



Title	Renibacterium salmoninarum の表在抗原p57をELISA用抗原とした抗体検出
Author(s)	松井, 崇憲; 大迫, 典久; 西澤, 豊彦 他
Citation	魚病研究, 45(2), 80-83 https://doi.org/10.3147/jsfp.45.80
Issue Date	2010-06-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/54118
Type	journal article
File Information	article163.pdf



Renibacterium salmoninarum の 表在抗原 p57 を ELISA 用 抗原とした抗体検出

松井崇憲¹・大迫典久²・西澤豊彦^{3*}・吉水 守¹

(2010年1月21日受付)

Detection of Specific Antibodies against *Renibacterium salmoninarum* by ELISA with p57 Protein as a Capture Antigen

Takanori Matsui¹, Norihisa Oseko², Toyohiko
Nishizawa^{3*} and Mamoru Yoshimizu¹¹Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University,
Hokkaido 041-8611, Japan²National Research Institute of Aquaculture, Fisheries
Research Agency, Hokkaido 062-0992, Japan³Department of Aqualife Medicine, Chonnam National
University, Yeosu 550-749, Korea

(Received January 21, 2010)

ABSTRACT—We evaluated p57 of *Renibacterium salmoninarum* (R.s.) as a capture antigen for specific antibody-detection ELISA against R.s.. Using formalin-killed R.s. (FK-R.s.) as ELISA antigens, ELISA values (OD_{492 nm}) of the negative control sera showed high values ranging from 0.12 to 1.59. These values were relatively lower than those of sera from the fish immunized with FK-R.s. (0.16–2.6), but seemed to be still high as negative control sera. Contrarily, when p57 was used as a capture antigen, ELISA values of the negative control sera were all 0.1 or less, while those of the sera from immunized fish ranged from 0.02 to 1.28. It was thus demonstrated that high background of ELISA was enabled to be reduced by p57 as ELISA antigens.

Key words: antibody-detection ELISA, *Renibacterium salmoninarum*, BKD, capture antigen, *O. mykiss*, *O. masou*

細菌性腎臓病 (bacterial kidney disease: BKD) は、これまでに、北米、ヨーロッパ、日本および南米の養殖および天然のサケマスで発生が報告されている^{1,2)}。BKD 罹病魚は、体色黒化、腹部膨満、眼球突出および点状出血を特徴とするが、感染初期の個体では病変が認められないことが多い²⁾。BKD の原因菌である *Renibacterium salmoninarum* (R.s.) はグラム陽性の短桿菌 (0.3–1.0 × 1.0–1.5 μm) で、無芽胞、非運動性、しばしば双桿状を呈する¹⁾。R.s. の細胞壁表面には、p57 もしくは major soluble antigen (MSA) と呼ばれる分子量 57 kDa の可溶性抗原が存在する^{3,4)}。本タンパク質は熱安定 (100°C, 30 min) で、R.s. の自己凝集反応、赤血球凝集反応および白血球凝集反応に関わっている³⁻⁵⁾。

R.s. の検出法には、蛍光抗体法⁶⁾、酵素抗体法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)⁷⁾ および、polymerase chain reaction (PCR)^{8,9)} が報告されている。一方、抗体検出 ELISA により間接的に検出する方法も報告されている。ELISA は、安価で大量サンプルの処理が可能であること、また短時間で検査結果が得られる等の点で他の方法より優れている。

抗体検出 ELISA は、ヒトおよび家畜で幅広く用いられ、抗体を指標とした感染履歴の把握による疫学調査にも広く用いられている。魚類における応用例はまだまだ限定的であるが、奥田ら¹⁰⁾ は BKD の疫学調査の手段として抗体検出 ELISA を用いた。しかし、魚類の抗体検出 ELISA において、魚類抗体がブロッキング剤に非特異的に吸着することにより ELISA 吸光値が上昇する、いわゆる「バックグラウンドの上昇」により検査結果の再現性が低下することが報告された¹¹⁾。不安定なバックグラウンドの上昇は、陽性と陰性の判定基準の設定を困難にさせるため、バックグラウンドを可能な限り軽減させることが必要不可欠である。Kim *et al.*¹¹⁾ は、供試魚血清をスキムミルクで前処理することで、魚類抗体とブロッキング剤との非特異的吸着が抑えられることを報告した。同方法は、他の魚類ウイルスに対する抗体検出 ELISA にも応用され、その有効性が明らかにされた¹²⁻¹⁴⁾。

奥田ら¹⁰⁾ は、蓄養期間の経過と共に抗 R.s. 抗体による ELISA 吸光値が上昇することから、蓄養期間に R.s. 感染が広まることを示唆したが、BKD 陰性群血清においても非特異的吸着に起因するバックグラウンドが上昇し、抗 R.s. 抗体陽性と陰性の基準設定に苦慮した。Jansson and Ljungberg¹⁵⁾ も同様に、BKD 陰性群において高い ELISA 吸光値が認められることを報告した。

本研究では、まずホルマリン不活化 R.s. 菌体を用いた抗体検出 ELISA において、Kim *et al.*¹¹⁾ が提唱した魚類血清のスキムミルク処理のみでは、バックグラウンドが十分に軽減しないことを示した。次いで R.s. の表在主要抗原である p57 を ELISA 用抗原とすることによりバック

¹ 北海道大学大学院² 養殖研究所³ Chonnam National University

* Corresponding author

E-mail: jjnishi@chonnam.ac.kr

グラウンドが十分なレベルまで軽減され、抗 *R.s.* 抗体の検出が可能になることを示した。

材料および方法

魚類免疫用抗原および抗体検出 ELISA 用抗原

魚類免疫用抗原および ELISA 用抗原の調製には、*R.s.* Tok46株¹⁰⁾ を用いた。なお、*R.s.* の培養には、本菌の培養上澄み (spent medium of *R.s.*, SMRs) を添加した改良 KDM 培地 (KDM-SMRs: 1% peptone, 0.05% yeast extract, 0.1% cysteine-HCl, 1% SMRs) を用いた¹⁶⁾。

1) 魚類免疫用ホルマリン死菌 (FK-*R.s.*) 抗原: *R.s.* を濁度 (OD_{620 nm}) が1.0付近に達するまで15°Cで培養した後、遠心分離 (2,500×g, 15 min) により菌体を回収した。得られた菌体を Dulbecco phosphate buffered saline (PBS) に OD_{620 nm} 1.0 となるよう懸濁した。さらに、ホルマリンを終濃度 3% (v/v) となるよう添加した後、1晩振盪 (100 rpm) し、免疫用 FK-*R.s.* 抗原とした。

2) ELISA 用 FK-*R.s.* 抗原: 魚類免疫用 FK-*R.s.* 抗原と同様に培養した *R.s.* を PBS で 3 回遠心洗浄 (2,500×g, 15 min) 後、OD_{620 nm} 1.0 となるように PBS に再懸濁し、1% (v/v) となるようにホルマリンを添加し 1 晩振盪 (100 rpm) した。菌体を PBS で 3 回遠心洗浄 (2,500×g, 15 min) した後、再び OD_{620 nm} 1.0 となるよう PBS に懸濁し、ELISA 用抗原液とした。

3) p57 抗原液: Daly and Stevenson¹⁷⁾ に準じ *R.s.* より p57 を抽出した。すなわち、*R.s.* を KDM-1% SMRs 液体培地で OD_{620 nm} 1.0 まで培養した後、遠心分離 (2,500×g, 15 min) により菌体を回収し、菌体培養液の1/10倍量の滅菌 DW に懸濁し25°Cで5分間処理した後、遠心分離 (2500×g, 15 min) により得た上清を ELISA 用抗原とした。

なお、抗原液 1)~3) は使用するまで-30°Cに保存し、また抗原液 1) は、解凍後 PBS で10倍に希釈し実験に供した。

SDS-PAGE およびウエスタンブロット解析

R.s. 懸濁液および p57 抗原液に SDS-変性緩衝液 (0.17 M Tris-HCl, pH 6.8, 5.3% SDS, 13% β-mercaptoethanol) を等量加え 3 分間煮沸した後、1/10量のローディング液 (0.05% bromophenol blue, 70% glycerol) を加え、SDS-PAGE 用試料とした。SDS-PAGE には、10%分離ゲルを用い、Laemmli¹⁸⁾ の方法に準じて行い、SDS-ゲル中のタンパク質の染色は Coomassie brilliant blue (CBB) 染色により行った。

ウエスタンブロットは、転写用緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 200 mM glycine) を用い、10 V/cm で20分間の通電により分離用アクリルアミドゲル中のタンパク質をニトロセルロース (NC) 膜 (Advantec) に転写した。NC 膜を 5% スキムミルク-TS 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 150

mM NaCl, pH 7.4) で30分間ブロッキングした後、一次血清として抗 *R.s.* 家兎血清¹⁰⁾ を、さらに二次血清としてアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ Ig ブタ血清 (Dako) を用い、免疫染色を行った。発色には、NBT-X-リン酸溶液 [0.34 mg/mL nitroblue tetrazolium (NBT), 0.17 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidinium salt, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂] を用いた。

供試魚への抗原接種および抗血清の回収

本実験では、独立行政法人水産総合研究センターさけますセンター内で飼育中のサクラマス *Oncorhynchus masou* (平均体重: 7.8 g) およびニジマス *O. mykiss* (平均体重: 9.5 g) を用いた。FK-*R.s.* をサクラマスおよびニジマス各10尾に 2×10^8 cells/100 μL/fish となるよう腹腔内接種した (FK-*R.s.* 接種区)。なお、実験対照区として滅菌 PBS を 100 μL/fish ずつサクラマスおよびニジマス各 5 尾に腹腔内接種した。初回免疫後 7 日おきに計 4 回の追加免疫を行い、最終免疫から 5 日後に全採血し、常法により血清を得、使用するまで-30°Cに保存した。

抗 *R.s.* 抗体検出 ELISA

FK-*R.s.* 抗原液および PBS で10倍に希釈した p57 抗原液 (6 μg/mL) を ELISA 用マイクロプレート (Greiner bio-one) に 50 μL/well 分注し、4°C で 1 晩静置した。抗原液を捨て0.05% Tween 20 含 PBS (PBS-T) で 3 回洗浄し、5% スキムミルク含 PBS を 400 μL/well 分注後、25°C で 1 時間静置した。PBS-T で 3 回洗浄し、5% スキムミルク含 PBS で 1:40 に希釈した供試魚血清を 50 μL/well 分注し、25°C で 1 時間反応させた。PBS-T で 3 回洗浄し、5% スキムミルク含 PBS で 1:500 に希釈した抗サクラマス IgM 家兎血清¹⁰⁾ あるいは抗ニジマス IgM 家兎血清¹¹⁾ を 50 μL/well 分注し、25°C で30分間反応させた。PBS-T で 3 回洗浄し、5% スキムミルク含 PBS で 1:1000 に希釈した HRP 標識抗ウサギ Ig ブタ血清 (Dako) を 50 μL/well 分注し、25°C で30分間反応させた。PBS-T で 3 回洗浄した後、オルトフェニレンジアミン基質発色液 (1.0 mg/mL o-phenyldiamine, 100 mM Na₂HPO₄, 50 mM citric acid, 0.03% H₂O₂) を 50 μL/well 加え、遮光下、25°C で15分間の反応により発色させた後、2 N H₂SO₄ を 50 μL/well 添加して酵素反応を停止し、マイクロプレートリーダー (MTP-300, Corona) で 492 nm の吸光値を測定した。

結果および考察

本研究では、まず *R.s.* の主要表在抗原である p57 の抽出法および回収について検討した。免疫用 FK-*R.s.* 抗原液と同濃度の *R.s.* 懸濁液、p57 抗原液および p57 抽出後

の菌液の SDS-PAGE の CBB 染色像および抗 *R.s.* 血清を用いた免疫染色像を Fig. 1 に示した。*R.s.* 懸濁液および p57 抗原液の電気泳動像において、分子量 57 kDa のタンパク質が検出された。なお、Fig. 1-A Lane 1 に示した *R.s.* 懸濁液の電気泳動像では、p57 以外の菌体由来タンパク質が殆ど検出されなかった。奥田ら¹⁹⁾ は、*R.s.* を SDS 処理した場合においてもゲノム抽出効率は数%程度であると報告している。すなわち、グラム陽性菌である *R.s.* は SDS 処理に対し極めて安定であると考えられ、それ故、p57 以外の *R.s.* 由来タンパク質が検出されなかったと考えている。結果には示さなかったが、銀染色により *R.s.* 由来タンパク質と考えられる多数のバンドが微量ではあるが検出されている。また、Daly and

Stevenson¹⁷⁾ に準じた本法により *R.s.* の主要表在抗原である p57 を抽出した試料では p57 以外の菌由来タンパク質が殆ど検出されなかったことから、本法により p57 が効率よく抽出回収されることが確認された。なお、以下の実験で用いる FK-*R.s.* 抗原液および p57 抗原液の p57 含量は何れも 60 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。Alcorn and Pascho²⁰⁾ は、ELISA 用抗原として大腸菌で発現させた r-p57 を精製し用いているが、本法は *R.s.* 由来 p57 を簡便かつ大量に回収できる方法であり、ELISA 用抗原の調整法としても適当であると考えられた。

FK-*R.s.* で免疫したサクラマスおよび PBS を接種したサクラマスより回収した血清の抗体検出 ELISA 結果を Fig. 2 に示した。FK-*R.s.* を ELISA 用抗原として用いた場合、FK-*R.s.* 免疫魚および PBS 接種魚血清（以後、陰性血清と称す）の ELISA 吸光値は、各々 0.16~2.2（平均値：1.5）および 0.12~0.56（平均値：0.30）と、陰性血清を含め全てが 0.1 以上の値を示した（Fig. 2）。これに対し p57 を ELISA 抗原とした場合、FK-*R.s.* 免疫魚および陰性血清の ELISA 吸光値は各々 0.02~1.3（平均値：0.55）および 0.03~0.06（平均値：0.04）と、FK-*R.s.* 免疫魚血清 10 検体中 8 検体が 0.1 以上であったのに対し、陰性血清は全て 0.1 以下であった（Fig. 2）。

ニジマス血清についても、同様の傾向が認められた。すなわち、FK-*R.s.* 抗原液を ELISA 用抗原として用いた場合、FK-*R.s.* 免疫魚および陰性血清の ELISA 吸光値は、1.4~2.6（平均値：2.2）および 0.41~1.6（平均値：0.74）と、陰性血清を含む全てが 0.1 以上の値を示したが

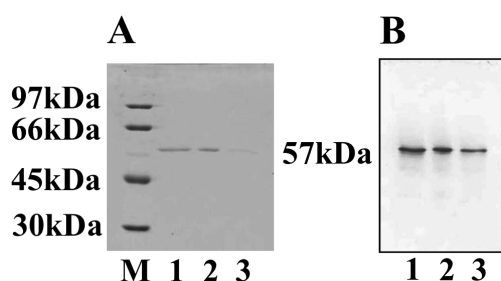


Fig. 1. SDS-PAGE and western blot analyses of *R.s.* suspension, extracted p57 solution and *R.s.* suspension post p57-extraction. A: 10% SDS-gel with Coomassie brilliant blue (CBB) staining, B: western blotting immunostained with anti-*R.s.* rabbit serum, M: molecular marker, Lane 1: *R.s.* suspension, Lane 2: extracted p57 from *R.s.*, Lane 3: *R.s.* suspension after the p57-extraction.

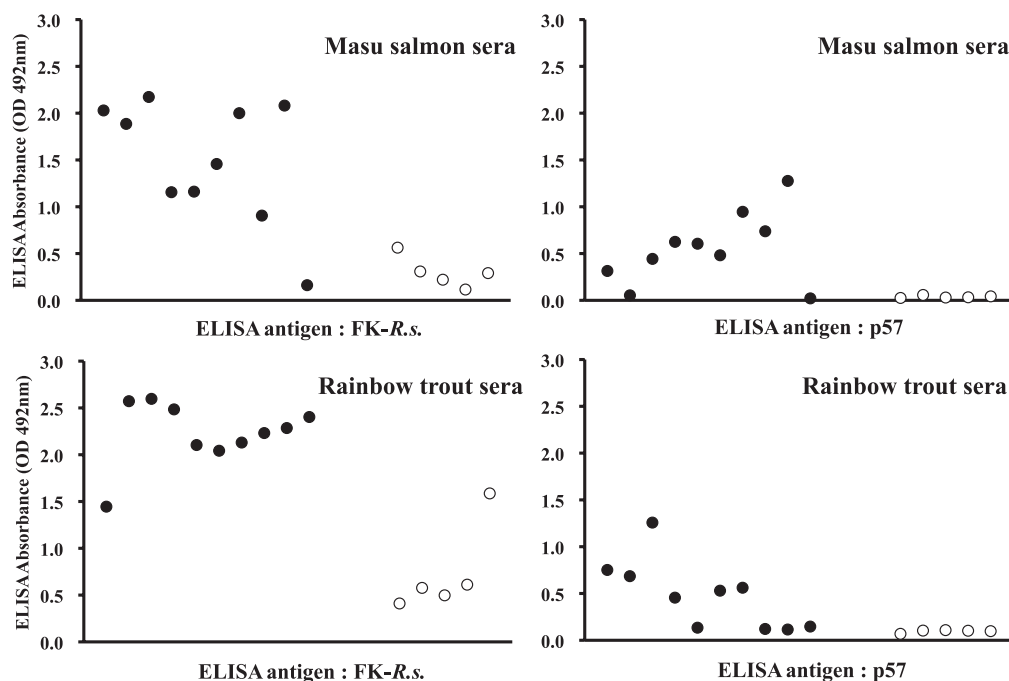


Fig. 2. Detection of antibodies against *R.s.* from sera of the immunized masu salmon and rainbow trout by using ELISA with different capture antigens, formalinkilled *R.s.* and the extracted p57. ●: Injected with FK-*R.s.* and ○: with PBS.

(Fig. 2), p57 を ELISA 抗原とした場合の ELISA 吸光値は、各々 0.12~1.3 (平均値: 0.48) および 0.07~0.11 (平均値: 0.10) で、FK-*R.s.* 免疫魚血清は全て 0.1 より高かったのに対し、陰性血清は全て 0.1 以下であった (Fig. 2)。

以上の結果から、FK-*R.s.* 抗原液を ELISA 用抗原として用いた場合、FK-*R.s.* 免疫魚のみならず、陰性血清である PBS 接種魚血清の ELISA 吸光値が、何れも 0.1 以上の値を示すことが明らかとなり (Fig. 2), FK-*R.s.* 免疫魚血清の ELISA 吸光値は、陰性血清に比べ相対的に高い値を示した。本結果において、陰性血清の ELISA 吸光値が最高で 1.5 付近まで上昇したことは、供試魚血清中の抗体が FK-*R.s.* 抗原と非特異的に吸着していることを示唆する結果であり、本バックグラウンドを十分なレベルまで軽減することが抗 *R.s.* 抗体検出 ELISA の確立に不可欠であると考えられた。一方、Kim *et al.*¹¹⁾ は、魚類抗体がブロッキング剤と吸着することで ELISA 吸光値のバックグラウンドが上昇することを、さらに魚類血清をスキムミルクで前処理することにより本バックグラウンドが大幅に軽減されることを報告している。さらに Kim *et al.*¹²⁾ は、ニジマス血清からの抗 IHNV 抗体検出において、IHNV 抗原に加え類似ウイルスである VHSV 抗原を用い、両抗原での ELISA 吸光値の差異をもって IHNV に対する特異抗体の有無を判断する方法 (Twin antigen ELISA 法) を確立した。これは、スキムミルク処理だけでは、ニジマス抗体の供試 ELISA 抗原への非特異的吸着を完全に阻止することが困難であることを示す結果である。本実験結果においても、供試血清をスキムミルクで前処理したにもかかわらず、陰性血清で高い ELISA 吸光値が認められたことから、おそらくサクラマスおよびニジマス共に血清中の抗体が菌体と非特異的に吸着していると考えられた。残念ながら、*R.s.* と異なる抗原性を示す類似菌が見当たらないことから、Kim *et al.*¹²⁾ の考案した Twin antigen ELISA 法を抗 *R.s.* 抗体検出 ELISA に応用することは困難であると考え、本研究では *R.s.* の主要表在抗原である p57 を抗体検出 ELISA 用抗原に用いることとした。その結果、FK-*R.s.* 免疫魚血清の ELISA 吸光値は相対的に低下したものの、10検体中 8 検体が >0.1 を呈し、さらに陰性血清の全てが ELISA 吸光値 <0.1 となり、ELISA 吸光値 0.1 を境に陽性と陰性血清の境界を明確にすることが可能となった (Fig. 2)。本結果は、サクラマスおよびニジマス抗体が p57 以外の菌体成分と非特異的に吸着すること、これによりバックグラウンドが上昇し検査結果の再現性が低下することを改めて裏付ける結果である。以上、表在抗原である p57 を ELISA 抗原とすることで、バックグラウンドが軽減され、*R.s.* に対する抗体

(抗 p57 抗体) を特異的に検出できることが明らかとなった。

ところで、結果は示さなかったが、今回 ELISA 抗原に用いた p57 でサクラマスおよびニジマスを免疫して得た血清は、p57 抗原を用いた抗体検出 ELISA において、何れも陰性 (<0.1) となった。Wood and Kaattari²¹⁾ および Fredriksen *et al.*²²⁾ は、p57 が抗体産生を抑制することを報告している。すなわち p57 を投与したサクラマスおよびニジマスにおいて p57 に対する抗体が検出されなかった原因は、p57 の抗体産生抑制効果に起因する可能性がある。また、Matsui *et al.*¹⁶⁾ は、*R.s.* 培養上清中に *R.s.* の増殖補助因子が放出されること、さらに同培養上澄から *R.s.* 由来タンパク質として p57 が検出されることを報告しており、著者らは p57 と *R.s.* の増殖補助因子に何らかの関係があると考えている。今後、本抗体検出 ELISA 法を応用することで、p57 の免疫抑制効果と *R.s.* の病原機構との関連について解明できると考えている。

文 献

- 1) Fryer, J. L. and J. E. Sanders (1981): *Ann. Rev. Microbiol.*, **35**, 273–298.
- 2) Wiens, G. D. and S. L. Kaattari (1999): *Fish diseases and disorders*, Vol. 3: Viral, bacterial and fungal infection. (ed. by P. T. K. Woo and D. W. Bruno), CABI Publishing, New York, USA, pp. 269–301.
- 3) Getchell, R. G., J. S. Rohovec and J. L. Eryer (1985): *Fish Pathol.*, **20**, 149–159.
- 4) Bruno, D. W. (1988): *FEMS Microbiol. Lett.*, **51**, 135–140.
- 5) Wiens, G. D. and S. L. Kaattari (1991): *Infect. Immun.*, **59**, 631–637.
- 6) Bullock, G. L. and H. M. Stuckey (1975): *J. Fish. Res. Board Can.*, **32**, 2224–2227.
- 7) Pascho, R. J. and D. Mulcahy (1987): *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **44**, 183–191.
- 8) Brown, L. L., G. K. Iwama, T. P. T. Evelyn, W. S. Nelson and R. P. Levine (1994): *Dis. Aquat. Org.*, **18**, 165–171.
- 9) Magnússon, H. B., O. H. Fridjónsson, Ó. S. Andrésson, E. Benediktsdóttir, S. Gudmundsdóttir and V. Andrésdóttir (1994): *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4580–4583.
- 10) 奥田律子・西澤豊彦・吉水 守 (2006): 魚病研究, **41**, 175–178.
- 11) Kim, W. S., T. Nishizawa and M. Yoshimizu (2007): *Dis. Aquat. Org.*, **78**, 55–59.
- 12) Kim, W. S., M. Mochizuki, T. Nishizawa and M. Yoshimizu (2008): *Fish Pathol.*, **43**, 112–116.
- 13) Kim, H. J., N. Oseko, T. Nishizawa and M. Yoshimizu (2009): *Dis. Aquat. Org.*, **83**, 105–113.
- 14) Nishizawa, T., I. Takami, Y. Kokawa and M. Yoshimizu (2009): *Dis. Aquat. Org.*, **83**, 115–122.
- 15) Jansson, E. and O. Ljungberg (1998): *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 93–99.
- 16) Matsui, T., T. Nishizawa and M. Yoshimizu (2009): *Fish Pathol.*, **44**, 139–144.
- 17) Daly, J. G. and R. M. W. Stevenson (1990): *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 949–953.
- 18) Laemmli, U. K. (1970): *Nature*, **227**, 680–685.
- 19) 奥田律子・西澤豊彦・吉水 守 (2008): 魚病研究, **43**, 29–33.
- 20) Alcorn, S. W. and R. J. Pascho (2000): *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 245–252.
- 21) Wood, P. A. and S. L. Kaattari (1996): *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 71–79.
- 22) Fredriksen, Å., C. Endresen and H. I. Wergeland (1997): *Fish Shellfish Immunol.*, **7**, 273–282.