyopneumoniaeの増殖を定量する方法として、StemkeとRobertson^{56), 57)}によって、報告された手法に従って実施した。この反応はルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を応用したもので、下記の反応により1分子のATPの存在により1光子(photon)が発生するので、それをルミノメーターを用いて測定した。

ATP / ホタル・ルシフェラーゼ反応



まず、蒸留水で50倍に希釈した M.hyopneumoniae 培養液に nucleotide releasing 試薬(PICOEX B, Los Alamos Diagnostics)を等量添加した。2分後、ルシフェリン・ルシフェラーゼ試薬(PICOZYME F, Los Alamos Diagnostics)を添加し、発光をルミノメーター(Packard PICOLITE)で測定した。M.hyopneumoniae非接種の培地での発光をバックグラウンド値とし、各測定値とバックグラウンド値の差を求め、ATP標準品より作製した用量線よりサンプルのATP濃度を測定した。

8. M.hyopneumoniae糖蛋白成分抽出法

KahaneとBrunnerの方法²⁷⁾に準じ、ヨードサリチル酸リチウム(LIS)により M.hyopneumoniaeから糖蛋白成分を抽出した。M.hyopneumoniae J株をBHL培地で3~4日間培養し、集菌、洗浄後、0.3MのLIS添加トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)に再浮遊させて室温で20分間振盪する。次に、等量の50%フェノール液を添加、4℃で30分間攪拌した後、4,000rpm 1時間遠心し上層を回収した。透析によりフェノールを除去した後、DNA、RNA分解酵素処理を行い再透析後、凍結乾燥により濃縮した。乾燥品はエタノールおよびクロロホルム・メタノール洗浄を行った後蒸留水に再溶解させ、M.hyopneumoniae糖蛋白画分とした。

9. レクチン-ELISA

M.hyopneumoniae糖蛋白画分と種々のレクチンとの反応をELISAにより検

討した。糖蛋白画分を炭酸緩衝液で希釈後マイクロプレートに吸着させ、種々のペルオキシダーゼ標識レクチン(E.Y.Laboratories)と室温で3時間反応させた。洗浄後、酵素基質(ABTS)と過酸化水素水を添加し、発色を吸光度計で測定した。用いたレクチンは以下の通りである。1)Bauhinia purpurea(BPA), 2)Canavalia ensiformis(Con A), 3)Dolichos biflorus(DBA), 4)Griffonia simplicifolia(GS 1), 5)Griffonia simplicifolia(GS 2), 6)Maclura pomifera(MPA), 7)Arachis hypogaea(PNA), 8)Glycine max(SBA), 9)Ulex europaeus(UEA-1), 10)Triticum vulgaris(WGA)。

10. 免疫電子顕微鏡法

BHL培地で培養された M. hyopneumoniae を集菌、洗浄後リン酸緩衝液(PBS)に再浮遊させ、その10 μ lを電顕用グリッド(応研商事)に添加して吸着させた。PBSで洗浄後、モノクローナル抗体(培養上清)を添加し、室温で1時間反応させた。再びPBSで洗浄後、抗マウスIgM標識金コロイド(E.Y.Laboratories)を1時間反応させた後、Coleの方法⁵⁾に従って電子顕微鏡により観察した。

成績

第1項 モノクローナル抗体のスクリーニング

抗 M. hyopneumoniae モノクローナル抗体のスクリーニングは、全菌体、Tween20可溶化画分および培地成分に対する抗体の対照としてBHL培地を用いてELISAにより実施した。表II-1にスクリーニングの成績を示した。検査された565検体のハイブリドーマの培養上清中、ELISA陽性を示したのは38検体であったが、その内、26検体はBHL培地成分に対する抗体であった。次に、M. hyopneumoniae 抗原に対して陽性の値を示した12株のハイブリドーマについて、3種の豚由来マイコプラズマを用いてコロニー・ブロット法により再スクリーニングを行った。その結果、表II-2に示したように M. hyopneumoniae に対して特異性の高い8株のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマが得られた。この他、使用された3種類全ての菌種と反応する抗体や M. hyopneumo-

niaeとM. flocculareあるいはM. hyorhinisとの共通抗原を認識していると思われる抗体など、種々のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマが得られた。

表Ⅱ-1 各種抗原を用いたELISAによるハイブリドーマ培養上清のスクリーニング

抗原			陽性 ハイブリドーマ数	合計
無処理菌体	Tween20可溶化	BHL培地		
+ ¹⁾	—	—	3	12
+	+	—	8	
—	+	—	1	

—	—	+	5	26
+	—	+	14	
—	+	+	0	
+	+	+	7	

1)吸光度が陰性コントロール(P3U1細胞培養上清)よりも0.2以上高いものを陽性とした。

表Ⅱ-2 各種マイコプラズマを用いたコロニー・ブロット法によるスクリーニング

抗原			陽性数
<u>M. hyopneumoniae</u>	<u>M. hyorhinis</u>	<u>M. flocculare</u>	
+ ¹⁾	-	-	8
+	+	-	1
+	-	+	2
+	+	+	1

1)コロニーの発色を肉眼で判定した。

第2項 抗M. hyopneumoniaeモノクローナル抗体の性状解析

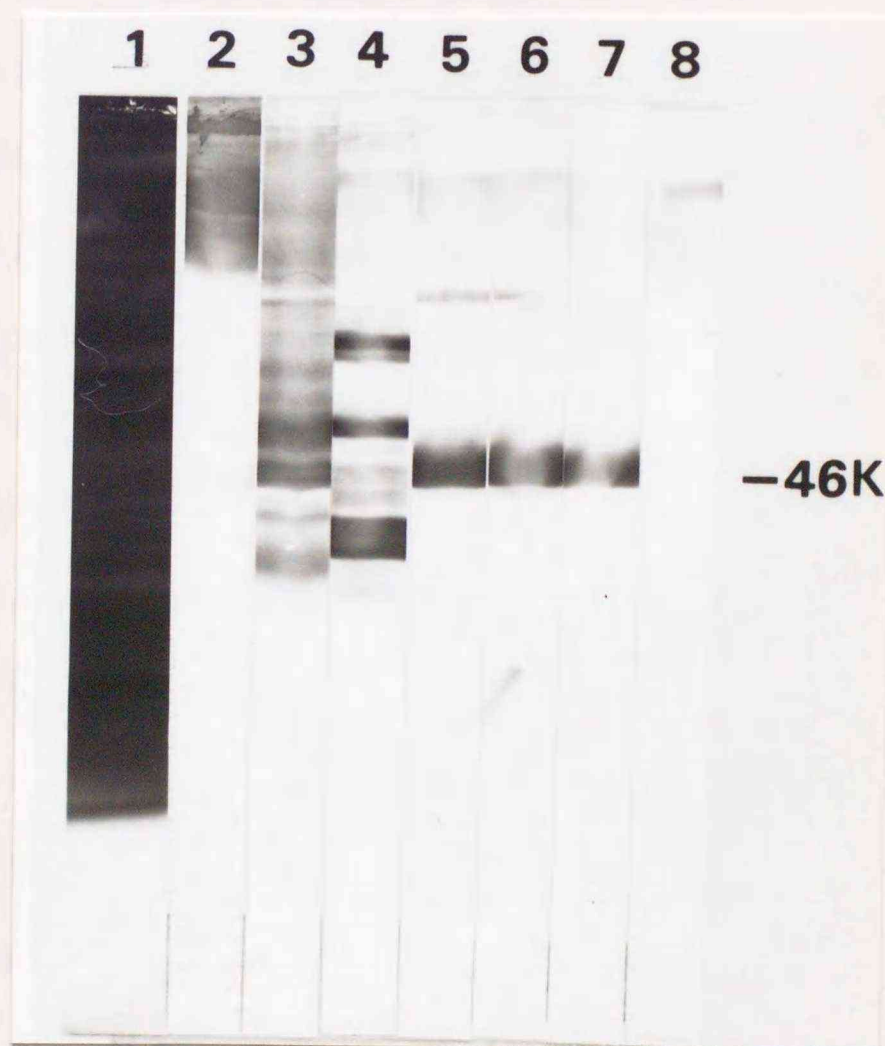
3回のクローニングの後、確立された12株のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマについて、その培養上清およびマウス腹水を用いて認識抗原の性状解析を行った。特に、豚に対して強い免疫原性を示すM. hyopneumoniaeの46Kd抗原との反応性に注目して分析を行った。

表Ⅱ-3 M. hyopneumoniaeの46Kd抗原認識モノクローナル抗体(MAb)とM. flocculareおよびM. hyorhinisとの交差反応性

MAb	抗原		
	<u>M. hyopneumoniae</u>	<u>M. flocculare</u>	<u>M. hyorhinis</u>
14-4-4	+ ¹⁾	-	-
17-3-5	+	-	-
8-1-2	+	+	-
J-160	+	+	-
36-6-6	+	+	+

1) コロニーブロット法における発色を肉眼で判定した。

まず、コロニーブロット法(表Ⅱ-3)およびウエスタンブロット法による分析の結果(図Ⅱ-1)から、これらのモノクローナル抗体を表Ⅱ-4に示したようなAからGまでの7種類に分類した。今回樹立された12種類のモノクローナル抗体の内、5つの抗体(14-4-4, 17-3-5, 8-1-2, J-160, 36-6-6)がM. hyopneumoniaeの46Kd抗原と反応することが示されたが、それらは他の豚由来マイコプラズマとの交差反応性の違いから、AからCの3種類に分類された。この他、ウエスタンブロット法において、M. hyopneumoniaeの53Kdと50 Kdの位置に2本のバンドを形成する抗体(25-6-6)、3本のバンドを形成する抗体(J-30-1-4)、高分子の位置に幅の広いバンドを形成する抗体(E-7-1-4, J-168-1, J-49-1)および高分子から低分子の領域にかけて不規則な陽性像を示す抗体(5-1-7, 73-1-1)などが得られた。

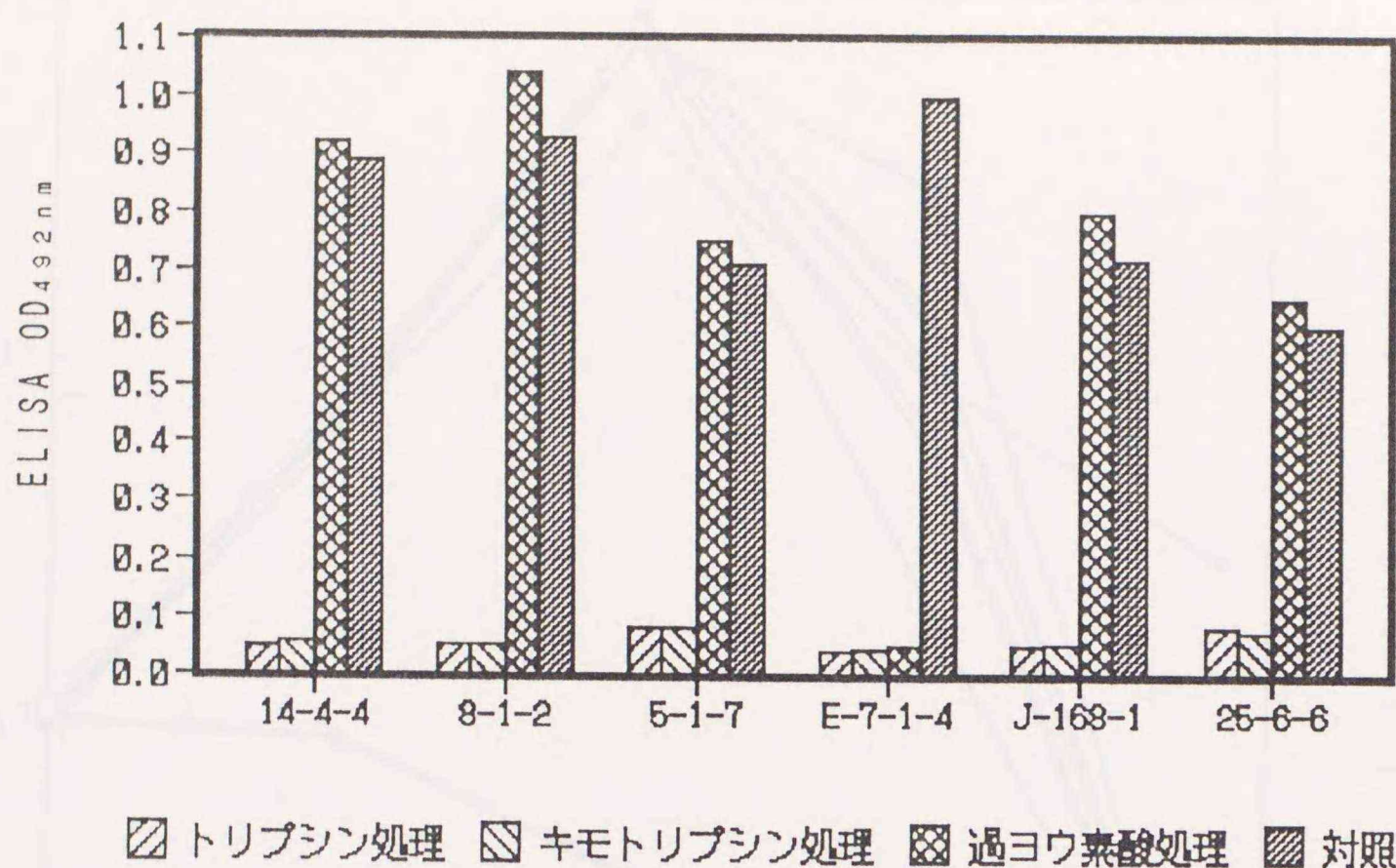


図Ⅱ-1. 抗M. hyopneumoniaeモノクローナル抗体のウエスタンブロット像
ストリップNo1: 転写後の蛋白染色、
2: E-7-1-4, 3: 5-1-7, 4: J-30-1-4
5: 36-6-6, 6: 8-1-2, 7: 14-4-4
8: 標識抗体対照

表 II - 4 M. hyopneumoniae に対するモノクローナル抗体の性状

	抗体	免疫グロブリン	認識抗原	
A	14-4-4	IgA	46Kd	
	17-3-5	IgG3	46Kd	
B	8-1-2	IgG1	46Kd	<u>M. flocculare</u> と交差
	J-160	IgG1	46Kd	//
C	36-6-6	IgG1	46Kd	<u>M. hyorhinis</u> と交差
D	5-1-7	IgG1	?	
	73-1-1	IgG2a	?	
E	25-6-6	IgG1	53Kd, 50Kd	
F	J-30-1-4	IgG1	?	
G	E-7-1-4	IgM	糖蛋白(?)	<u>M. hyopneumoniae</u> を凝集
	J-168-1	IgM	糖蛋白(?)	//
	J-49-1	IgM	糖蛋白(?)	//

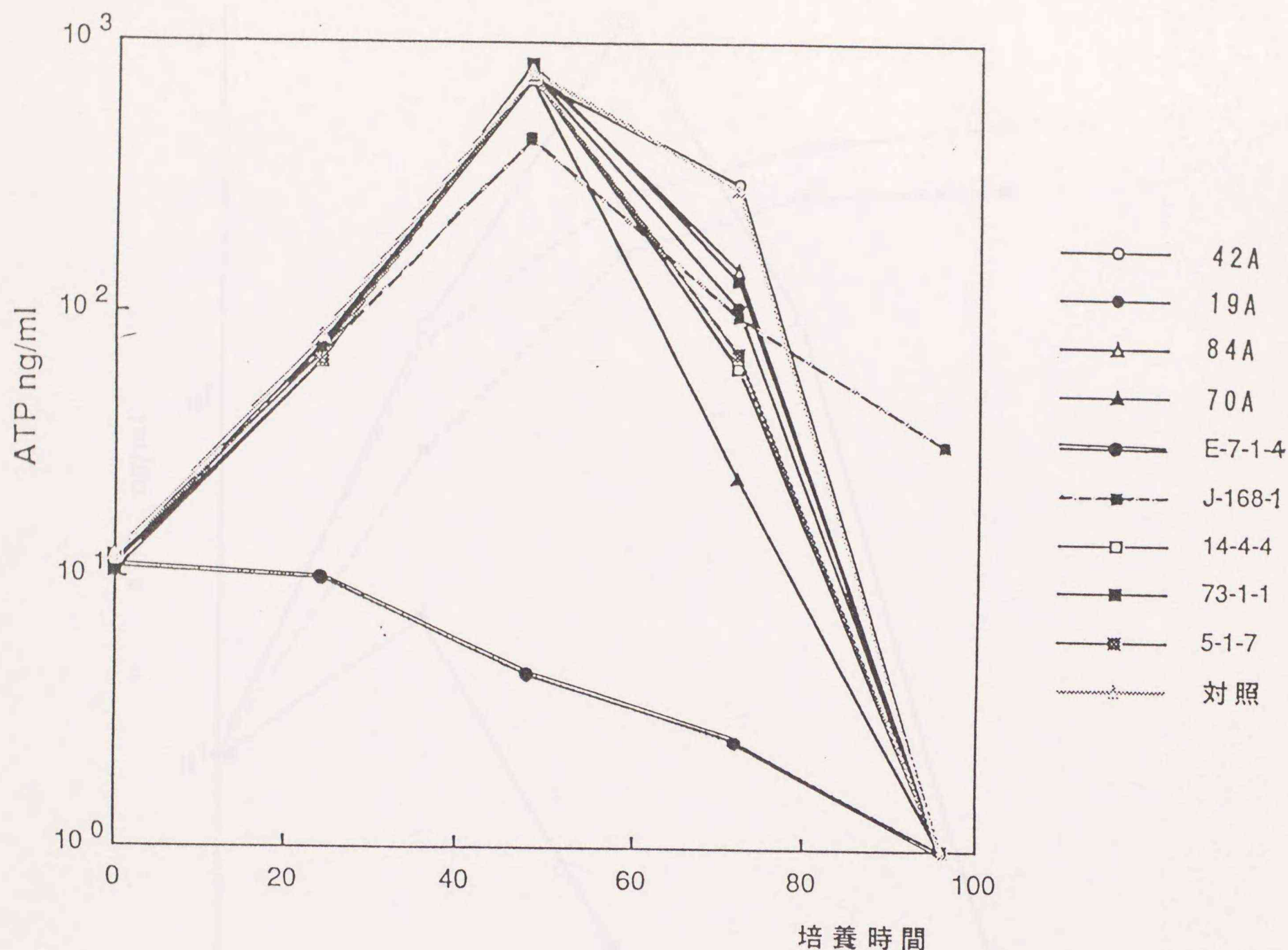
そこで、これらのモノクローナル抗体が認識している抗原の性状を詳しく調べるために、発育抑制試験、凝集試験、菌体による吸収試験等を行うとともに、抗原を蛋白分解酵素あるいは過ヨウ素酸で処理した後、モノクローナル抗体との反応性を検討した。その結果、モノクローナル抗体E-7-1-4がM. hyopneumoniaeの発育を阻止することが明らかとなった。この発育阻止モノクローナル抗体の性状については次項で詳しく説明する。腹水を用いた凝集反応では、モノクローナル抗体E-7-1-4、J-168-1およびJ-49-1がM. hyopneumoniaeを特異的に凝集した。また、全てのモノクローナル抗体は無処理のM. hyopneumoniae菌体で吸収することにより、各認識抗原との反応性は失われた。また、M. hyopneumoniae全菌体あるいはTween20可溶化抗原を用いたELISAにおいて、モノクローナル抗体添加前に抗原吸着プレートのウェルをトリプシンあるいはキモトリプシンで処理することにより、全てのモノクローナル抗体との反応性が消失あるいは低下した。一方、過ヨウ素酸で処理した場合には、モノクローナル抗体E-7-1-4との反応性は消失しが、他のモノクローナル抗体では処理しない対照抗原との反応と同じか、かえって強く反応する傾向が認められた（図II-2）。



図Ⅱ-2 トリプシン、キモトリプシンおよび過ヨウ素酸処理 M. hyopneumoniae 抗原に対するモノクローナル抗体の反応性

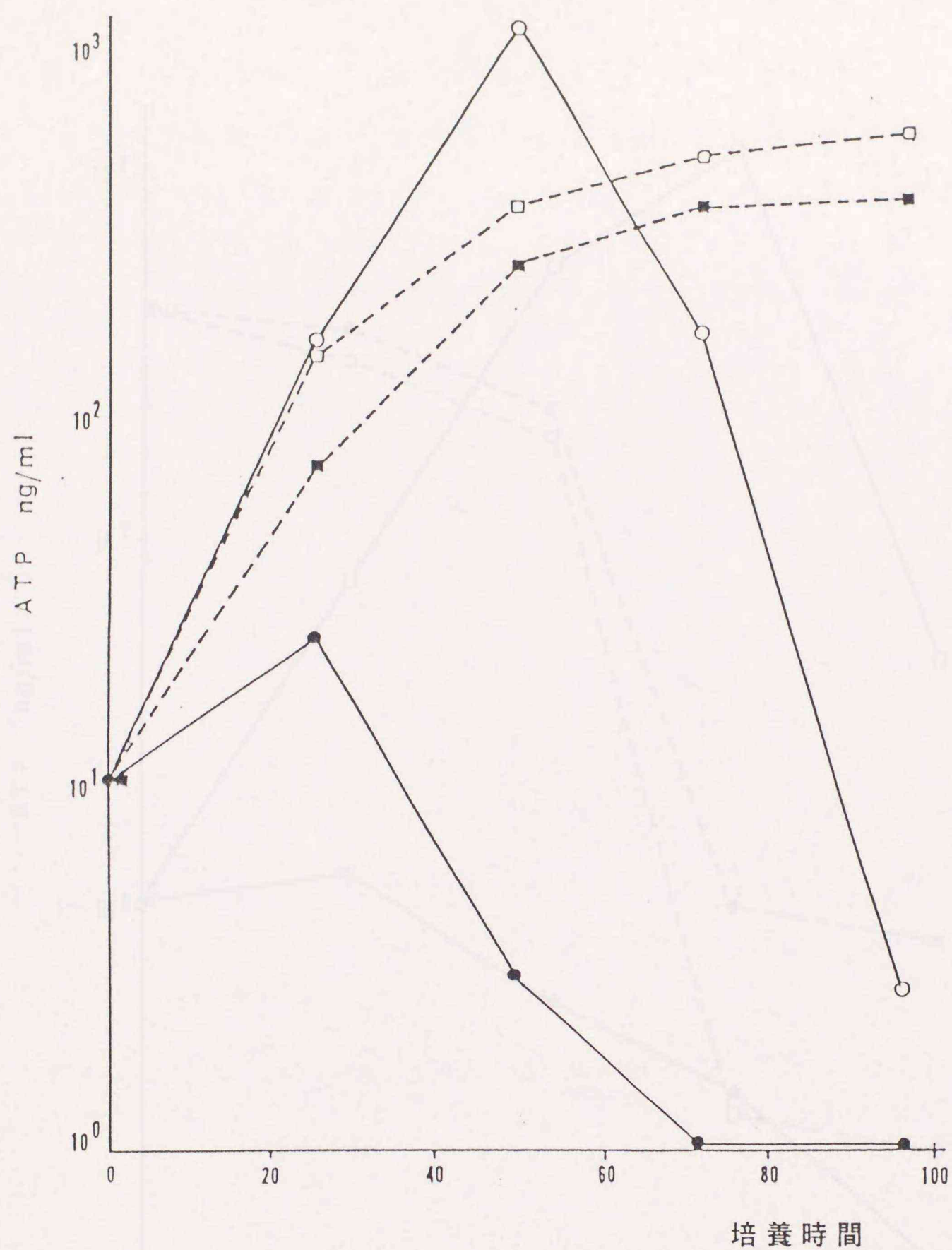
第3項 M. hyopneumoniae 発育阻止モノクローナル抗体の性状

M. hyopneumoniae を特異的に凝集するモノクローナル抗体の内、モノクローナル抗体 E-7-1-4 が M. hyopneumoniae の発育を阻止した。この発育阻止は、培養液中の ATP 濃度を M. hyopneumoniae の増殖の指標とする方法によって検出された。モノクローナル抗体 E-7-1-4 (腹水) を培養液に最終濃度 1% に添加することにより ATP 濃度の上昇は完全に抑えられたが、同時に試験した他の 8 種類のモノクローナル抗体では M. hyopneumoniae の増殖と共に ATP 濃度が上昇し発育抑制作用は認められなかった (図Ⅱ-3)。この発育阻止効果は振盪培養した場合には認められたが、静置培養では認められなかった (図Ⅱ-4)。さらに、このモノクローナル抗体 E-7-1-4 は M. hyopneumoniae の増殖を抑えるが、モノクローナル抗体添加培地の pH は無添加培地と同様に低下することから、M. hyopneumoniae の代謝抑制効果はないものと思われた (図Ⅱ-5)。



図Ⅱ-3. 種々のモノクローナル抗体添加培地における *M. hyopneumoniae* の増殖。各モノクローナル抗体(腹水)を最終濃度1%にBHL培地に添加した。42A, 19A, 84Aおよび70Aはミズーリ大学Wise博士より分与を受けた抗 *M. hyopneumoniae* モノクローナル抗体。

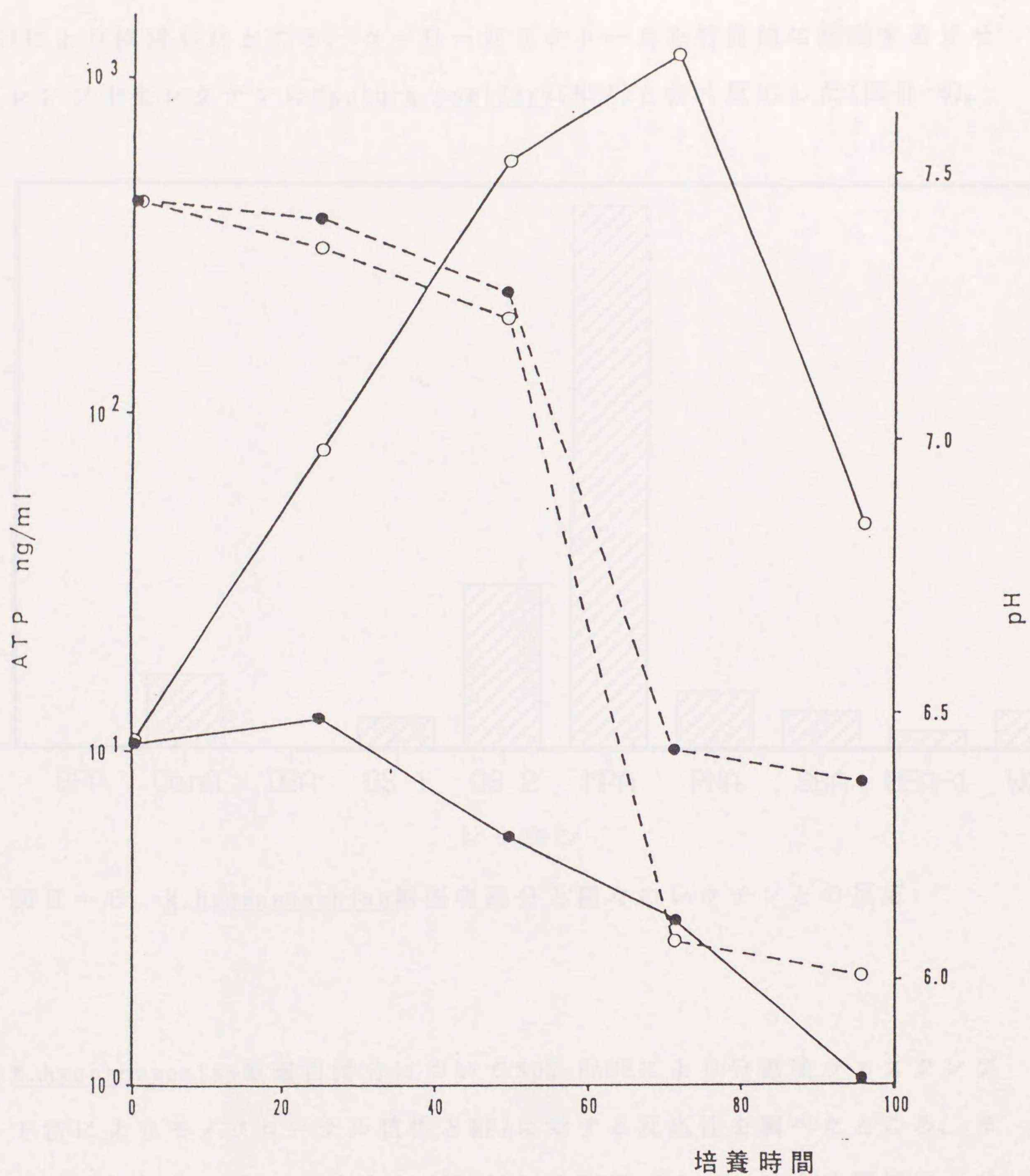
この *M. hyopneumoniae* 発育阻止モノクローナル抗体E-7-1-4が認識する抗原は、抗体との反応性が過ヨウ素酸および蛋白分解酵素によって失われることから糖蛋白であることが示唆された(図Ⅱ-2)。そこで、*M. hyopneumoniae* より糖蛋白成分を抽出し、モノクローナル抗体との反応性を調べたところ発育阻止活性を持つE-7-1-4も含めて *M. hyopneumoniae* 凝集活性を有するモノクローナル抗体は *M. hyopneumoniae* の糖蛋白画分と強く反応することが明らかとなった。



図II-4. モノクローナル抗体(MAb)E-7-1-4添加培地における *M. hyopneumoniae* の増殖 (振盪培養と静置培養の比較)。

硫安塩析により部分精製したMAbE-7-1-4を最終濃度2%に添加した。

- : 振盪培養 (Mab添加)、 ○—○ : 振盪培養 (Mab無添加)、
- : 静置培養 (Mab添加)、 □---□ : 静置培養 (Mab無添加)



図Ⅱ-5. モノクローナル抗体(MAb)E-7-1-4添加および無添加培地における *M. hyopneumoniae* の増殖と pH の変化。

硫酸塩析により部分精製した MAbE-7-1-4 を最終濃度 2% に添加した。

- | | |
|--------------------|--------------------|
| ●—● : ATP (Mab添加)、 | ○—○ : ATP (Mab無添加) |
| ●--● : pH (Mab添加)、 | ○--○ : pH (Mab無添加) |

さらに、この *M. hyopneumoniae* の糖蛋白画分と種々のレクチンとの反応性を ELISA により検討したところ、 α -D-ガラクトースを特異的に認識するオサゲオレンジ由来レクチンの *Maclura pomifera* (MPA) と強く反応した (図 II-6)。

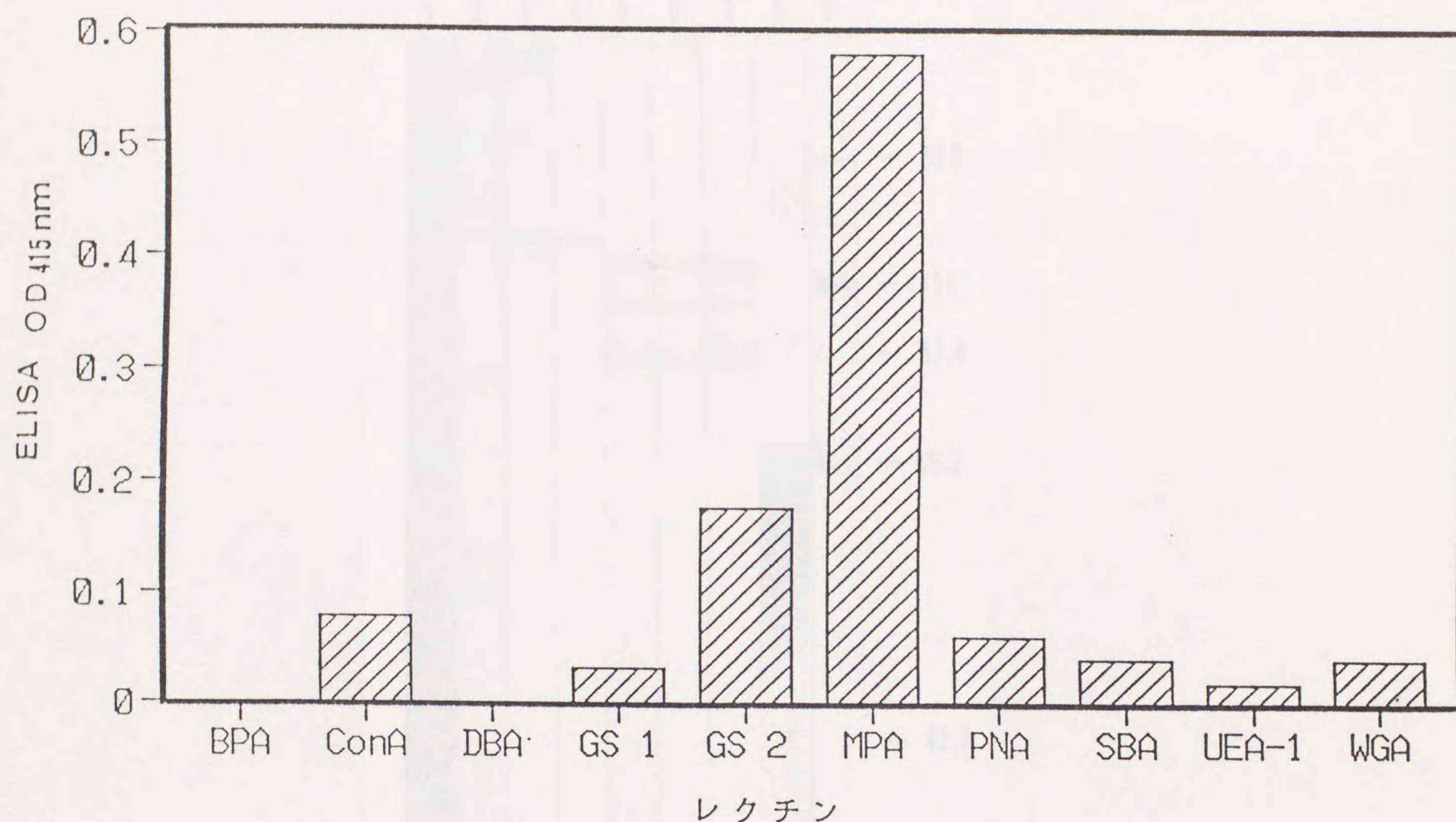
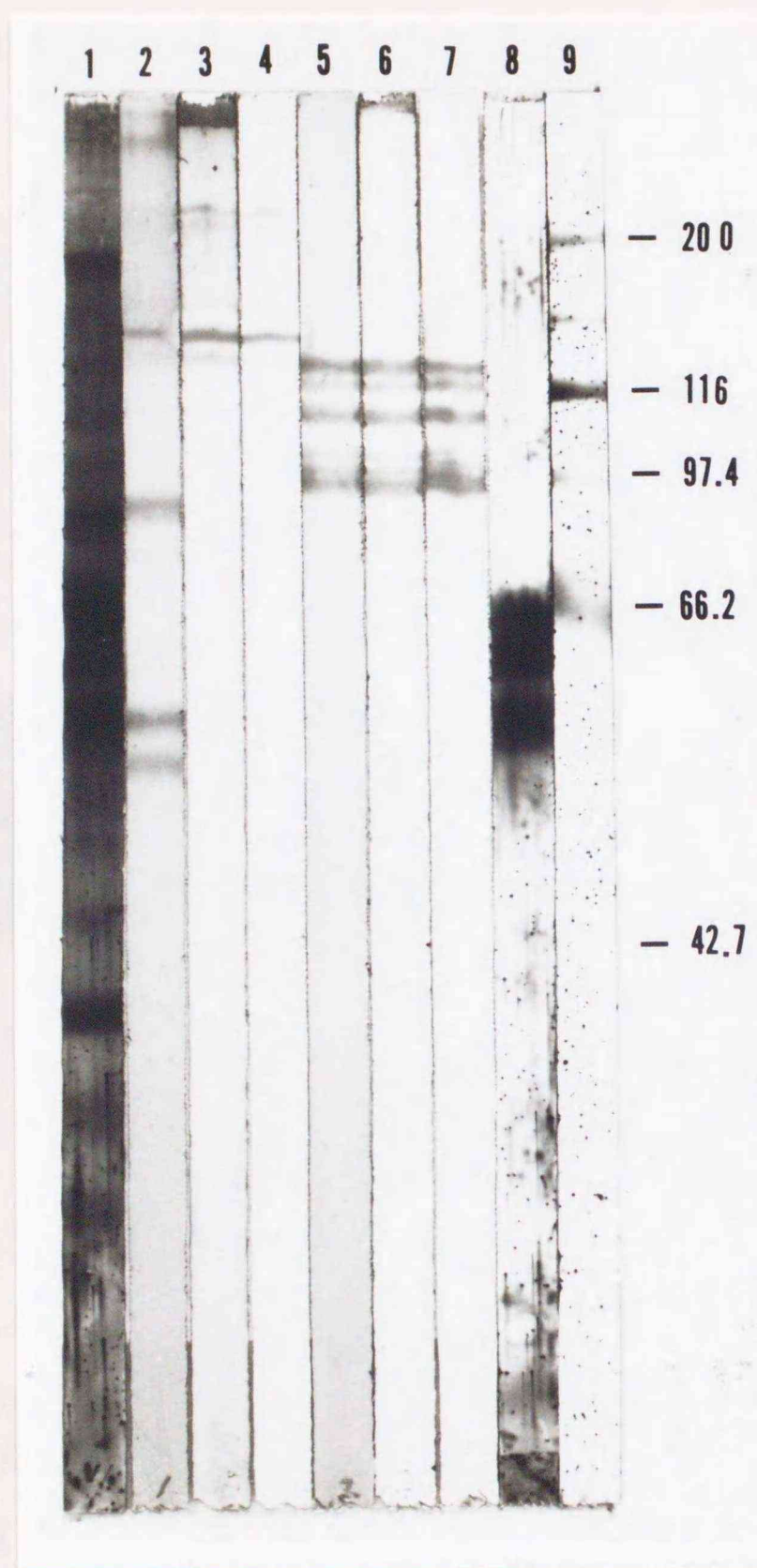


図 II-6. *M. hyopneumoniae* 糖蛋白画分と種々のレクチンとの反応

この *M. hyopneumoniae* 糖蛋白画分について SDS-PAGE により分画後ウェスタンブロット法によりモノクローナル抗体と MPA に対する反応性を調べたところ、モノクローナル抗体 E-7-1-4、J-168-1 及び MPA の反応パターンは全く同様で、分子量約 97Kd から 147Kd の間に 5~6 本のバンドを形成した (図 II-7)。この E-7-1-4 抗体と *M. hyopneumoniae* 細胞との反応性を免疫電顕法により観察したところ、抗マウス IgM 標識金コロイドが *M. hyopneumoniae* 細胞表面に密に付着している像が見られ、E-7-1-4 抗体が認識している抗原が *M. hyopneumoniae* 表面に一様に存在していることが明らかとなった (図 II-8)。一方、*M. hyopneumoniae* 発育阻止モノクローナル抗体の性状を調べていく過程で、E-7-1-

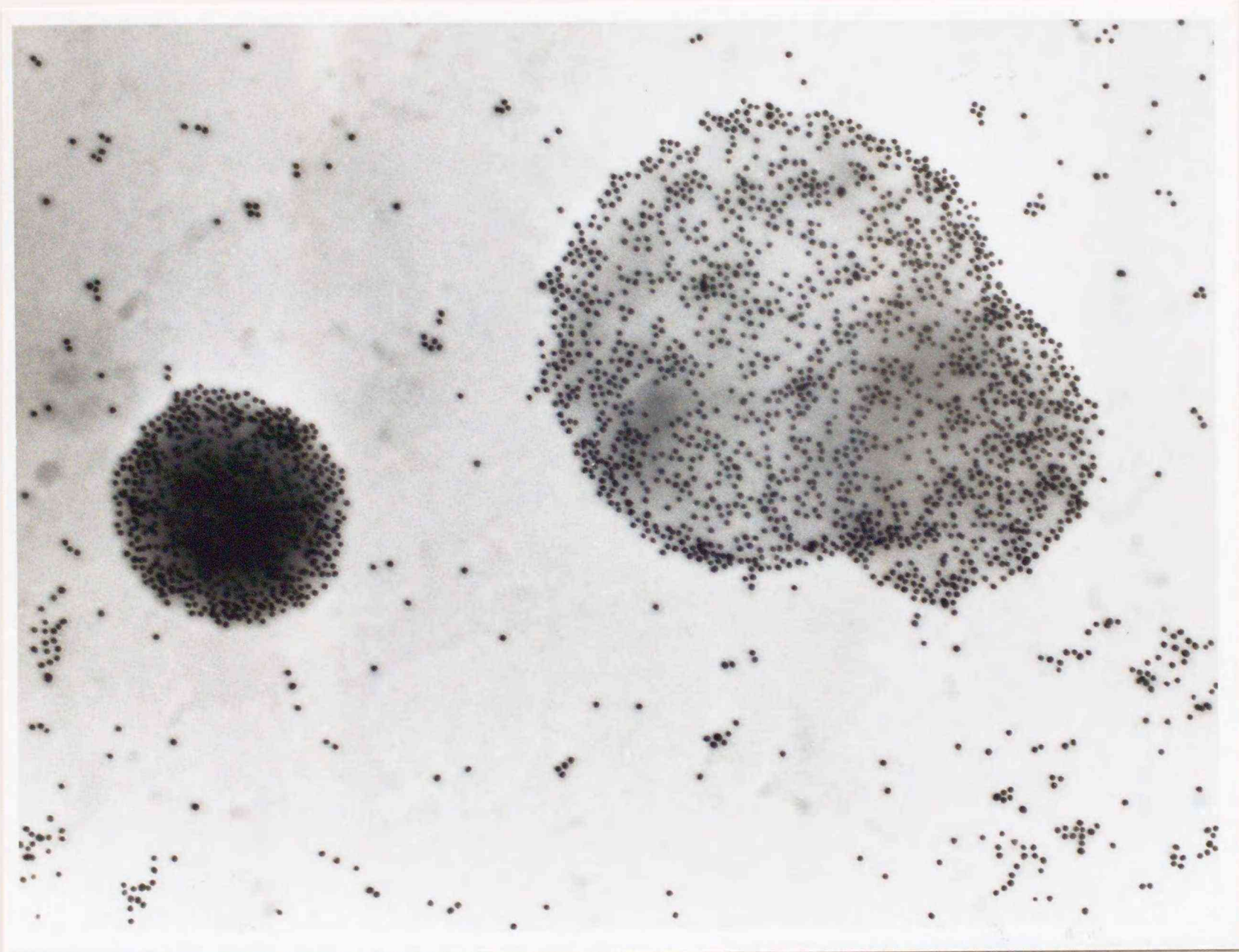
4抗体が豚血清と交差反応を示すことが明かとなった。そこで、豚血清から *M. hyopneumoniae*糖蛋白抽出法と同様の方法により糖蛋白を抽出し、モノクロ



図Ⅱ－7. *M. hyopneumoniae*由来および豚血清由来糖蛋白のモノクローナル抗体 (MAb) E-7-1-4, J-168-1およびMPAレクチンに対するウェスタンブロット像の比較

- Strip No. 1. 豚血清由来糖蛋白 (蛋白染色)
 2. 豚血清由来糖蛋白 + MPA
 3. 豚血清由来糖蛋白 + MAbE-7-1-4
 4. 豚血清由来糖蛋白 + MAbJ-168-1
 5. *M. hyopneumoniae*由来糖蛋白 + MPA
 6. *M. hyopneumoniae*由来糖蛋白 + MAbE-7-1-4
 7. *M. hyopneumoniae*由来糖蛋白 + MAbJ-168-1
 8. *M. hyopneumoniae*由来糖蛋白 (蛋白染色)
 9. 分子量マーカー (Kd)

ーナル抗体とMPAレクチンとの反応性をウエスタンブロット法によって解析した。その結果、図Ⅱ-7に示したように M. hyopneumoniae 由来糖蛋白と豚血清由来糖蛋白のモノクローナル抗体E-7-1-4、J-168-1およびMPAに対するウエスタンブロット像は全く異なっていることが明らかとなった（図Ⅱ-7）。



図Ⅱ-8. モノクローナル抗体E-7-1-4と反応させた M. hyopneumoniae の免疫電子顕微鏡像
抗マウスIgM標識金コロイド（直径約20nm）を2次抗体として用いた。

考察

第1章において、M. hyopneumoniae の46Kd抗原は豚に対して免疫原性が強く、血清学的診断上有用な指標になると述べたが、今回の実験において作製された抗 M. hyopneumoniae モノクローナル抗体の中にも、46Kd抗原と反応するモノクローナル抗体が多数存在した。しかし、ウエスタンブロット法による分

析において分子量約46Kdの位置にバンドを形成するモノクローナル抗体であっても、他の豚由来マイコプラズマと交差反応を行った場合反応性が異なるものがあった。すなわち、46Kd抗原と反応するモノクローナル抗体のうち、14-4-4と17-3-5はM. hyopneumoniae とのみ特異的に反応したが、36-6-6はM. hyorhinisとM. flocculareの両者に、また8-1-2とJ-160はM. flocculareとのみ反応した。これらのことから、SDS-PAGEの1次元の電気泳動では同一の位置に複数の成分が泳動されてくることが考えられるので、同じ46Kdの分子量をもつM. hyopneumoniaeの抗原成分が複数存在し、それらの中にはM. hyopneumoniaeに対して特異的なものと、他の豚由来マイコプラズマとも交差するものがあることが示唆された。このことに関して、最近、FutoらはSDS-PAGEによって46Kdの位置に泳動されるM. hyopneumoniae成分をゲルから切り出し、それをさらに2次元電気泳動によって分析すると、分子量約46Kdの位置に等電点の異なる蛋白スポットが少なくとも4つ以上出現すると述べている（私信）。著者は、M. hyopneumoniae46Kd抗原に対する特異性の高いモノクローナル抗体を多数得ることに成功したことから、同一分子量で性状の異なる抗原が存在しても、このモノクローナル抗体を用いて抗原を精製することが可能となった。この方法によって血清学的診断法の特異性が改善されることが期待される。

現在までに、種々のマイコプラズマに対して様々なモノクローナル抗体が作製されている。Wiseら⁶³⁾およびYoungら⁶⁶⁾は、M. hyopneumoniaeに対する数種のモノクローナル抗体を作製し、本菌の抗原成分の分析に用いている。それによると、65Kd、50Kd、44Kdおよび41Kd抗原に対するモノクローナル抗体を作製したが、これらのモノクローナル抗体のうち、44Kd抗原に対するモノクローナル抗体の1つがM. flocculareと交差反応を示したが、他の抗体はすべてM. hyopneumoniaeに対して特異的であったと報告している。彼らはまた検査した抗原の中で65Kdと44Kdが豚に対して免疫原性が強かったと述べている。Wiseらの44Kd抗原と著者の46Kd抗原とは同一と考えられるが、彼らが作製した複数の抗44Kdモノクローナル抗体の中にM. flocculareと交差反応を示

す抗体があったことは著者の成績とよく一致する。さらに、彼らはこの44Kd抗原蛋白に複数の抗原決定基が存在し、その中に特異性の高い抗原決定基と交差反応を示す決定基が存在すると考察している。しかし、先に述べたFutoらの成績から考えると、むしろ分子量が同一あるいは近似している異なった蛋白抗原が電気泳動では同一のバンドとして認められる蛋白の中に存在する可能性の方が高いと考えられる。

マイコプラズマに対して発育阻止活性を示すモノクローナル抗体としては、山羊伝染性胸膜肺炎の病原体 M. mycoides subsp. capri に対する抗体が1例報告されているのみである⁵²⁾。しかし、この発育阻止モノクローナル抗体が認識している抗原については全く明らかにされていない。今回確立された M. hyopneumoniae 発育阻止活性を有するモノクローナル抗体は、同時に M. hyopneumoniae 凝集活性を持っていたために従来の菌数測定法では正確な定量が困難であった。しかし、今回用いたATP濃度より菌の増殖を測定する方法はこの問題を解決し、しかもきわめて迅速に菌の増殖を定量することが可能となった。発育阻止活性を有するモノクローナル抗体E-7-1-4が認識する抗原は、M. hyopneumoniae の糖蛋白の糖鎖部分である可能性が示されたが、同一抗原のペプチド部分を認識していると思われるJ-168-1抗体が発育阻止を示さない点は非常に興味深い。E-7-1-4抗体が豚血清の糖蛋白と交差反応を示すことから、M. hyopneumoniae が培養中に豚血清の糖蛋白成分を特異的に吸着した可能性が示唆された。しかし、血清糖蛋白と M. hyopneumoniae 由来糖蛋白のE-7-1-4抗体およびMPAレクチンに対するウエスタンブロット像は全く異なっていた。このことは血清成分の吸着を全く否定するものではないが、M. hyopneumoniae の培養中に培地に添加された血清の糖蛋白成分が単純に吸着したものではないと考えられる。

モノクローナル抗体E-7-1-4による M. hyopneumoniae 発育阻止の機構は現在全く不明である。しかし、今回確立された発育阻止モノクローナル抗体が認識する抗原は M. hyopneumoniae の増殖に深く関わっていると思われ、マイコプラズマの抗体による発育阻止の機構を解明する上で興味深い。また、E-7-1-

4抗体が豚血清糖蛋白成分と交差反応を示したことは、M.hypopneumoniaeの表面に豚の血清成分と共通抗原性を持つ成分が存在することを示唆している。病原体などの侵入を受けた宿主は、それが“非自己”であることを認識することが重要であるが、本菌のように表面に宿主の成分と類似した物質が存在する場合には、“非自己”として認識されにくい、あるいはこの物質に対して抗体が産生されにくい等の可能性が考えられる。今後、マイコプラズマ肺炎の発病機構、特に本菌が宿主の感染防御機構を回避して増殖する機序等を研究する上で、このようなM.hypopneumoniaeの表面構造の特徴は重要であると思われる。

第3章 抗M. hyopneumoniaeモノクローナル抗体を用いた豚マイコプラズマ肺炎の血清学的診断と分離菌株の迅速同定

要旨

M. hyopneumoniaeの分子量46Kd表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いて抗原を精製し、ダブルサンドウィッチELISAにより、M. hyopneumoniae感染豚の抗体検出法を開発した。このモノクローナル抗体を用いたELISAは特異的で抗体検出感度の高いことが明らかとなった。本法をM. hyopneumoniae実験感染豚の抗体応答の検査に用いたところ、M. hyopneumoniae鼻腔内接種後3～4週目から抗体が検出され、CF抗体がほとんど検出できない接種後40週目でも抗体の検出が可能であった。また、野外における自然感染豚の抗体応答を経時的に観察したところ、移行抗体の推移とその後の感染抗体の上昇を的確にとらえることが可能であった。さらに、種豚場を対象としてM. hyopneumoniaeに対する抗体の保有状況の全国調査を実施したところ、抗体の陽性率は85%以上に達し、わが国の大部分の種豚場がM. hyopneumoniaeによって汚染されている実態が明らかとなった。一方、今回得られたモノクローナル抗体のうち、M. hyopneumoniaeを特異的に凝集するモノクローナル抗体(E-7-1-4)を用い、凝集反応によるM. hyopneumoniaeの同定法も確立した。

材料と方法

1. モノクローナル抗体

第2章で作製したモノクローナル抗体14-4-4, 17-3-5およびE-7-1-4を使用した。

2. ELISAの術式

モノクローナル抗体(マウス腹水)を炭酸緩衝液(pH9.5)で至適濃度に希釈後、0.1mlずつ96穴マイクロプレートの各ウェルに分注した。4℃で1夜感作した後、洗浄し、Tween20で可溶化したM. hyopneumoniae菌体成分を添加し室温で2時間反応させた。その後再び洗浄し、1:100に希釈した被検血清を0.1ml加え室温で3時間反応させた。洗浄後、至適濃度に希釈したペルオキシダーゼ標識抗豚IgG血清を添加、室温で2時間感作した。洗浄後、酵素基質と

して2 mM o-フェニレンジアミン二塩酸塩と3%過酸化水素水を添加、室温で5~15分間反応させた後3 M硫酸で反応を停止させ、波長492nmの吸光度をマイクロプレート用吸光度計 (MTP-22、コロナ社) により測定した。

3. 豚血清

1)実験感染豚血清: 第1章で作製した実験感染豚の血清を用いた。

2)自然感染豚血清: 病理学的に豚マイコプラズマ肺炎と診断された豚が多発した農家を選択し、出産前の母豚の血清および出生直後から1ヶ月間隔で採血した子豚の血清を用いた。

3)種豚場における血清の採取: 各都道府県の家畜保健衛生所が選択した種豚場を対象とし、生後3~4ヶ月齢時及び屠場出荷時の2回採血して得た血清について検査を行った。採血した豚については、出荷時における肺病変の有無についても調査した。

4. 補体結合 (CF) 反応

CF反応抗原の作製法および術式はMoriら³⁹⁾の方法に準じて実施した。

5. スライド凝集反応

M. hyopneumoniae培養液1.5mlを10,000Xg10分間遠心し、沈渣を10 μ lのPBSに再浮遊させ、等量のE-7-1-4抗体とスライドグラス上で混合した。

成績

第1項 モノクローナル抗体を用いたELISAによる豚マイコプラズマ肺炎の血清学的診断

1. ELISAの術式の検討

モノクローナル抗体を利用して抗原を精製し、血清学的診断法への応用を図る場合、そのモノクローナル抗体が認識している抗原に対する宿主の抗体応答態度が重要な問題となる。第1章で述べたようにM. hyopneumoniae抗原の中で46Kd抗原に対して感染豚は強い抗体応答を示すことから、今回得られたモノクローナル抗体の内、M. hyopneumoniae46Kd抗原と特異的に反応する14-4-4と17-3-5の2つのモノクローナル抗体の応用を試みた。モノクローナル抗体はマウスで作製した腹水を用い、反応術式の概要は図Ⅲ-1に示した通りで

モノクローナル抗体(14-4-4) 0.1ml/ウェル

↓ 4℃ 1夜

洗 浄

抗原 0.1ml/ウェル

↓ 室温 2時間

洗 浄

血清(1:100) 0.1ml/ウェル

↓ 室温 3時間

洗 浄

ペルオキシダーゼ標識抗豚IgG 0.1ml/ウェル

↓ 室温 2時間

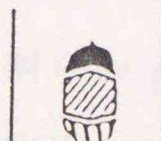
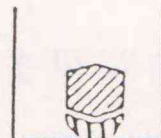
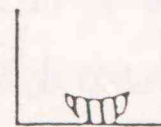
洗 浄

基質 0.1ml/ウェル

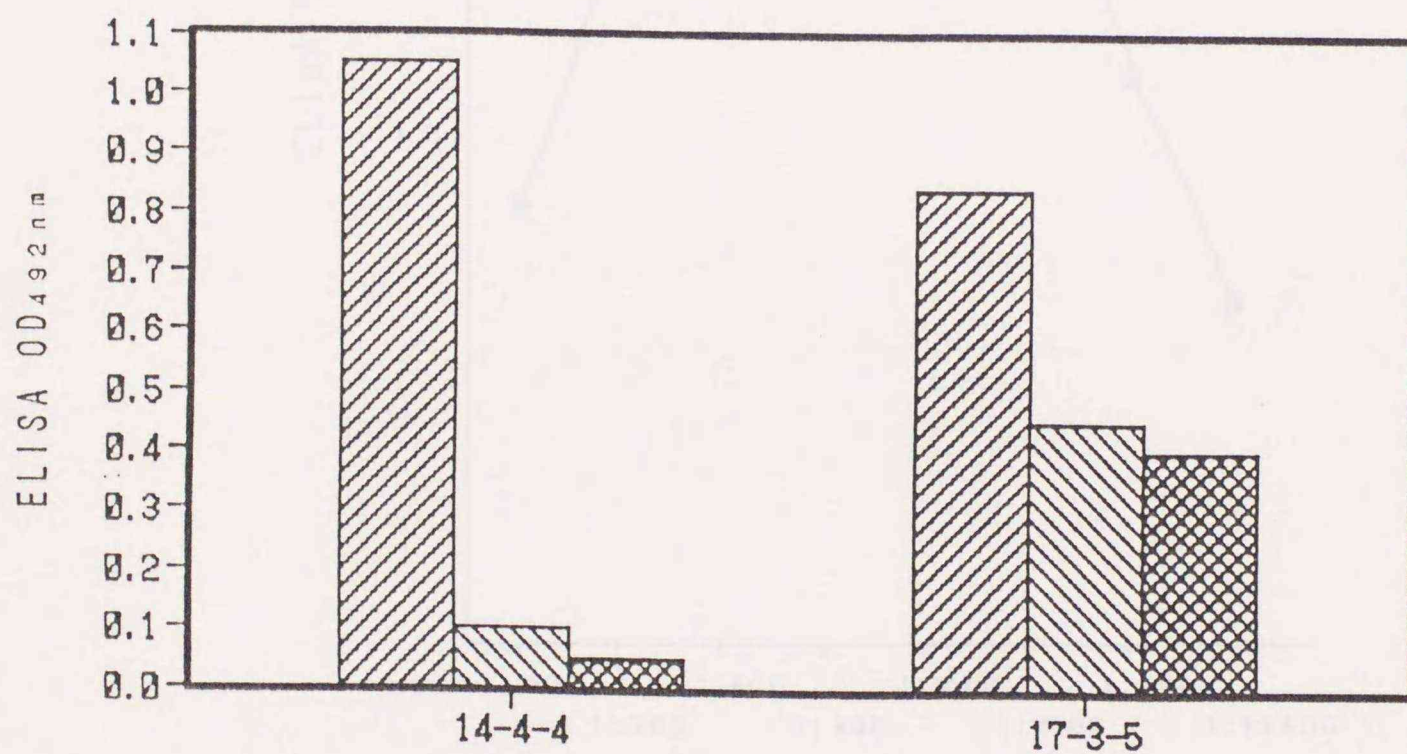
↓ 室温 15分

2N硫酸 0.1ml/ウェル

↓ 吸光度測定



図Ⅲ-1. ダブルサンドウィッチELISAの術式



モノクローナル抗体

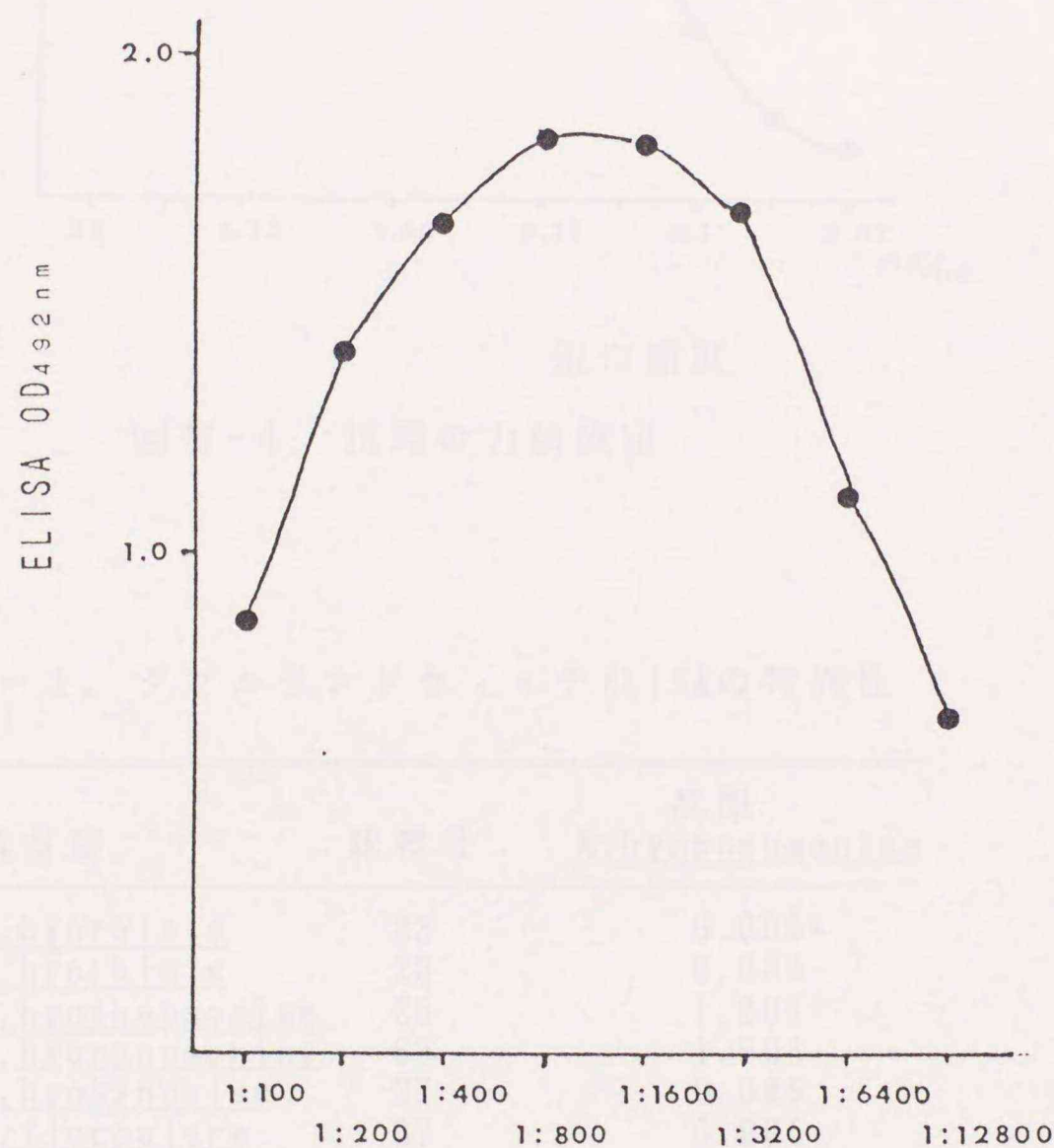
▨ 陽性血清

▤ 陰性血清

▩ 標識抗体対照

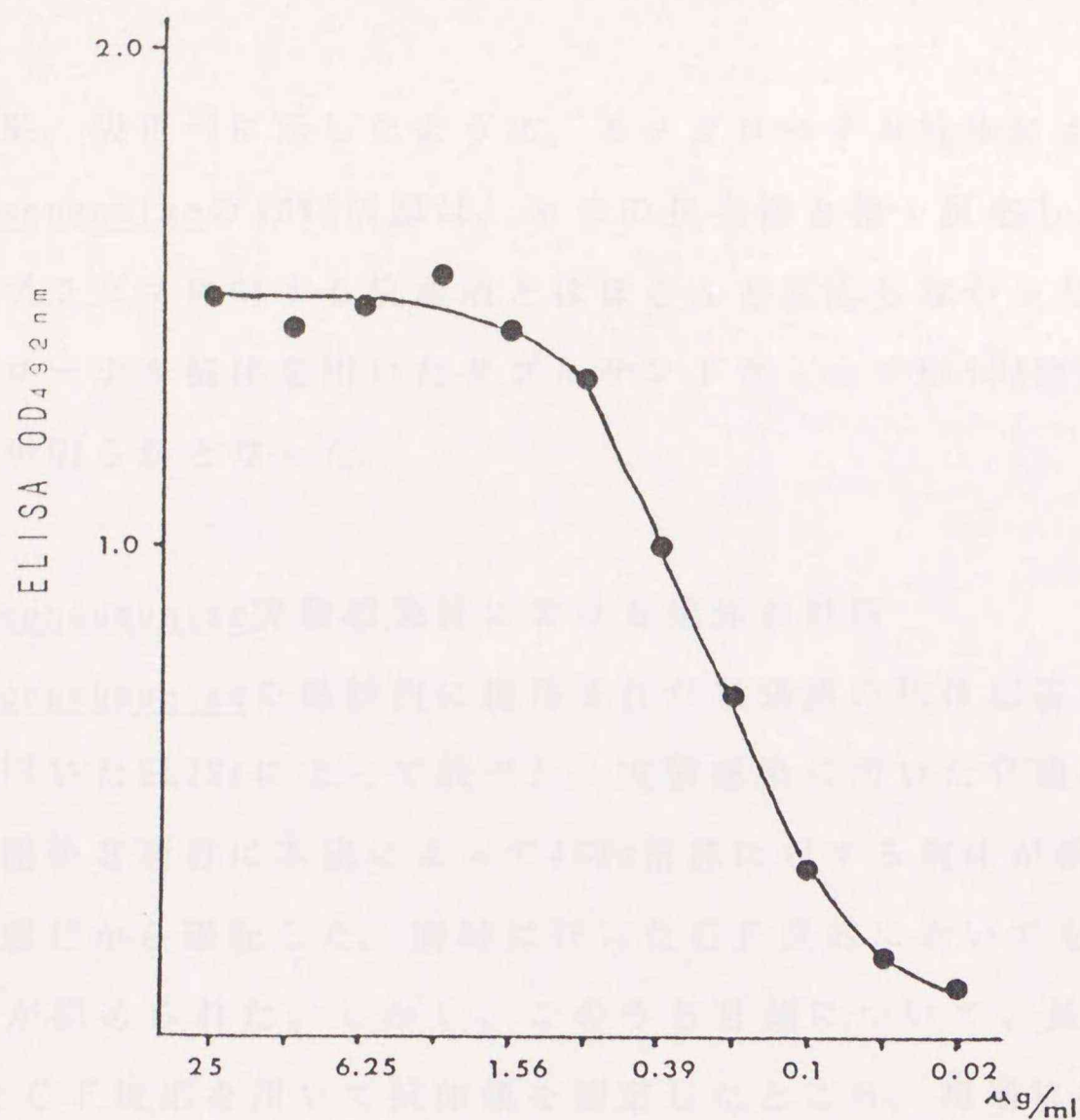
図Ⅲ-2. 異なるモノクローナル抗体を用いたダブルサンドウィッチELISAによる抗体価の比較

ある。抗原捕捉用のモノクローナル抗体として14-4-4と17-3-5を比較すると、14-4-4を用いた方が非特異的に標識抗体が結合する率が少ないことから、1次抗体としては14-4-4を用いることとした（図Ⅲ-2）。モノクローナル抗体の使用濃度は、実験感染豚の血清とTween20可溶化抗原を用いた力価検定試験の成績（図Ⅲ-3）から1:1,000希釈と決定した。ELISA用の抗原としては、Tween20により46Kd抗原が効率的に可溶化されることが明らかとなったので、Tween20処理抗原を用いた。抗原の至適濃度は蛋白濃度約1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった（図Ⅲ-4）。



抗体希釈

図Ⅲ-3. モノクローナル抗体の力価検定



蛋白濃度

図Ⅲ-4. 抗原の力価検定

表Ⅲ-1. ダブルサンドウィッチELISAの特異性

抗血清	豚番号	抗原
		<i>M. hyopneumoniae</i>
<i>M. hyorhinis</i>	22	0.085*
<i>M. hyorhinis</i>	23	0.039
<i>M. hyopneumoniae</i>	25	1.201
<i>M. hyopneumoniae</i>	63	1.908
<i>M. hyosynoviae</i>	27	0.028
<i>M. flocculare</i>	37	0.065
<i>M. flocculare</i>	38	0.031

* ELISA O.D.

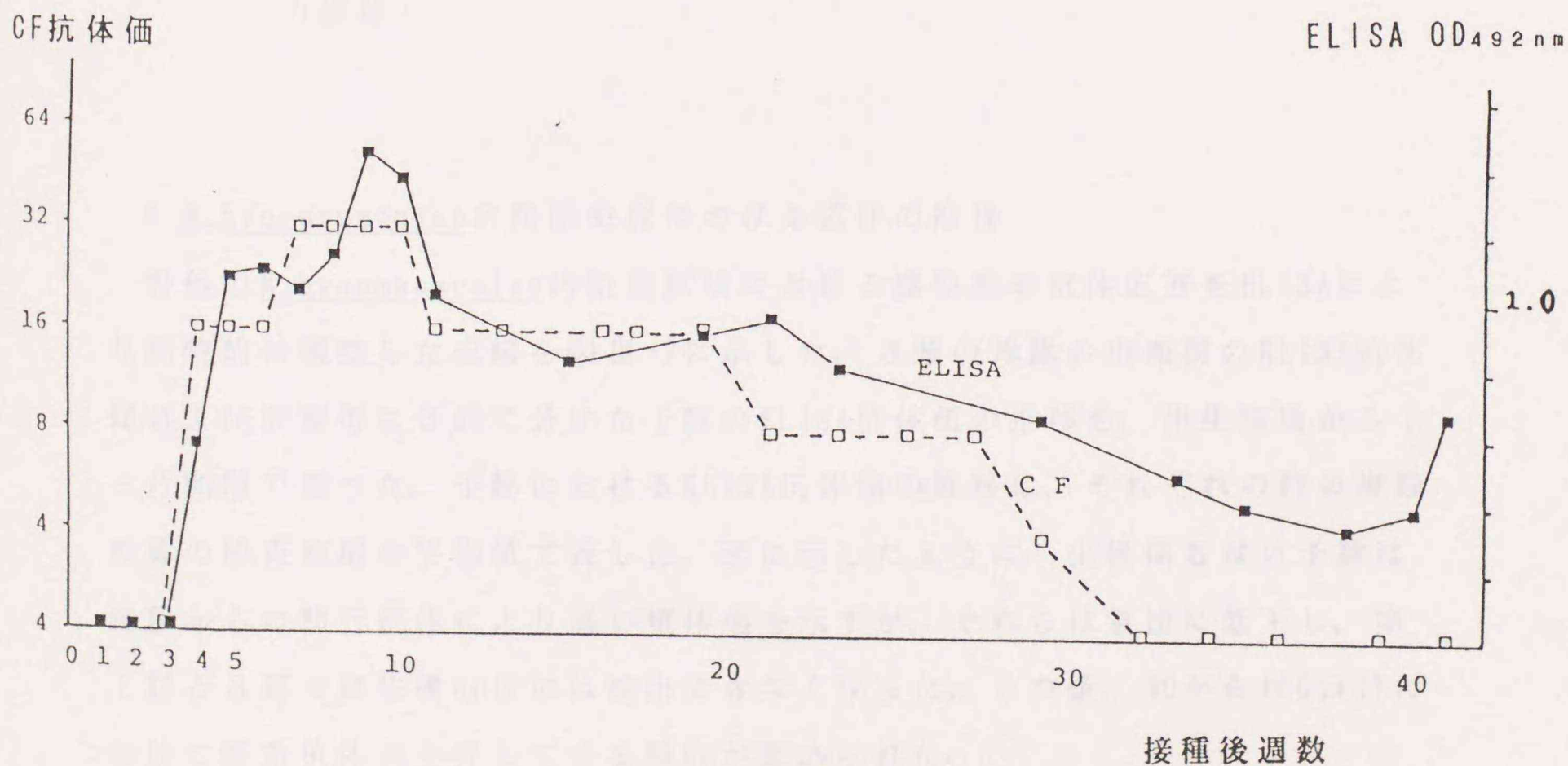
2. ダブルサンドウィッチELISAの特異性

モノクローナル抗体14-4-4を用いたELISAの特異性を検討するために、各種豚由来マイコプラズマに対する抗血清を用い、交差反応試験を実施した。

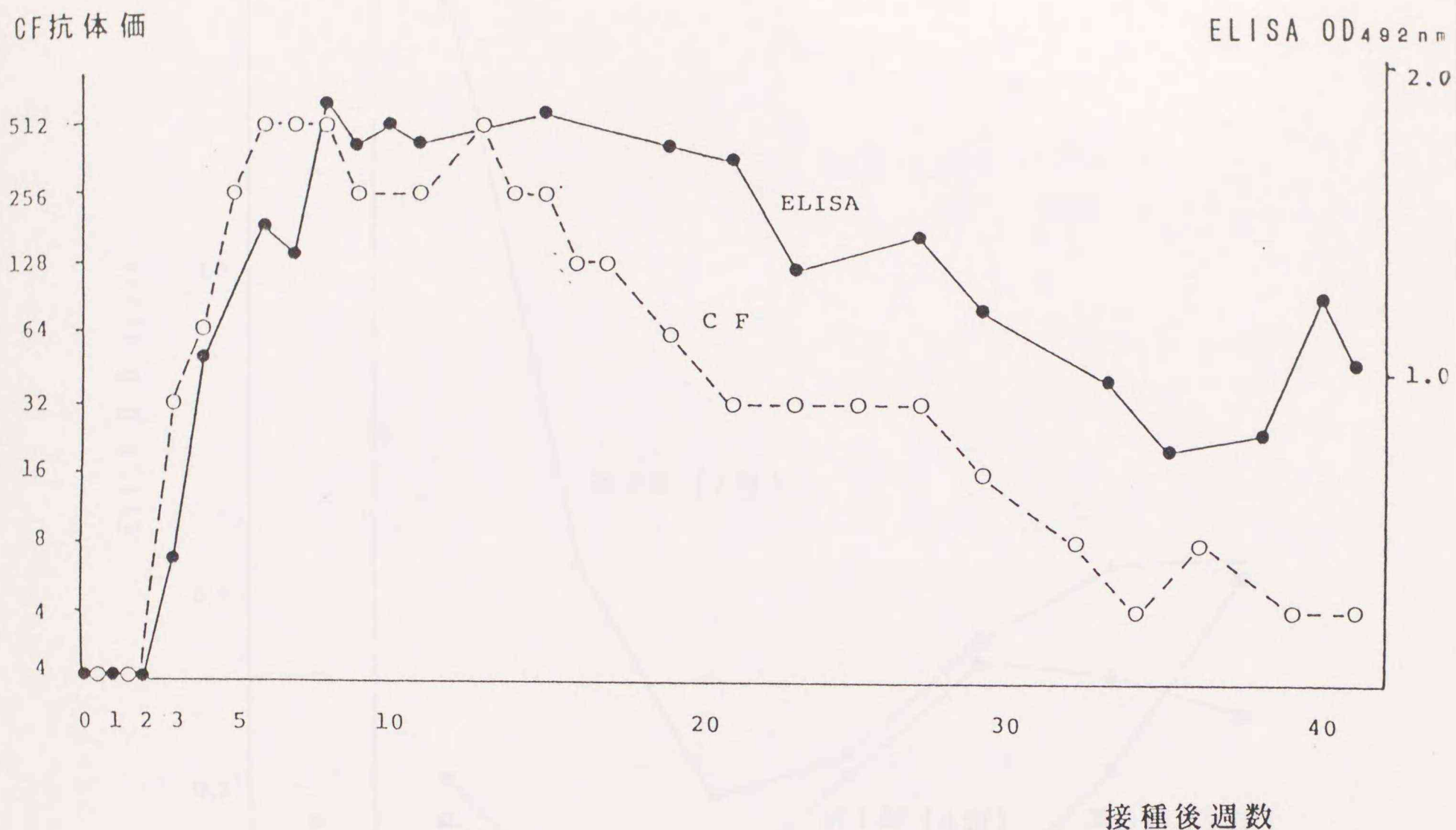
その結果、表Ⅲ-1に示したように、モノクローナル抗体によって捕捉された *M. hyopneumoniae* の46Kd抗原は、ホモの抗血清と強く反応したが、他の豚由来マイコプラズマに対する抗血清とはほとんど反応しなかった。このように、モノクローナル抗体を用いたダブルサンドウィッチELISAは高い特異性を有することが明らかとなった。

3. *M. hyopneumoniae* 実験感染豚における抗体の推移

M. hyopneumoniae を鼻腔内に接種された無菌豚の抗体応答をモノクローナル抗体を用いたELISAによって調べた。実験感染に用いた6頭の豚のうち5頭では、接種後3週目に本法によって46Kd抗原に対する抗体が検出され、残り1頭も4週目から陽転した。同時に行ったCF反応においてもほぼ同時期に抗体産生が認められた。しかし、このうち2頭について、長期間にわたってELISAとCF反応を用いて抗体価を測定したところ、初期抗体は両試験でほぼ同時期から検出できたのに対して、28週以後ではCF抗体の方が早期に低下し、陽性限界以下となったが、ELISA抗体は長期間にわたって検出された（図Ⅲ-5および図Ⅲ-6）。



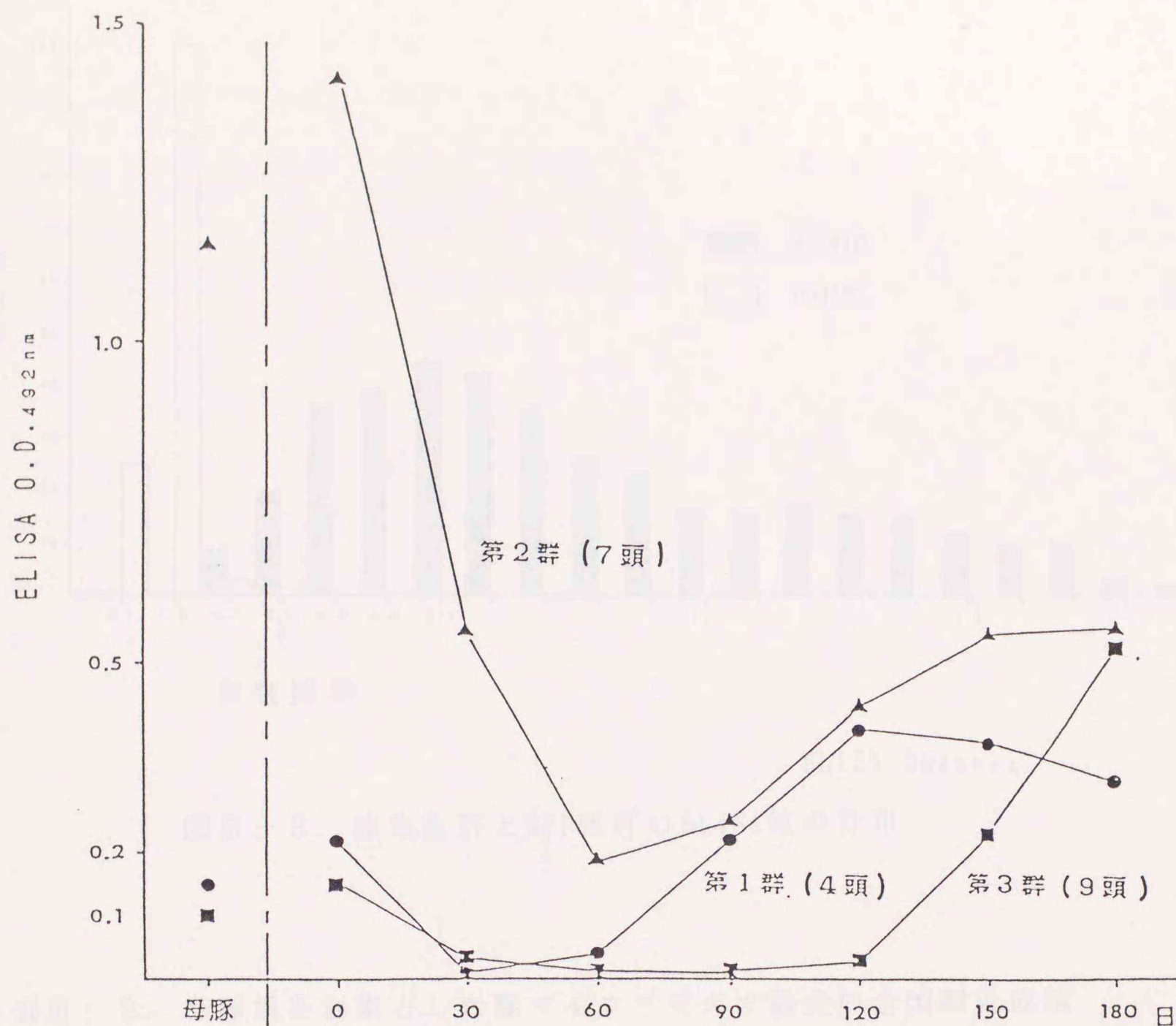
図Ⅲ-5. *M. hyopneumoniae* 実験感染豚 (No.2) におけるELISAおよびCF抗体価の推移



図Ⅲ-6 M. hyopneumoniae実験感染豚 (No.3) におけるELISAおよびCF抗体価の推移

4. M. hyopneumoniae自然感染豚における抗体の推移

野外のM. hyopneumoniae汚染養豚場における感染豚の抗体応答をELISAにより経時的に観察した成績を図Ⅲ-7に示した。3頭の母豚の出産前のELISA抗体価および同腹毎に3群に分けた子豚のELISA抗体価の推移を、出生直後から1ヶ月間隔で調べた。子豚におけるELISA抗体価の推移は、それぞれの群の複数の豚の検査成績を平均値で表した。図に示したように、生後間もない子豚は母豚からの移行抗体により高い抗体価を示すが、それらは急速に低下し、第1群と3群では生後30日には検出できなくなった。その後、90から150日目にかけて感染抗体が上昇してくる傾向が認められた。

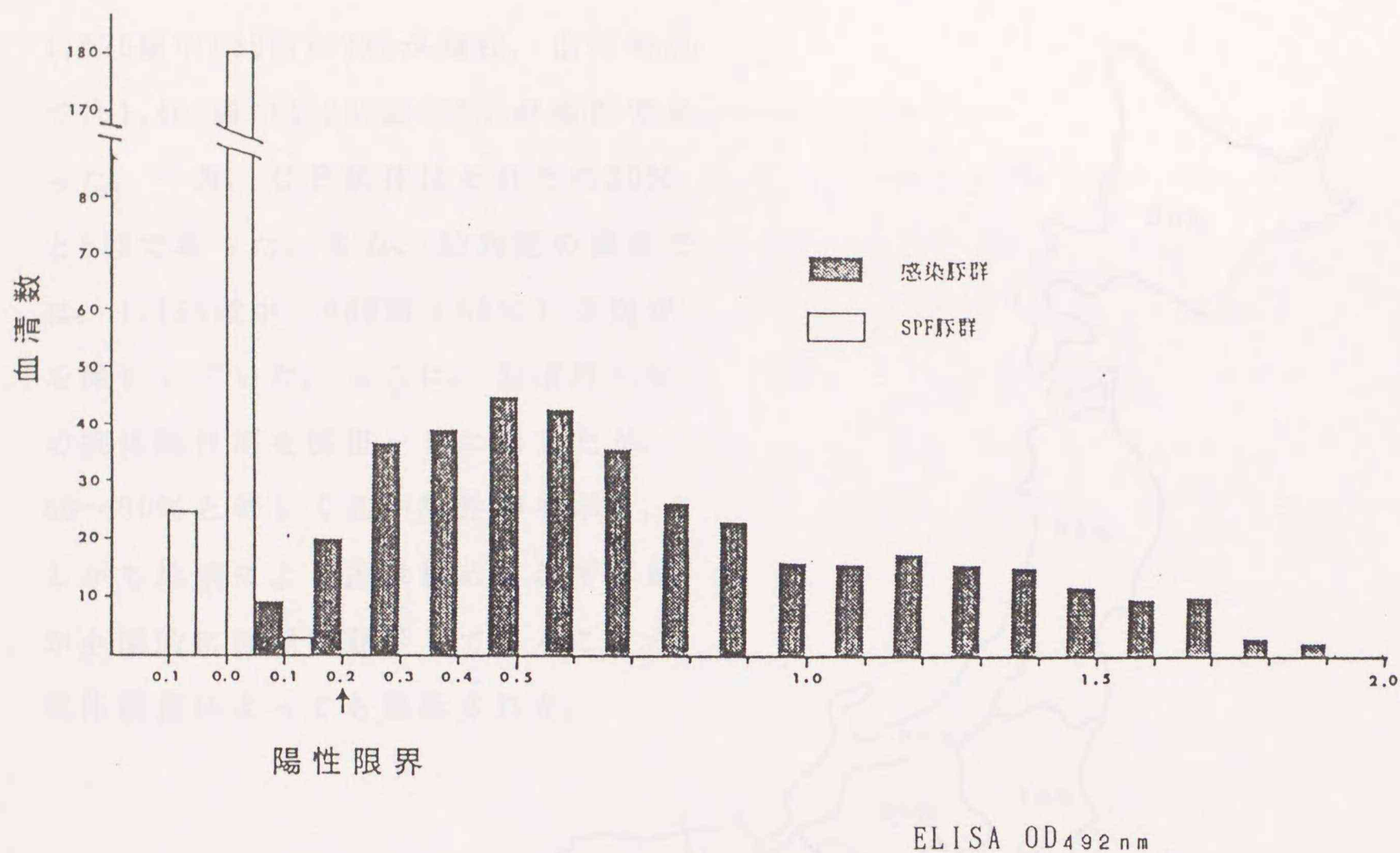


図Ⅲ-7 自然感染豚におけるELISA抗体価の推移

5. M. hyopneumoniaeに対する抗体保有状況の全国調査

各都道府県の1から2カ所の種豚場を対象として血清を集め、M. hyopneumoniaeに対する抗体を検査すると共に、屠場出荷時点における豚マイコプラズマ肺炎様肺病変の保有状況について検査を実施した。一方、抗体陽性の判定基準を設定するために、2カ所のSPF養豚場より218例の豚血清を集め、陰性対照血清として用いた。

調査した大部分の養豚場において豚マイコプラズマ肺炎の発生が認められ、それらの豚のELISA値とSPF豚のELISA値の分布を比較すると図Ⅲ-8のようになった。この図から明らかなように、SPF豚のELISA値がほとんど0.1以下であっ



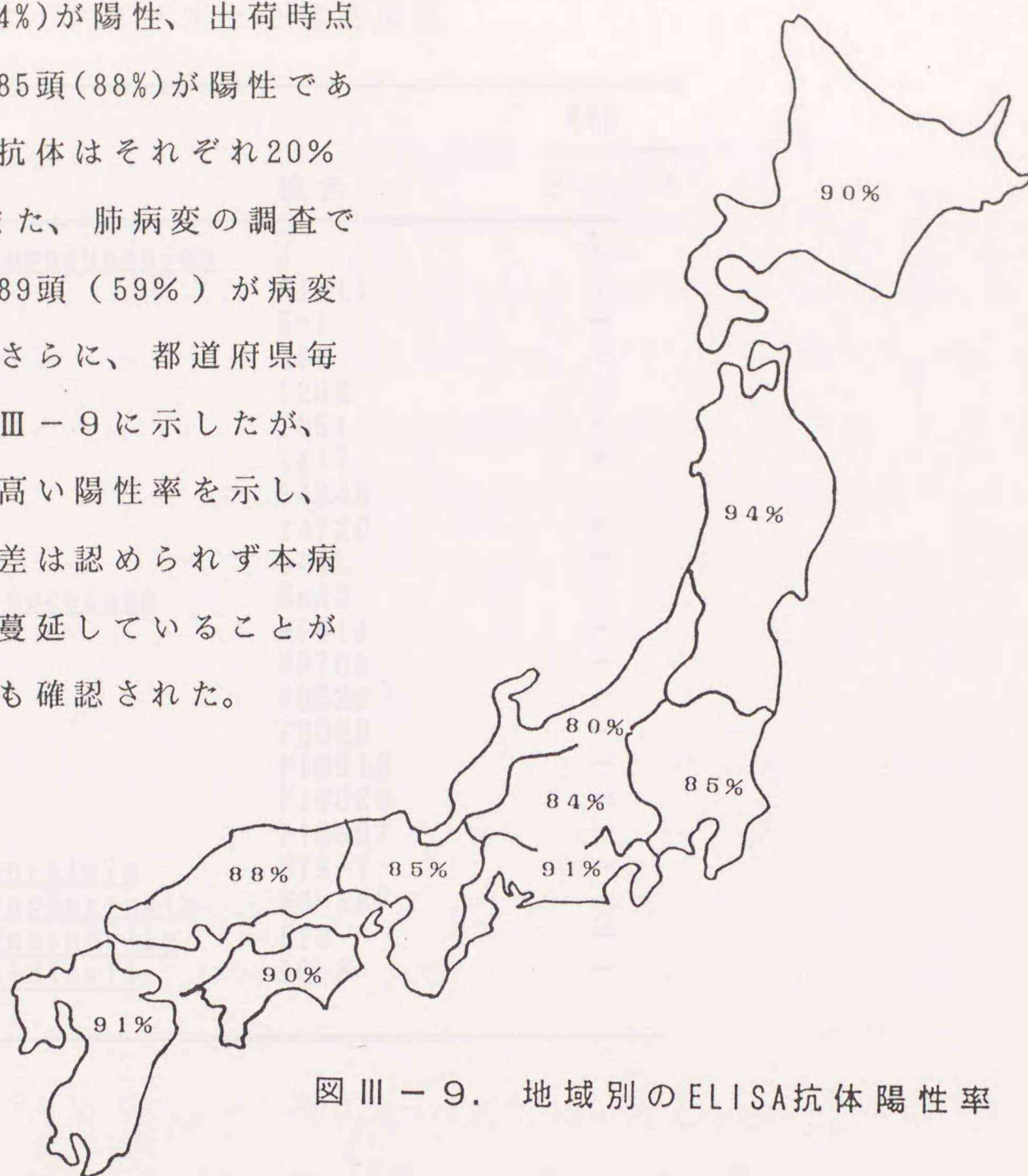
図Ⅲ－８．感染豚群とSPF豚群のELISA値の分布

表Ⅲ－２．種豚場を対象とした豚マイコプラズマ肺炎の全国調査成績

	ELISA		CF		肺病変
	12-16週 齢	出荷時	12-16週 齢	出荷時	出荷時
検査頭数	1,575	1,461	1,086	1,126	1,158
陽性頭数	698(44%)	1,285(88%)	215(20%)	575(51%)	689(59%)
陰性頭数	886	176	871	551	475

たのに対して、感染群では大部分が0.1以上の高いELISA値を示し広範囲に分布した。そこで、SPF豚群において、少数ではあるがELISA値0.1～0.2を示す個体が存在することを考慮に入れ、陽性限界値として0.2を選択し、ELISA値0.2以上を示したものを抗体陽性と判定することとした。このような判定基準に従って、今回の調査成績をまとめると表Ⅲ－２の様な結果となった。ELISA

抗体陽性は3～4ヶ月齢時点で検査数1,575頭中689頭(44%)が陽性、出荷時点では1,461頭中1,285頭(88%)が陽性であった。一方、CF抗体はそれぞれ20%と51%であった。また、肺病変の調査では、1,158頭中689頭(59%)が病変を保有していた。さらに、都道府県毎の抗体陽性率を図Ⅲ-9に示したが、80～90%と著しく高い陽性率を示し、しかも地域による差は認められず本病が全国的に濃厚に蔓延していることが抗体調査によっても確認された。



図Ⅲ-9. 地域別のELISA抗体陽性率

第2項 モノクローナル抗体を用いた凝集反応によるM. hyopneumoniae同定

M. hyopneumoniae凝集活性を有するモノクローナル抗体E-7-1-4, J-168-1とJ-49-1の内、最も強い凝集活性を示すE-7-1-4抗体を同定に応用した。供試したM. hyopneumoniae 10株、M. flocculare 8株とM. hyorhinis、M. hyopharyngis、M. hyosynoviaeおよびAcholeplasma laidlawiiのそれぞれ1株のうち、モノクローナル抗体E-7-1-4はM. hyopneumoniaeのみを特異的に凝集した(表Ⅲ-3)。この凝集はいずれのM. hyopneumoniae株でも1分以内に起こり、極めて迅速に判定することが出来た。

表Ⅲ-3. モノクローナル抗体E-7-1-4を用いた
豚由来マイコプラズマの凝集反応

抗原	株名	MAb
		E-7-1-4
<u>M. hyopneumoniae</u>	J	+
	ST-11	+
	E-1	+
	232	+
	1262	+
	1361	+
	1417	+
	1424B	+
	1472C	+
	144L	+
	Ms42	-
<u>M. flocculare</u>	MP611	-
	MP703	-
	P6526	-
	P9020	-
	P10019	-
	P10020	-
	P18507	-
	BTS-7	-
<u>M. hyorhinis</u>	H3-6BF	-
<u>M. hyopharyngis</u>	S16	-
<u>M. hyosynoviae</u>	PG-8	-
<u>A. laidlawii</u>		

考察

豚マイコプラズマ肺炎を診断するために開発したダブルサンドウィッチ
ELISAによる抗体測定法は、M. hyopneumoniaeの分子量約46Kd表面抗原に対す
るモノクローナル抗体により特異抗原をマイクロプレート上に捕捉し、他の
抗原を洗浄除去することにより、捕捉された46Kd抗原に対する特異抗体のみ
を測定できるのが特徴である。このような方法により、モノクローナル抗体
を血清学的診断法に応用することは、診断法の特異性を高めるばかりでなく、
従来精製が困難であった抗原物質に対する抗体測定を可能とするものである。
これらのことは、将来、病原体のもつ種々の抗原に対する抗体を別々に測定
することを可能とするものであり、感染症の様々なステージ、すなわち、感
染初期、病勢の極期あるいは回復期等のそれぞれの時期を反映するような特

微的な抗体応答、あるいは宿主の免疫学的抵抗性について重要な知見を提供すると思われる。

ELISA用の抗原捕捉モノクローナル抗体として用いることが出来たのは、モノクローナル抗体14-4-4のみであった。同じ46Kd抗原を認識していると考えられるモノクローナル抗体17-3-5は、標識抗体の非特異的吸着が強く、バックグラウンドが高いためELISAに応用することが出来なかった。この原因は不明であるが、他の多くのモノクローナル抗体でも同じように非特異反応が強い傾向が認められた。このように、ある特定の抗原に対するモノクローナル抗体が得られても、それを用いて特異的な抗体検出の系を開発するのは必ずしも容易ではなかった。この非特異反応の原因は抗体ばかりでなく、プレートを変えることによって改善される場合がある等多数の原因が考えられるので、今後さらに検討することが必要である。

M. hyopneumoniae実験感染豚の抗体応答は、これまでに報告されたTween20可溶化抗原を用いたNicoletら⁴³⁾、あるいは、SDS可溶化抗原を用いたArmstrong^{1), 3)}やPiffer⁴⁶⁾らの成績とほぼ同様であった。野外の自然感染豚の抗体応答に関しては、これまでに経時的な測定報告はほとんどなされていない。しかし、著者らは、野外のM. hyopneumoniae自然感染豚の抗体価の推移を明らかにすると同時に、哺乳豚がM. hyopneumoniaeに対する高い移行抗体を保有することも明らかにした。Nicoletら⁴⁴⁾は、母豚の抗体検査を行う場合、血清よりも初乳の抗体を測定することにより、検出率が約1.5倍高くなると報告している。母豚の抗体検査を行うに当たって、血中抗体価が低く感染豚を摘発し得ない可能性があるが、初乳を検査することによって改善されると思われる。一方、Durisicら^{7), 8)}およびKobischら³¹⁾は、M. hyopneumoniaeの死菌あるいは細胞膜成分で母豚を免疫することによって、子豚の感染防御が成立したと報告している。また、野外における観察でも2ヶ月齢未満の子豚では本病の発生がほとんど見られないことから、移行抗体による感染防御が示唆されている。

M. hyopneumoniaeの同定法として現在一般に用いられる方法は、ウサギで作製された抗M. hyopneumoniaeポリクローナル抗体を用いる蛍光抗体法、発育阻止試験および代謝阻止試験である。これらのポリクローナル抗体を用いる方

法は、特異性に問題がある。また、蛍光抗体法や発育阻止試験等による同定法では、寒天培地上にコロニーを形成させることが必要条件であるが、M. hyopneumoniaeの初代分離株の多くはコロニーを形成しない場合もあるなどの問題点を抱えていた。しかし、今回開発されたモノクローナル抗体を用いた凝集反応による同定法は極めて簡便であり、特異性も高いことから今後の応用が期待される。

豚マイコプラズマ肺炎の診断法および予防法の確立を目的として、Myco-plasma hyopneumoniaeの菌体表面の抗原構造を解析するとともに、M. hyo-pneumoniae感染豚の抗体応答および本菌に対するモノクローナル抗体を用いた血清学的診断法について検討し、以下の成績を得た。

1. M. hyopneumoniae菌体成分をTween20を用いて可溶化し、さらに可溶化画分をSephacryl S-300でゲル濾過すると、第2峰にM. hyopneumoniaeに対して特異性の高い抗原成分が検出された。
2. ゲル濾過によって得られたM. hyopneumoniae抗原はM. flocculare以外の豚由来マイコプラズマの抗血清とは交差反応を示さなかったが、抗M. flocculare血清とは交差反応が認められ、この交差反応に参与しているM. hyopneumoniaeの抗原は分子量約74Kdと53Kdの抗原と同定された。
3. M. hyopneumoniae実験感染豚血清について、Tween20で可溶化されたM. hyopneumoniae膜成分中の各抗原に対する抗体産生をウェスタンブロット法で分析したところ、分子量約96Kd、76Kd、70Kd、53Kd、46Kdおよび38Kdの蛋白抗原に対して抗体を産生することが明らかとなった。
4. M. hyopneumoniae実験感染豚の抗体応答を分析したウェスタンブロット像のパターンには個体差が認められた。しかし、大部分の実験感染豚はM. hyopneumoniaeの76Kdと46Kd抗原に対して強い抗体応答を示し、特に、46Kd抗原はM. hyopneumoniaeの抗原成分の中でも最も強い免疫原性を有する主要抗原であることが明らかとなった。
5. M. hyopneumoniaeに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ12株を作出した。このうち、9株はM. hyopneumoniaeに対して特異的なモノクローナル抗体を産生したが、他の3株はM. hyorhinisあるいはM. flocculareと交差する抗体を産生した。
6. M. hyopneumoniae発育阻止活性を有するモノクローナル抗体E-7-1-4を作出した。この抗体の認識抗原について、蛋白分解酵素処理、過ヨウ素酸処理および免疫電顕法等により検討したところ、E-7-1-4抗体はM. hyopneumoniae菌体表面に一様に分布する糖蛋白様抗原物質を認識してい

ることが明らかとなった。

7. M. hyopneumoniaeに対して特異性の高い46Kd抗原を認識するモノクローナル抗体14-4-4を用い、感染豚の血中抗体を検出するためのダブルサンドウィッチELISAを開発した。この方法は抗体検出法として高い特異性を示した。
8. ダブルサンドウィッチELISAを用いることにより、実験感染豚ではM. hyopneumoniae鼻腔内接種後3～4週目から抗体が検出され、CF試験に比べはるかに長く抗体検出が可能であった。
9. 豚マイコプラズマ肺炎汚染群では、哺乳豚が高力価の移行抗体を保有していることが判明した。この抗体は生後2カ月までには消失し、その後3～5ヶ月目から自然感染による抗体が上昇してくる傾向が認められた。
10. 種豚場を対象として、M. hyopneumoniaeに対する抗体の保有状況をダブルサンドウィッチELISAにより全国的に調査した結果、地区別の抗体陽性率は80～94%で、全国の陽性率の平均は88%に達した。
11. M. hyopneumoniae凝集活性を有するモノクローナル抗体E-7-1-4を用い、凝集反応による分離菌株の迅速同定法を確立した。

参考文献

1. Armstrong, C. H., Freeman, M. J., Sand, L. L. and Farrington, D. O.: The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosing mycoplasmal pneumonia of swine. Proc. Am. Assoc. Vet. Diagn., 21:377-390, 1978.
2. Armstrong, C. H. and Friis, N. F.: Isolation of Mycoplasma flocculare from swine in the United States. Am.J.Vet.Res. 42:1030-1032, 1981.
3. Armstrong, C. H., Freeman, M. J., Freeman, L.S., Osuna, M. L., Young, T. and Runnels, L. J.: Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, indirect hemagglutination test and complement fixation test for detecting antibodies to M.hypopneumoniae. Can. J. Comp. Med. 47:467-470, 1983.
4. Bruggmann, S., Keller, H., Bertschinger, H. U. and Engberg, B.: Quantitative detection of antibodies to Mycoplasma hyopneumoniae in pigs' sera by an enzyme-linked immunosorbent assay. Vet. Rec. 101:109-111, 1977.
5. Cole, R. M.: Transmission electron microscopy: Basic technique, p.43-50. In Razin, S. and Tully, J.G. (eds.), Methods in mycoplasmology, Vol 1. Academic Press, New York.
6. Doster, A. R. and Boh Chang, L.: Identification of Mycoplasma hyopneumoniae in formalin-fixed porcine lung, using an indirect immunoperoxidase method. Am. J. Vet. Res. 49:17-19, 1988.
7. Durisic, S., Maksimovic, A. and Visacki, J.: Antibodies in blood, colostrum and milk of sows inoculated with an experimental vaccine of Mycoplasma suis pneumoniae. Acta. Vet. (Beograd) 25:189-194, 1975.
8. Durisic, S., Maksimovic, A. and Visacki, J.: Passive transmission and active production of antibodies to Mycoplasma suis pneumoniae and their significance in the development of macroscopic lesions in fattening swine. Acta, Vet.(Beograd), 25:195-201, 1975.
9. Etheridge, J. R., Cottew, G. S. and Lloyd, L. C.: Isolation of Mycoplasma hyopneumoniae from lesions in experimentally infected pigs. Aust. Vet. J. 55:356-359, 1979.
10. Etheridge, J. C. and Lloyd, L. C.: A complement fixation test for enzootic pneumonia of pigs using a complement dilution methods. Aust. Vet. J. 56:101-105, 1980.
11. Freeman, M. J., Sands-Freeman, L. and Armstrong, C. H.: Comparison of manually performed microtiter plate and semiautomated (cuvette) indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine. Am.J.Vet.Res. 44:1734-1737, 1983.
12. Freeman, M. J., Armstrong, C. H., Sands-Freeman, L. L. and

- Osuna M. L.: Serological cross-reactivity of porcine reference antisera to M.hyopneumoniae, M.flocculare, M.hyorhinis and M.hyosynoviae indicated by the enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation and indirect hemagglutination test. Can. J. Comp. Med. 48:202-207, 1984.
13. Freeman, M. J., Osuna, M. L., Armstrong, C. H. and Sands-Freeman, L. L.: Evaluation of the indirect hemagglutination assay as a practical serodiagnostic test for mycoplasmal pneumonia of swine. Vet. Microbiol. 9:259-270, 1984.
 14. Freunt, E. A., Erno, H. and Lemcke, R. M.: Methods in Microbiology. Vol. 13, 413-420. Academic Press, London, 1979.
 15. Friis, N. F.: Isolation and characterization of a new porcine mycoplasma. Acta, Vet. Scand. 13:284-286, 1972.
 16. Friis, N. F.: Some recommendations concerning primary isolation of Mycoplasma suipneumoniae and Mycoplasma flocculare. Nord. Vet. Med. 27:337-339, 1975.
 17. Friis, N. F. and Jensen, P. T.: Serological comparison of type strains of porcine, bovine and ovine mycoplasmas with atypical colony morphology. Acta. Vet. Scand. 25:29-35, 1984.
 18. Gillette, R. W.: Alternatives to priming for ascitic fluid and monoclonal antibody production. J. Immunol. Methods. 99:21-23, 1987.
 19. Goodwin, R. F. W., Pomeroy A. P. and Whittlestone, P.: Production of enzootic pneumonia in pigs with a mycoplasma. Vet. Rec. 77:1247-1249, 1965.
 20. Goodwin, R. F. W. and Whittlestone, P.: Enzootic pneumonia of pigs: Immunization attempts inoculating Mycoplasma suipneumoniae antigen by various routes and with different adjuvant. Br. Vet. J. 129:456-464, 1973.
 21. Goodwin, R. F. W.: The economics of enzootic pneumonia. Vet. Rec. 89:77-81, 1971.
 22. Holmgren, N.: An indirect haemagglutination test for detection of antibodies against Mycoplasma hyopneumoniae using formalinized tanned swine erythrocyte. Res. Vet. Sci. 16:341-346, 1974.
 23. Holmgren, N.: Swine enzootic pneumonia: Immunologic studies in infected sow-herds. Res. Vet. Sci. 17:145-153, 1974.
 24. Huhn, R. G.: Swine enzootic pneumonia: Incidence and effect on rate of body weight gain. Am. J. Vet. Res. 31:1097-1108, 1970.
 25. Imada, Y. et al.: Rapid identification of mycoplasmas by indirect immunoperoxidase test using small square filter paper. J. Clin. Microbiol. 25:17-21, 1987.
 26. Iwasaki, T., Ando, T., Ichikawa, K. and Yasui, K.: Monoclonal

- antibody, (in Japanese). Kodansya Press, Tokyo, p 30-113. 1983.
27. Kahane, I and Brunner, H: Isolation of a glycoprotein from Mycoplasma pneumoniae membranes. Infect. Immun. 18:273-277, 1977.
 28. Kim, M. F., Heidari, M. B., Stull, S. J., McIntosh, M. A. and Wise, K. S.: Identification and mapping of an immunogenic region of Mycoplasma hyopneumoniae p65 surface lipoprotein expressed in Escherichia coli from a cloned genomic fragment. Infect. Immun. 58: 2637-2643, 1990.
 29. Kirchhoff, V. H., Heitmann, L., Dubenkropp, H., Schmidt, R. und Vespermann, J.: Weitere Untersuchungen zur ätiologie der rhinitis atrophicans des schweines 7. Mitteilung: Untersuchung von schweineseren auf antikörper gegen Mycoplasma hyorhinis und Mycoplasma hyopneumoniae. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 95:41-47, 1982.
 30. Klinkert, M., Hermann, R. and Schaller, H.: Surface proteins of Mycoplasma hyopneumoniae identified from an Escherichia coli expression plasmid library. Infect. Immun. 49:329-335, 1985.
 31. Kobisch, M., Quillien, L., Tillon, J. P. and Wroblewski, H.: The Mycoplasma hyopneumoniae plasma membrane as a vaccine against porcine enzootic pneumonia. Ann. Inst. Pasteur/Immunol. 138:693-705, 1987.
 32. Laemmli, U. K.: Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685, 1970.
 33. Lam, K. M. and Switzer, W. P.: Mycoplasmal pneumonia of swine: active and passive immunizations. Am. J. Vet. Res. 32:1737-1741, 1971.
 34. Lloyd, L. C., Badman, R. T., Etheridge, J. R., McKechnie, K. and Lyer, H.: Assessment of complement fixation test to detect Mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs. Aust. Vet. J. 61:216-218, 1984.
 35. Mare, C. J. and Switzer, W. P.: Mycoplasma hyopneumoniae, new species: A causative agent of virus pig pneumonia. Vet. Med. Small Anim. Clin. 60:841-846, 1965.
 36. McKean, J. D., Andrews, J. J. and Farrington, D. O.: Evaluation of diagnostic procedures for detection of mycoplasmal pneumonia of swine. Am. J. Vet. Res. 174:177-180, 1979.
 37. Meyling, A. and Friis, N. F.: Serological identification of new porcine mycoplasma, M. flocculare. Acta. Vet. Scand. 13:287-289, 1972.
 38. Minion, F. C., Brown, M. B. and Cassel, G. H.: Identification of cross reactive antigens between Mycoplasma pulmonis and Mycoplasma arthritidis. Infect. Immun. 43:115-121, 1984.

39. Mori, Y., Yoshida, Y., Kuniyasu, C. and Hashimoto, K.: Improvement of complement fixation test antigen for the diagnosis of Mycoplasma hyopneumoniae infection. Natl. Inst. Anim. Health Q(Jpn) 23:111-116, 1983.
40. Mori, Y., Hamaoka, T. and Sato, S.: Use of monoclonal antibody in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against Mycoplasma hyopneumoniae. Isr. J. Med. Sci. 23:657-662, 1987.
41. Mori, Y., Hamaoka, T., Sato, S. and Takeuchi, S.: Immunoblotting analysis of antibody response in swine experimentally inoculated with Mycoplasma hyopneumoniae. Vet. Immunol. Immunopathol. 19:239-250, 1988.
42. Nicolet, J., Paroz, P. H. and Kristensen, B.: Growth medium constituents contaminating mycoplasma preparations and their role in the study of the mycoplasma membrane glycoproteins in porcine mycoplasmas. J. Gen. Microbiol. 119:17-26, 1980.
43. Nicolet, J. and Paroz, P. H.: Tween20 soluble proteins of Mycoplasma hyopneumoniae as antigen for an enzyme-linked immunosorbent assay. Res. Vet. Sci. 29:305-309, 1980.
44. Nicolet, J.: Current status of the serodiagnosis of enzootic pneumonia in swine. Isr. J. Med. Sci. 23:650-653, 1987.
45. Ogata, M., Yamamoto, K., Koshimizu, K. and Kan, H.: Studies on cultivation of swine mycoplasmas. Jpn. J. Vet. Sci. 30:184, 1968. (in Japanese).
46. Piffer, I. A., Young, T. F., Petenate, A. and Ross, R. F.: Comparison of complement fixation test and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of early infection with Mycoplasma hyopneumoniae. Am. J. Vet. Res. 45:1122-1126, 1984.
47. Pointon, A. M., Byet, D. and Heap, P.: Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance. Aust. Vet. J. 62:13-18, 1985.
48. Roberts, D. H.: Serological diagnosis of Mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs. Vet. Rec. 82:362-363, 1968.
49. Ross, R. F., Zimmermann-Erickson, B. J. and Young, T.: Characteristics of protective activity of Mycoplasma hyopneumoniae vaccine. Am. J. Vet. Res. 45:1899-1905, 1984.
50. Ross, R. F.: Mycoplasmal disease. In: Leman, A. D. et al. (eds), Diseases of swine, 6th edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, p469-483, 1986.
51. Rottem, S.: Harvest and washing of mycoplasmas, in: Razin, S. and Tully, J. G. (eds), Methods in mycoplasmaology, analysis of cellular components. Vol 1. Academic Press, New York, 221-223, 1983.
52. Rurangirwa, F. R., McGuire, T. C., Musoke, A. J. and Kibor,

- A.: Differentiation of F38 Mycoplasma causing contagious caprine pleuropneumonia with a growth-inhibiting monoclonal antibody. Infect. Immun. 55:3219-3220, 1987.
53. Schuller, V. W., Neumeister, E und Vogl, D.: Zur Sanierung von mit enzootischer pneumonie verseuchten schweinebeständen. Wien. Tierärztl. Mschr. 64:156-160, 1977.
 54. Slavik, M. F. and Switzer, W. P.: Development of microtitration complement fixation test for diagnosis of mycoplasmal swine pneumonia. Iowa State J. Res. 47:117-128, 1972.
 55. Slavik, M. F. and Switzer, W. P.: Adaptation of a latex agglutination tube test for diagnosis of Mycoplasma hyopneumoniae swine pneumonia. Vet. Microbiol. 4:157-168, 1979.
 56. Stemler, M. E., Stemke, G. W. and Robertson J. A.: ATP measurements obtained by luminometry provide rapid estimation of Ureaplasma urealyticum growth. J. Clin. Microbiol. 25:427-429, 1987.
 57. Stemke, G. W. and Robertson, J. A.: The growth response of Mycoplasma hyopneumoniae and Mycoplasma flocculare based upon ATP-dependent luminometry. Vet. Microbiol. 24:135-142, 1990.
 58. Stipkovits, L., Vajda, G., Antal, V., Antal, T. and Szabo, I.: Occurrence of non-specific reactions in the diagnostics of M. hyopneumoniae infection of swine. J. Vet. Med. B 35:197-203, 1988.
 59. Tajima, M. and Yagihashi, T.: Interaction of Mycoplasma hyopneumoniae with porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. Infect. Immun. 37:1162-1169, 1982.
 60. Takatori, I., Huhm, R. G. and Switzer, W. P.: Demonstration of complement fixation antibody against Mycoplasma hyopneumoniae in the sera of pigs infected with swine enzootic pneumonia. Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn) 8:195-203, 1968.
 61. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354, 1979.
 62. Whittlestone, P.: Porcine mycoplasma. In: Tully, J. G. and Whitcomb, R. F. (eds), The Mycoplasmas, Vol. 2. Academic Press, New York, p 133-176. 1979.
 63. Wise, K. S. and Kim, M. F.: Major membrane surface proteins of Mycoplasma hyopneumoniae selectively modified by covalently bound lipid. J. Bacteriol. 169:5546-5555, 1987.
 64. Yamamoto, K. and Ogata, M.: Mycoplasmal and bacterial flora in the lungs of pigs. Proc. Int. Pig Vet. Soc. 7:94, 1983.
 65. Young, T. and Ross, R. F.: Assessment of antibody response of swine infected with Mycoplasma hyopneumoniae by immunoblot-

- ting. Am. J. Vet. Res. 48:651-656. 1987.
66. Young, T., Erickson, B. Z., Ross, R. F. and Wannemuehler, Y.: Hemagglutination and hemagglutination inhibition of turkey red blood cells with Mycoplasma hyopneumoniae. Am. J. Vet. Res. 50:1052-1055, 1989.

謝 辞

適切なご助言とご協力をいただき、また本論文の御校閲をいただいた農林水産省家畜衛生試験場生理活性物質研究室長横溝祐一博士に深く感謝するとともに、実験遂行にあたりご協力をいただいたアイオワ州立大学 Richard Ross教授並びに全農家畜衛生研究所佐藤静夫博士、福井県農業短期大学竹内正太郎博士に感謝の意を表します。

さらに、本論文のご指導とご校閲をいただいた北海道大学獣医学部清水悠紀臣教授、波岡茂郎教授、橋本信夫教授、小沼操教授の各位に深謝致します。

Studies on specific antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Yasuyuki Mori

National Institute of Animal Health
Kannondai 3-1-1, Tsukuba, Ibaraki, Japan

Mycoplasma hyopneumoniae is one of the most common pathogens of swine respiratory disease. Mycoplasmal pneumonia of swine (MPS) caused by this organism is a widespread, chronic and economically important disease throughout the world. Although intensive works on the pathogenesis, diagnosis and prevention of this disease have been continued since the discovery of *M. hyopneumoniae* by Mare and Switzer, many problems are still remaining to be resolved. Especially, little is known about surface antigenic structure and its functions. For example, it is well known that growth of mycoplasmas is inhibited by antibody, however, antigen(s) participating in this growth inhibition is not still identified in any mycoplasma species. On the other hand, many attempts have been made to develop a useful serodiagnostic test for MPS in different laboratories, employing complement fixation (CF), indirect hemagglutination and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), etc.. However, until recently none of these techniques was completely satisfactory because of cross reaction between *M. hyopneumoniae* and other swine mycoplasmas. It is thought that antigen analysis and use of specific antigen(s) of *M. hyopneumoniae* might be very effective to develop a more specific and sensitive diagnostic tests. Furthermore, analysis and identification of antigen(s) participating in antibody mediated growth inhibition may give a promising candidate for component vaccine against MPS.

For these purposes, I analyzed the serological cross-reactivity among swine mycoplasmas and antibody response of swine against *M. hyopneumoniae* antigens. Furthermore, monoclonal antibodies against *M. hyopneumoniae* were produced for analysis of antigens and applied them to the serological diagnosis and identification of *M. hyopneumoniae*. The results obtained are as follows:

1. Mycoplasmas solubilized with Tween 20 were used as antigen. Tween 20-treated antigens of *M. hyopneumoniae* were subjected to column chromatography on Sephacryl S-300 for purification. Of five main peaks, the second gave the most reliable results with reduction of non-specific reactions.

2. In cross-reacting ELISA using the 2nd peak of Tween 20 treated antigens, less prominent but detectable cross-reactions were observed between *M. hyopneumoniae* antigen and anti-*M. flocculare* serum. And it was demonstrated that the predominant cross-reactive antigens were components of *M. hyopneumoniae* with molecular weight of 74 kilodalton (Kd) and 53Kd.

3. It was indicated that 96Kd, 70Kd, 46Kd and 38Kd antigenic components of *M. hyopneumoniae* and 67Kd, 56Kd and 23Kd antigens of *M. flocculare* were specific for respective species.

4. Antibodies against 96Kd, 76Kd, 70Kd, 53Kd, 46Kd and 38Kd antigens of *M. hyopneumoniae* were detected in serum from pigs experimentally infected with *M. hyopneumoniae*. Of these anti-

bodies, those against 46Kd antigen reacted early and were most consistently detected during experimental infection.

5. Twelve clones of hybridoma producing monoclonal antibody against *M. hyopneumoniae* were established and nine of these monoclonal antibodies were specific for *M. hyopneumoniae*.

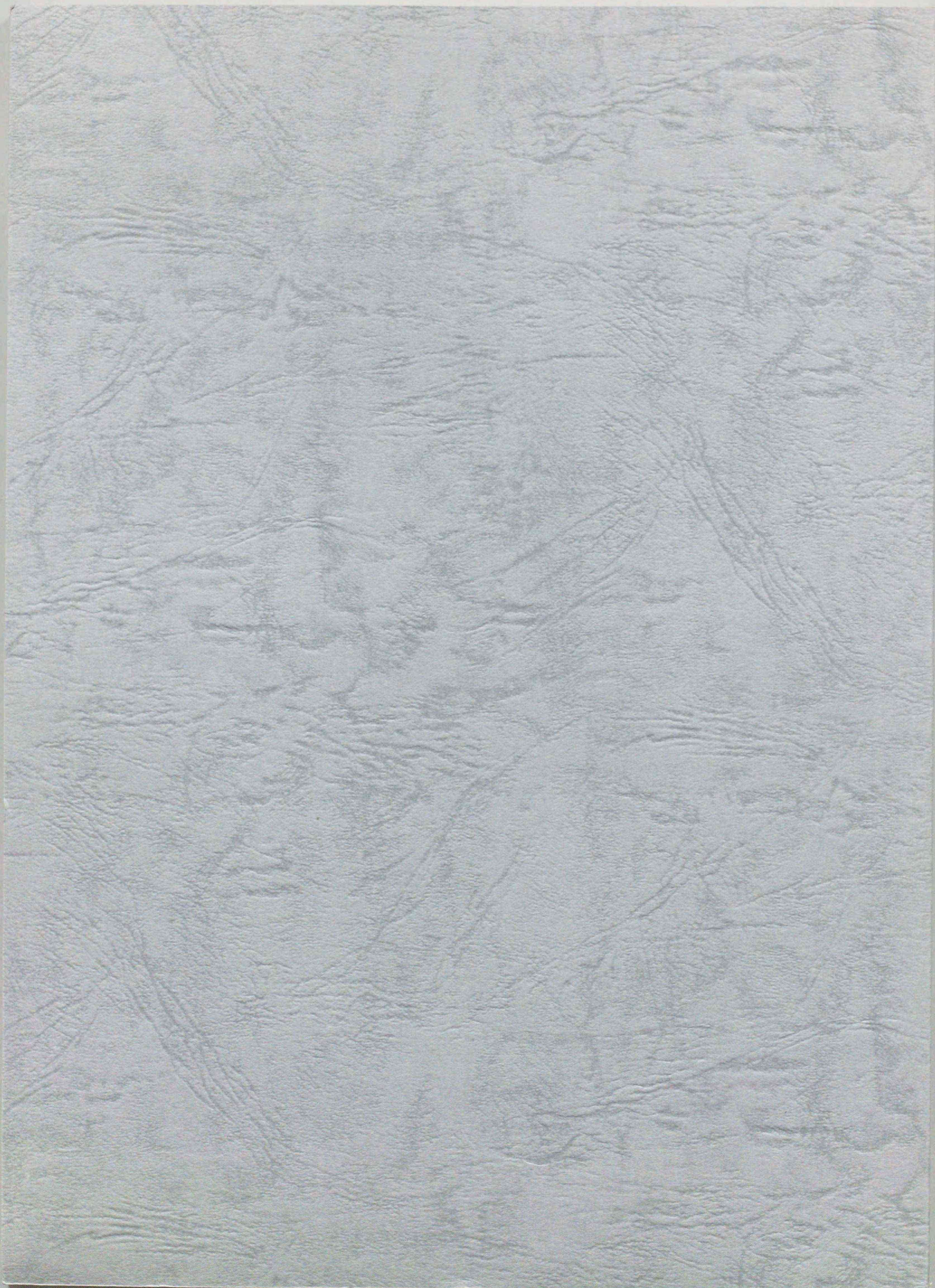
6. Three monoclonal antibodies (E-7-1-4, J-168-1 and J-49-7) specifically agglutinated *M. hyopneumoniae* and recognized the glycoprotein-like components on the surface of *M. hyopneumoniae*. Of these monoclonal antibodies, E-7-1-4 inhibited the growth of *M. hyopneumoniae*.

7. Monoclonal antibody (14-4-4) against 46Kd antigen of *M. hyopneumoniae* could be applied successfully to the ELISA double sandwich method to detect swine antibodies against 46Kd antigen of *M. hyopneumoniae*. This procedure gave high specificity and sensitivity.

8. In the experimental infection with *M. hyopneumoniae*, antibodies were detected by the double sandwich ELISA and CF test at almost the same time. However, ELISA antibodies persisted for longer period than those detected by the CF test.

9. In the field application of this ELISA using monoclonal antibody, of the 1461 serum samples collected from breeding swine herd in Japan, 1285 (88%) had antibodies against *M. hyopneumoniae*.

10. Novel identification technique for *M. hyopneumoniae* was developed by employing agglutinating monoclonal antibody (E-7-1-4).

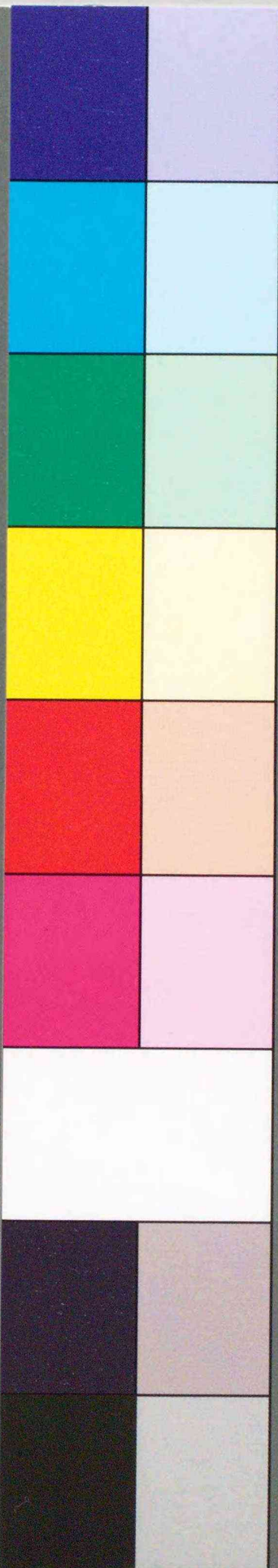


Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
Centimetres 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

KODAK Color Control Patches

© The Tiffen Company, 2000

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

