

簡易 LPS 抽出キットを用いた豚サルモネラの ELISA 抗原調整と診断

動物衛生研究所 小林 秀 樹

サルモネラは人の食中毒病原体のうち最も頻繁に分離されるもののひとつである。人のサルモネラ症に関連した医療費原価は、アメリカで毎年 0.6 から 35 億ドルでほぼ 10 億ドルと推定される。豚肉は、牛肉、乳製品、鶏肉及び魚介類と同様に人へのサルモネラ媒体である。したがって、人のサルモネラ感染症を低減化することは経済的にも大きな意味を持つ。この目的のひとつの考えとして、家畜のサルモネラ保有レベルを縮小することが考えられる。例えば、デンマークでは 1995 年に、と畜豚から食物まで自然食品鎖をモニターすることにより、豚肉のサルモネラをコントロールする全国的な制御プログラムを導入した。このプログラムにより、1993 年には 3.5% のサルモネラ汚染率を 2000 年には 0.7% にまで縮小し、2,550 万ドルの利益を得た。しかしながら、豚群中のサルモネラを完全に根絶することは、動物生産システムの連続的な性質のため困難である。したがって、養豚におけるサルモネラ・コントロールの目的は群レベルでの伝染力を弱めることに注目すべきである。つまり、感染個体からの排菌量をいかに抑えるかということである。そのためには、最初に養豚農場におけるサルモネラ汚染度をどのように調べるかが重要である。

豚群におけるサルモネラ汚染度の調査方法は、主として豚糞便からの分離培養法で実施されている。サルモネラ感染による発症ピーク時の豚群か

らの分離は糞便排菌数が多いため増菌培養を行わなくても選択培地を用いることにより容易に分離することができるが、不顕性感染した豚からの、あるいは環境サンプルからの分離は常に選択的な増菌培養が必要である。分離陽性の場合、確実に生菌を証明できるほか、血清型別や生物学的特徴を明らかにできる。しかしながら、培養に時間と手間を要し、多検体処理は容易でない。排菌のタイミングや排菌数により感染があっても分離できない場合があるのも問題である。

一方、EU では豚群のサルモネラ汚染度をスクリーニングする手段としてサルモネラチフィウム (ST) とサルモネラコレラスイス (SC) の LPS 抗原をミックスした「マルチサルモネラ O 抗原 ELISA」が一般的である。この血清診断では、肉汁または血清サンプル中のサルモネラ抗体を測定できる。陽性結果はまた、豚の生育段階において、いつの時点でサルモネラに感染したかも推定可能であり、農場におけるサルモネラ汚染地図が作製できる。サルモネラに対する抗体は、感染後 7~10 日で検出されるようになり、2~3 週以内に最大のレベルに達し、約 5 週間はそのレベルを維持した後、徐々に減少していく。感染サルモネラの血清型は正確にはわからないが、豚個体の診断が可能で多検体処理に優れる。わが国でも EU で標準使用している豚サルモネラ検出 ELISA キットを入手可能であるが非常に高価 (92 検体/

約6万円)なため実用的とは言い難い。

残念ながら日本では豚におけるサルモネラ汚染度は断片的にしかわかっておらず、検査成績が農場のサルモネラ対策に十分寄与しているとも考えにくい。本稿ではEUで実施しているような豚のサルモネラ抗体検査キットと同等なものを簡易に作製できるELISAシステムについて紹介したい。

LPS抽出キットを用いたSCからのELISA抗原用LPSの抽出精製

事前準備試薬

- ・クロロホルム
- ・70%エタノール
- ・10mM Tris-HCl (pH 8.0)
- ・LPS Extraction Kit (iNtRON BIOTECHNOLOGY Cat# 17141 100 reaction)

1. 5mlのBHI培養菌液(SC Ci-0606株, 37°C, 20時間培養)を13,000 rpm 30秒間遠心し、上清を捨てる。
2. ペレットに1mlのキットに同梱のライシスバッファーを加え、菌液が均一になるまでボルテックスあるいはピペッティングする。
3. 200 μ lのクロロホルムを加え20秒間ボルテックスし、5分間室温に静置する。
4. 4°C, 1,3000 rpmで10分間遠心し、上清400 μ lを新たな1.5mlチューブにとる。
5. 800 μ lのキット同梱のピュリフィケーションバッファーを加え、転倒混和し、-20°Cで10分間静置する。
6. 4°C, 1,3000 rpmで15分間遠心。
7. 溶液をデカンテーションで捨て、1mlの70%エタノールでチューブをリンスし、チューブ

を風乾させる。

8. 100 μ lの10mM Tris-HCl (pH 8.0)を加えボルテックスした後チューブを100°C, 1分間煮沸する。この時点で溶液が白濁している場合は1,3000 rpmで5分間遠心し上清をLPS抗原液とする。LPS抗原液は-20°Cで長期保存可能である。
9. このLPS抗原液をELISA抗原として用いる場合は食塩濃度3.15MのPBS(通常のPBSに3MのNaClを加えて作製)で150倍希釈し、ヌンク社製ポリソープELISAプレートに100 μ lずつ加え固相化する(4°C, 20時間以上5日間以内)。

SC (O6, 7) サルモネラ ELISA の方法

事前準備試薬

- ・10x ブロッキング液: ロッシェ社製ブロッキングリジェント(50g入り)を500mlの0.05% Tween20加PBSで溶解させたもの(60°C位に加熱しながら少量ずつ1N NaOHを加えて完全に溶解させ、pHを7.2~7.5の範囲に調整)。
- ・0.05% Tween20加PBS
- ・ペルオキシターゼ標識抗豚IgG(特に特異性は問わない)
- ・ABTS基質(シグマ, #A9941)とリン酸クエン酸バッファー(シグマ, #P4809-50T)(共にタブレットタイプ)
- ・30%過酸化水素水
- ・豚コントロール陽性および陰性血清*

1. 固相化したプレートの溶液を捨て、0.05% Tween20加PBSでウエルを2回洗浄し、0.05% Tween20加PBSで2xブロッキング液に調整

簡易 LPS 抽出キットを用いた豚サルモネラの ELISA 抗原調整と診断

したものを各ウエルに 200 μ l ずつ加え、室温で 1～3 時間静置する。

2. ブロッキング液を捨て、0.05%Tween20 加 PBS で 2 回洗浄する。ここで風乾した後よく乾燥した冷暗所なら長期保存できる。室温でも乾燥した場所なら少なくとも数週間は安定している。
3. 0.05%Tween20 加 PBS で 0.5x ブロッキング液を調整し、陽陰性血清と被検血清を 1:100 希釈する。
4. 各希釈血清を 100 μ l ずつ各ウエルに加え、室温で 1 時間反応させる。
5. 希釈血清液を捨て、0.05%Tween20 加 PBS で 3 回洗浄する。
6. ペルオキシターゼ標識抗豚 IgG を 0.5x ブロッキング液で 2000～3000 倍希釈したものを 100 μ l ずつ各ウエルに加え、室温で 1 時間反応させる。
7. 液を捨て 0.05%Tween20 加 PBS で 5 回洗浄する。
8. ABTS 基質液 (ABTS: 10mg/20 ml に 30%過酸化水素水 5 μ l) を加え、室温で反応させ陽性コントロールの OD 値が 0.8～1.2 位を示した時点で肉眼または ELISA リーダー OD405 nm で判定。通常は 30 分～40 分位の反応時間である。

試験の成立条件と判定

- ・陽陰性コントロールの OD 値からブランクの値を引いたそれぞれの値を比較する。陽性コントロールの値が陰性コントロールのその 8 倍以上あれば試験は成立。

判定法 (1 を推奨)

1. 被検サンプルの OD 値から陰性コントロールの OD 値を差し引いた値が陽性コントロールの OD 値から陰性コントロールの OD 値を差し引いた値の 20% を越えた場合、被検血清は陽性と判定する。
2. 陽性コントロールの OD 値が 0.8～1.2 を示した時点で、被検サンプルの OD 値が 0.2 を越えた場合、被検血清は陽性と判定する。

* 豚の陽性および陰性コントロール血清は動物衛生研究所、小林秀樹が供給しております。

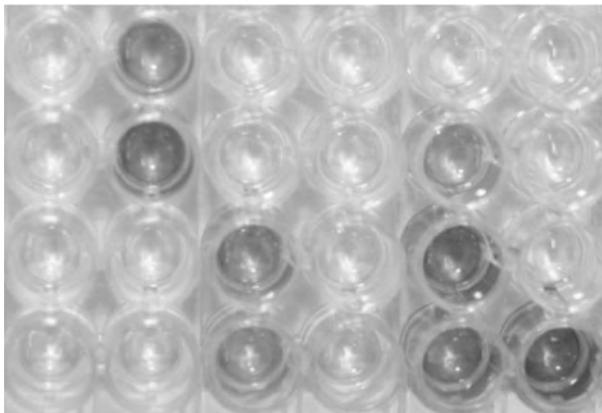
ここに紹介した LPS Extraction Kit を使用することにより SC の LPS 抗原以外にも ST や大腸菌等のグラム陰性菌から LPS を抽出精製することが可能である。また、このプロトコールに基づいた倍数量でのキットの使用もできるので大量精製も可能である。サルモネラのうち SC の LPS 抗原や SC と同じタイプの LPS 抗原 (O6, 7) は市販されていないが、ST や SE 等のサルモネラ精製 LPS 抗原はシグマ等で購入可能である。これら市販品を ELISA 抗原とする場合も本プロトコールに準じて ELISA 検査が可能である。この場合、市販の LPS を 10mM Tris-HCl (pH 8.0) で加温溶解し、濃度を 600～1000 μ g/ml に調整する。プレート固相化時には調整した LPS 抗原液を食塩濃度 3.15M の PBS で 200 倍に希釈し、ウエルあたり 100 μ l を加える。後の術式は上述のプロトコールと同じである。市販の LPS は精製グレードによるものなのか、バックグラウンドがやや高くでる傾向がある。

被検血清の収集

豚は加齢と共にサルモネラやサルモネラ以外の

種々の細菌に暴露され多様な免疫グロブリンを産生する。また、幼若期にサルモネラに感染した個体は、ある一定期間の高い抗体価を維持した後、徐々に抗体価が下がっていく。したがって繁殖豚を被検とした場合の成績は必ずしも真実と一致しない可能性がある。EU では、繁殖農場の ELISA

検査の対象を 4～7 ヶ月齢の豚に限定して実施している。子豚がサルモネラに初めて感染する最も危険な時期は哺乳期から肥育初期と考えられ、感染後、抗体価が十分高くなっている 4～7 ヶ月齢の豚を採材対象にしていると考えられる。



SC 菌体から LPS 抽出キットを用いて作製した抗原による ELISA