

Fig. 7 Rif耐性変異率

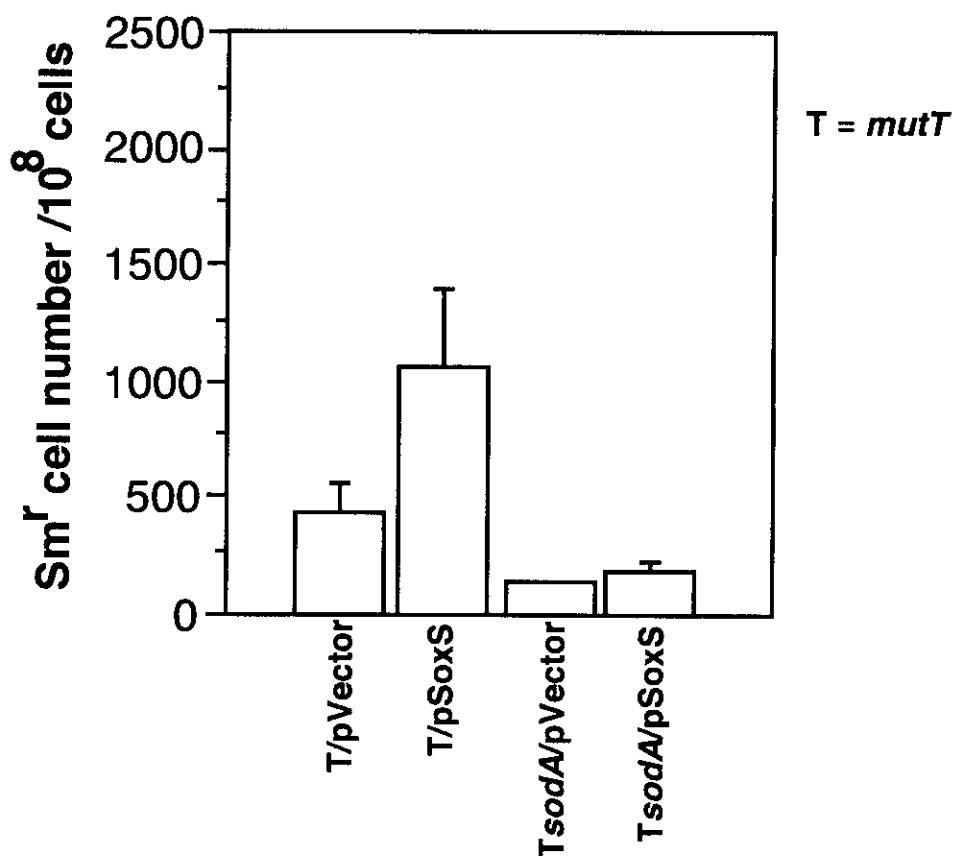


Fig. 8 Sm耐性変異率

## 12. PCR法によるVT1およびVT2遺伝子の定量に関する基礎的検討

研究協力者：蒲沢一行、高橋清実

(岩手医科大学細菌学講座)

### A. 研究要旨

Quantitative Competitive PCR (QCPCR)法により腸管出血性大腸菌(EHEC) O157:H7のVT1およびVT2遺伝子の定量を行い菌数及びVero毒素との関わりについて基礎的検討を行った。

1. LB培地で培養した分離菌株の菌数は、どの増殖期においても総菌数は、生菌数の約1.5倍多かった。2. QCPCRのサイクル数の検討では総菌数 $10^6$ 個/ $\mu$ l～ $10^3$ 個/ $\mu$ lでは30サイクル、 $10^2$ 個/ $\mu$ l～ $10^0$ 個/ $\mu$ lでは40サイクル必要であった。3. 総菌数とVT遺伝子の相対量の検討では、VT1およびVT2ともに、総菌数の増加に従って各遺伝子の相対量も増加し、良好な相関が得られた(VT1;  $r = 0.999$ 、VT2;  $r = 0.999$ )。4. 培養時間による菌数、VT遺伝子相対量およびVero毒素産生の変化では、培養4時間ではVero毒素は検出されなかったが、VT1は培養6時間以後、VT2は培養12時間以後検出された。菌数およびVT遺伝子相対量の増加とともに毒素の産生は増加傾向を示したが、12時間以降はほぼ一定となった。

### B. 研究目的

遺伝子技術としてのPCR法は、迅速かつ高感度のため微量検体からの遺伝子検査を可能とした。VTを産生する腸管出血性大腸菌の遺伝子発現量の評価は病態の判定において重要であるため、初期鑄型量を求めるPCR定量化システムの確立が望まれる。

今回我々は腸管出血性大腸菌(EHEC)VT遺伝子の定量と菌数との関連を検討し、患者糞便から直接抽出したDNAを用いて菌量およびVero毒素量の推移をみることを目的としてquantitative competitive PCR(QCPCR)法を行った。

### C. 研究材料および方法

#### 1. 使用菌種および培養

盛岡市立M小学校でのO157大腸菌の集団感染事例(1996年)から分離されたO157菌株を用い<sup>1)</sup>、LB培地により37℃で2～48時間好氣的に静置培養した。

#### 2. 菌数計算

##### 1) 生菌数

1. 静置培養した菌液の10倍階段希釈列を作製し、普通寒天培地を用いて培養後、各コロニー数から生菌数を算出した。これを4回測定した。

##### 2) 総菌数

静置培養した菌液を20%中性緩衝ホルマリンで不活化し、バクテリア・カウンターを用いて数え総菌数を算出した。これを4回測定した。

#### 3. DNAサンプルの調整

静置培養した菌液(総菌数 $5 \times 10^8$ 個/ml)の2mlから9000rpm・5分間の遠心により集菌し、PBS(-)で洗浄後TE buffer 200 $\mu$ lに再浮遊し100℃で10分間加熱処理をした。この遠心上清をDNAサンプル(菌数 $1 \times 10^0 \sim 10^6$ 個/ $\mu$ l相当のDNA)として、希釈列を作り、以下の方法により定量を行った。

#### 4. QCPCR法

1) 目的 DNA の増幅に使用するプライマー

Vero 毒素 1 型および 2 型それぞれの subunit A をコードする遺伝子の特異的部分について設計されたものを用いた<sup>2, 3)</sup>。(表 1)

#### 1) DNACompetitor の作製

Competitive DNA Construction Kit (TaKaRa, Kyoto, Japan) を用いてマニュアルに従い、DNA competitor 作製用 template の増幅部位を決め DNACompetitor 増幅用プライマーを合成し、PCR 法 (変性 94 °C で 30 秒・アニーリング 62 °C で 1 分・伸長 72 °C で 1 分を 38 サイクル) により VT1 および VT2 の competitor (サイズはそれぞれ 289bp および 339bp である) を作製した。PCR SELECT Spin Column (5 Prime → 3 Prime Inc., Boulder, CO) を用いて精製後、吸光度 (OD260) を測定し、マニュアルの計算式に従いコピー数を計算した。

#### 3) QCPCR

3. で希釈した DNA サンプル希釈列の 2 μl (総菌数  $1 \times 10^9 \sim 10^6$  個/μl 相当の DNA)、各 0.25 μM のプライマー、各 200 μM の dNTPs、2.5 mM の MgCl<sub>2</sub>、0.1 U の Taq DNA polymerase (Sigma, St. Louis, MO)、1 × PCR buffer に、 $10^8 \sim 10^0$  copies/μl の competitor 希釈列をそれぞれ 2 μl 加え、40 μl の反応系で行った。PCR は、94 °C で 2 分間加熱変性後、変性 94 °C で 30 秒・アニーリング 55 °C で 1 分・伸長 72 °C で 1 分を 1 サイクルとした。PCR で初期鋳型量により増幅効率が異なるので適当なサイクル数を設定するため、25 サイクル～45 サイクルまで 5 サイクルずつ増加し検討した。反応終了後 3% NuSieve3:1 agarose で電気泳動し、ethidium bromide で染色後写真撮影し判定した。

#### 5. Vero 毒素の検出

Vero 毒素の検出は以下の二法により行った。

#### 1) ELISA 法

ノバパス・ベロ毒素 EIA (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ社) を使用し、1. の菌液 1ml から 9000 rpm・5 分間の遠心により集菌し、1ml の硫酸ポリミキシン B 溶液 (5000 単位/ml) に再浮遊させた。37 °C 5～10 分毎に振盪を加えながら 30 分間反応させた。浮遊液を 3000 rpm・15 分間遠心分離して採取した上清を検体希釈液で 5 倍希釈したものを使用した。マニュアルに従って、操作を行い、吸光度を測定した。

#### 2) 逆受身ラテックス凝集反応法

VTEC-RPLA 「生研」(デンカ生研、東京、日本) を用い、5.1) と同じ検体を使用した。マニュアルに従って、操作を行い、凝集価を測定した。

### D. 研究結果

#### 1) 細菌数の経時的变化 (図 1)

生菌数は、培養 2 時間では  $1.2 \sim 2.7 \times 10^5$  個/ml、6 時間では  $3.1 \sim 9.0 \times 10^7$  個/ml、12 時間では  $2.3 \sim 3.9 \times 10^8$  個/ml であり、対数増殖を示した。その後 24 時間では  $3.3 \sim 3.8 \times 10^8$  個/ml、36 時間では  $4.3 \sim 5.3 \times 10^8$  個/ml、48 時間では  $4.6 \sim 6.8 \times 10^8$  個/ml であり、わずかに増加傾向を示すもののほぼ一定となった。総菌数は、どの増殖期においても生菌数の約 1.5～2 倍多かった。

#### 2. QCPCR のサイクル数の検討

総菌数  $10^6$  個/μl および  $10^5$  個/μl 相当の DNA では、VT1 および VT2 とともに 25、30、35 サイクルで判定が良好、 $10^4$  個/μl および  $10^3$  個/μl では同じく 30、35、40 サイクルで判定が良好、 $10^2$  個/μl および  $10^1$  個/μl では同じく判定が良好であった。 $10^0$  個/μl では、VT1 で 45 サイクルで判定が良好であった

が、VT2 では 45 サイクルでは判定できなかった。

以上より、総菌数  $10^6$  個/ $\mu$ l  $\sim$   $10^3$  個/ $\mu$ l では 30 サイクル、 $10^2$  個/ $\mu$ l  $\sim$   $10^0$  個/ $\mu$ l では 40 サイクルで QCPCR を施行し以下の結果を得た。また、この反応条件下では増幅産物量はプラトーに達しなかった。

### 3. 総菌数と VT 遺伝子の相対量の検討

泳動写真による判定は、目的 DNA 由来の増幅産物量 (T) と competitor 由来の増幅産物量 (C) の比、 $T:C = 1:1$  になる competitor の初期鋳型量をもって目的 DNA の相対量とした。VT1 (図 2 A) および VT2 (図 2 B) とともに、総菌数の増加に従って各遺伝子の相対量も増加し、良好な相関が得られた (VT1 ;  $r = 0.999$ 、VT2 ;  $r = 0.999$ )。

### 4. 培養時間による菌数、VT 遺伝子相対量および Vero 毒素産生の変化

培養 4 時間では Vero 毒素は検出されなかったが、VT1 は培養 6 時間以後、VT2 は培養 12 時間以後検出された。菌数および VT 遺伝子相対量の増加とともに毒素の産生は増加傾向を示したが、12 時間以降はほぼ一定となった。(表 2)

## E. 考案

DNA の定量は、PCR 反応による産物から測定する ELISA 法<sup>4)</sup>、比較 PCR 法 (Comparative PCR)<sup>5)</sup>、競合的 PCR 法 (Competitive PCR)<sup>6)</sup>、リアルタイム定量 PCR 法 (Real Time Quantitative PCR)<sup>7)</sup>などの定量的 PCR 法が開発されている。現在、競合法が広く定量法として用いられているが、その中で、プライマー対を 1 対使用する方法はプライマー対を 2 対使用する方法に比べ PCR 産物が一定の増幅からプラトーとなる現象の指数増幅期を捉えることと、プライマーがプラトーに達したとき target 及び Competitor 同

時に枯渇する特性が高く、今回、我々はこの方法を用いた。

我々が作製した DNA competitor は、プライマーのアニーリング部位以外は目的とする DNA と全く異なる内部塩基配列を持つものであるが、目的 DNA と同じプライマーで増幅できること、また competitor と目的 DNA の増幅産物の大きさの差をできるだけ小さくしたので、増幅効率の差は比較的小さいものと考えられる。

さらに PCR 増幅産物が電気泳動により十分検出できる生成量であり、かつ指数関数的に増加している条件を設定しその範囲内で定量しなければならない。さまざまな DNA 量の検体について同じ条件下で QCPCR 法を行い判定することは困難であるため、我々は目的 DNA の量により反応サイクル数を変えることで、総菌数  $10^6$  個/ $\mu$ l  $\sim$   $10^0$  個/ $\mu$ l 相当の VT1 および VT2 遺伝子量を判定できた。

VT1、VT2 の遺伝子量と Vero 毒素の産生量の関係では硫酸ポリミキシン B 溶液の処理容量とノバパス・ベロ毒素 EIA のマニュアルの希釈率を変えることで菌数  $10^5$  個/ml (VT1: $10^5$ 、VT2: $10^4$ copies/ $\mu$ l/TEbuffer) まで相関が得られと思われる。今回の結果には示していないが、一定培養後の Vero 毒素の産生量には菌種ごとのばらつきがある。これは phage などの要因が関係している可能性があるため、定量を行う場合各々菌種ごと検量線の検討が必要と思われた。

今回 VT1 および VT2 とともに産生する O157 大腸菌株を用いて、総菌数とそれぞれの遺伝子量との関係を検討したが、菌数の増加に従って遺伝子相対量も増加し良好な相関が得られた。このことは抗生剤治療をうけた患者の糞便あるいは消毒剤処理後の汚染食品などの生菌が培養検出されにくい検体において、直接 DNA を抽出後 PCR により VT1 お

よび VT2 遺伝子を検出し<sup>3)</sup>、QCPCR によりその遺伝子量から検体中の総菌数を推定することが可能であり、非常に有用と考えられる。今後は、他の菌種についても同様に検討し応用したい。

## F. 結論

Quantitative Competitive PCR (QCPCR) 法により腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157:H7 の VT1 および VT2 遺伝子の相対量を求めた。さらにそれらと総菌数および Vero 毒素産生において良好な相関が認められた。

## G. 参考文献

- 1) 品川邦汎、他：岩手県盛岡市における対応と課題。公衆衛生研究 46,104-122,1997
- 2) 大島鉄雄、他：PCR 法による大腸菌 Vero 毒素遺伝子の検出。臨床病理 41(補),124,1993
- 3) 宍戸博、高橋清美：PCR 法による腸管出血性大腸菌 Vero 毒素遺伝子検出の迅速化に関する研究。岩手医誌 50,537-544,1998
- 4) Sano T, Smith CL, Cantor CR : Immuno-PCR ; very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. Science 258 : 120-122, 1992
- 5) Delidow. BC, Peluso JJ, White BA : Quantitative measurement of mRNAs by polymerase chain reaction. Gene Anal Tech 6 : 120-124, 1989
- 6) McCulloch RK, Choong CS, Hurley DM : An evaluation of type and size for use in the determination of mRNA by competitive PCR. PCR Methods Applic 4 : 219-226; 1995
- 7) Heid C, Stevens J, Livak KJ et al : Real time quantitative PCR. Genome Res 6 : 986-994, 1996

表1 Vero毒素遺伝子の検出および型別に用いたプライマー

毒素の種類	プライマーの塩基配列	増幅されるDNAのサイズ (塩基)
VT1	(F) CAACACTGGATGATCTCAG	349bp
	(R) CCCCTGAACTGCTAATA	
VT2	(F) ATCAGTCGTCACTCACTGGT	404bp
	(R) CCAGTTATCTGACATTCTG	

F: forward, R: reverse

表 2 培養時間による菌数、VT遺伝子コピー数及びVero毒素の変化

培養時間	生菌数 (個/ml)	総菌数 (個/ml)	VT遺伝子コピー数 (/ml)		Vero毒素			
			VT1	VT2	ELISA ※1 (OD値/25 μ l)	RPLA ※2 (凝集価/25 μ l)	VT1	VT2
4hr	5.2 × 10 <sup>4</sup>	7.8 × 10 <sup>4</sup>	3 × 10 <sup>5</sup>	5 × 10 <sup>4</sup>	0	<1	<1	<1
6hr	1.8 × 10 <sup>6</sup>	2.6 × 10 <sup>6</sup>	1 × 10 <sup>8</sup>	1 × 10 <sup>7</sup>	0.0125	4倍	<1	<1
12hr	2.6 × 10 <sup>8</sup>	4.3 × 10 <sup>8</sup>	1 × 10 <sup>10</sup>	3 × 10 <sup>9</sup>	2.6925	128倍	8倍	8倍
24hr	3.7 × 10 <sup>8</sup>	5.5 × 10 <sup>8</sup>	1 × 10 <sup>10</sup>	3 × 10 <sup>9</sup>	ND	128倍	8倍	8倍

※1：ノバパス・ベロ毒素EIA（日本バイオ・ラッドラボラトリーズ社） ※2：VTEC-RPLA「生研」（デンカ生研） ND：not done

細菌数/ml

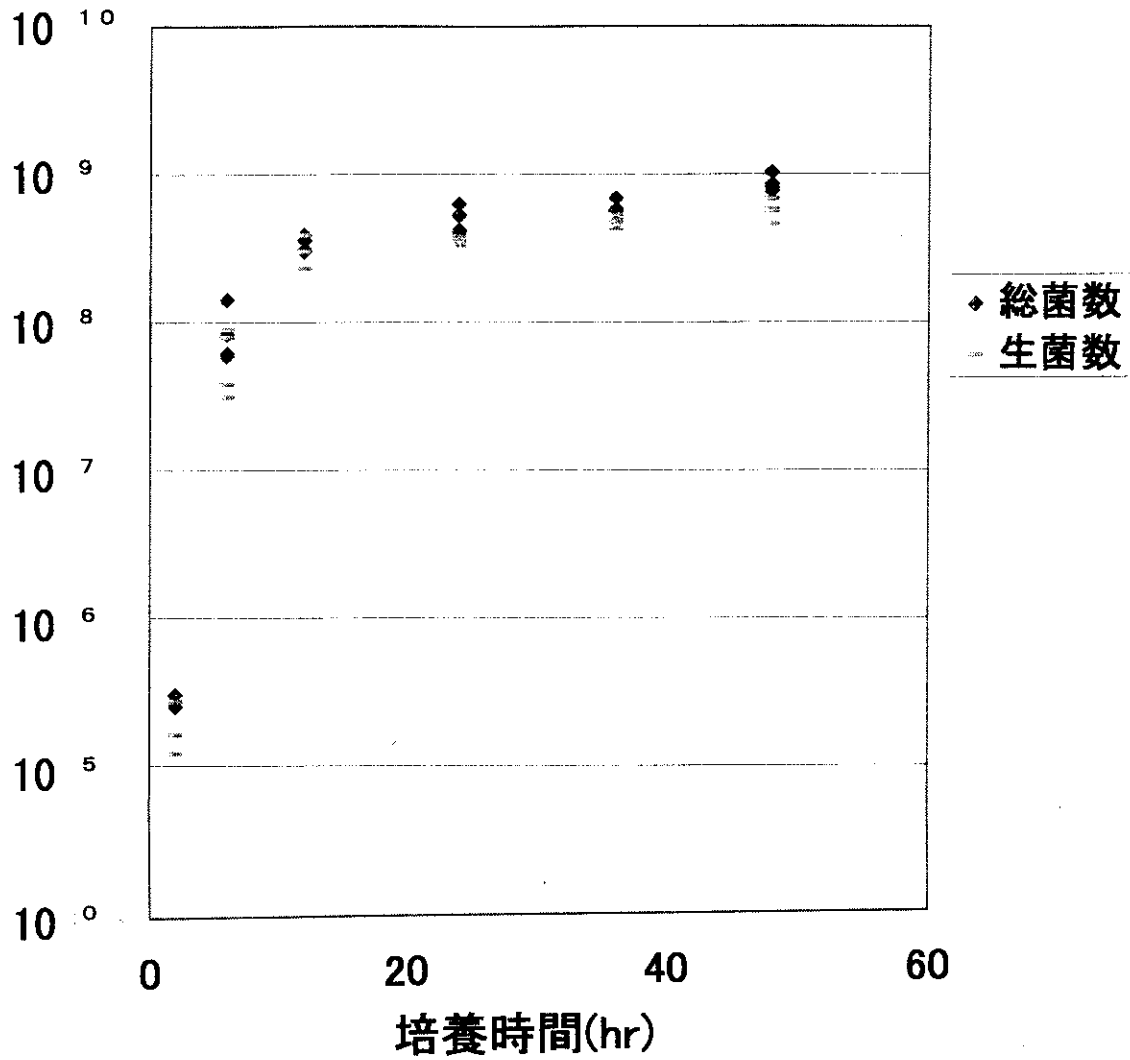
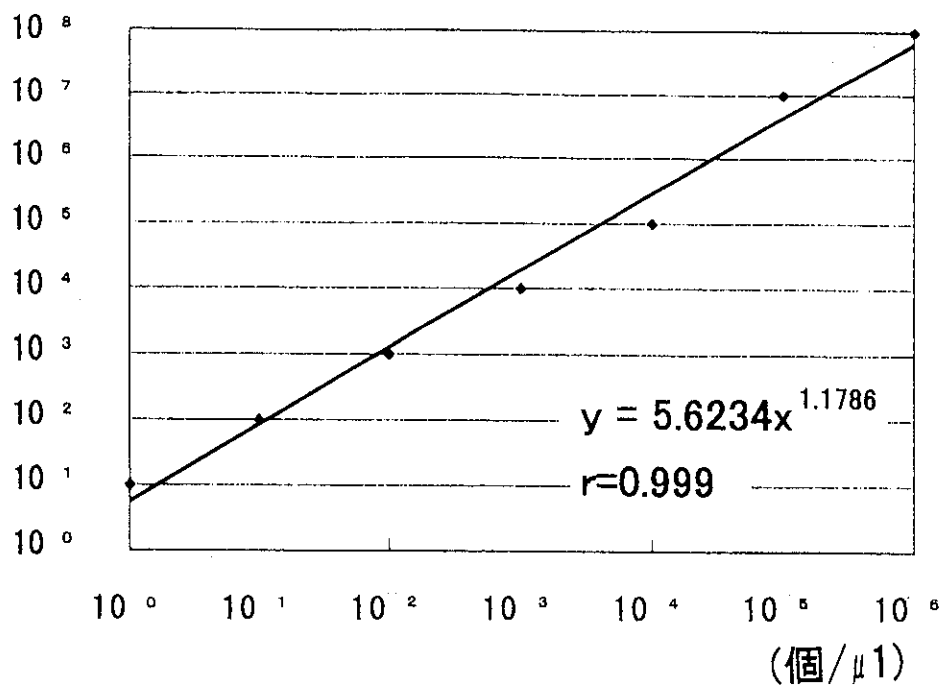


図1 E.coli O157:H7増殖曲線



**A** competitor  
コピー数/ $\mu$ l



**B** competitor  
コピー数/ $\mu$ l

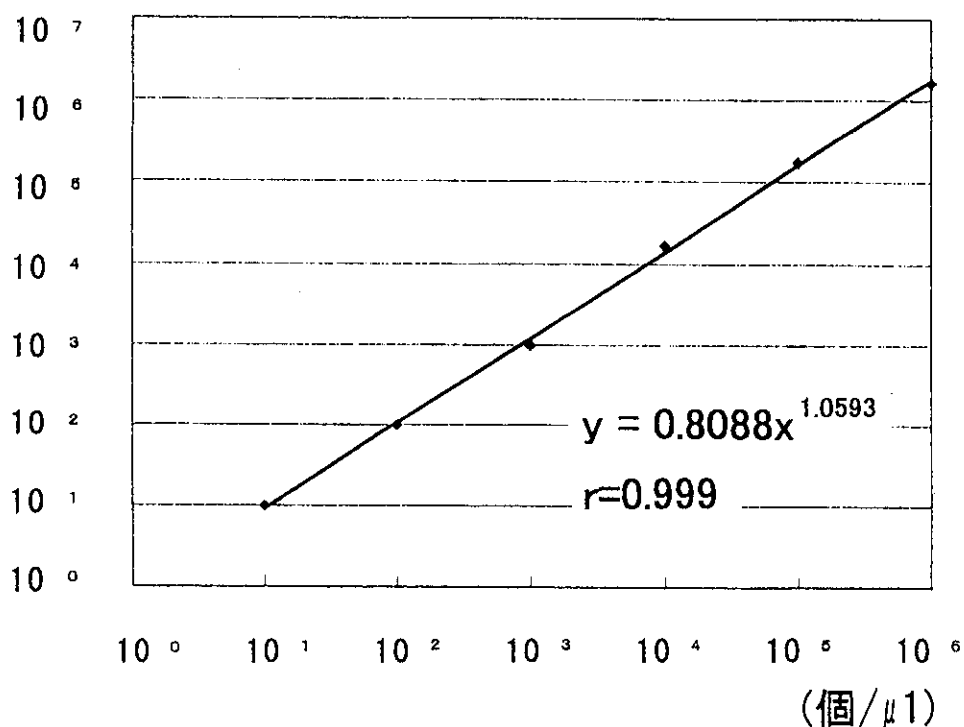


図2 菌数とVT1competitorコピー数(A), VT2competitorコピー数(B)

### 13. PCR産物の新たな定量法に関する基礎的検討 -DNA sequencerによる Microsatellite typing および定量的 Stx 遺伝子解析への応用-

研究協力者：

小野 葉子、石田 陽治、厨 信一郎、  
(岩手医科大学第三内科血液部門)  
N.H.Russell (Division of Haematology,  
Nottingham University, UK)

#### 研究要旨

Microsatellite typingにDNA sequencer ABI PRISM 377(Perkin-Elmer社)を利用し、個体識別およびその混合割合の検出に関する基礎的検討を行った。

本法は従来の方法に比較して簡便かつ高精度であり、今後 finger printing (ribo typing)、Vero 毒素遺伝子、Stx 遺伝子発現などの定量的遺伝子解析に応用可能と考えられた。

#### A. 研究目的

最近の実験機器の開発により、遺伝子解析の簡便化、精密化が試みられている。

造血幹細胞移植後の生着あるいは拒絶、再発の早期検出を目的として microsatellite typingが用いられ、donor/recipient 共存状態による mixed chimerism を定量的に評価し、DLI(donor lymphocyte infusion)等の免疫療法の有用な治療効果の指標となっている。

従来、STR(short tandem repeats)を利用した個体識別は、アクリルアミドゲルによる電気泳動、エチジンプロマイド或いは銀染色による検出を行い、手技が煩雑であった。

今回、DNA sequencer を用い、電気泳動から PCR 産物の定量的解析までを一台の機器で行い、その簡便化、解析精度の向上を計った。

#### B. 研究方法

〈対象および検体〉

健常人27人(6家系 計22人、非血縁者5人)、同種骨髄移植患者4例(悪性リンパ腫1例、急性白血病2例、多発性骨髄腫1例)、および各々の骨髄提供者4人(血縁者3人、非血縁者1人)計35人を対象とした。

上記の末梢血14ml、または骨髄液1mlを採取後、比重遠心法にて単核球を分離し、核酸抽出剤Sepa Gene(三光純薬)を用いDNA抽出を行った。

Microsatellite領域は、D6S264を選択し、(CA) repeatsによる polymorphism を解析した。

〈Primer〉

5' primer:

AGCTGACTTTATGCTGTTCCCT

3' primer:

ACTATCTTCCCGTACCTTTT

5' 末端を蛍光色素 (FAM) 標識。

〈PCR 条件〉

95°C	10min
↓	
95°C	30sec
X °C	15sec ※
72°C	15sec
↓	
95°C	30sec
54 °C	15sec (20 cycles)
72 °C	15sec
↓	
72°C	7min

※ X=74°C → 70°C → 66°C → 62°C → 58°C  
each 3cycles

〈PCR 反応液〉 (total volume 50 μ l)

10 × Golden Buffer*	5 μ l
Mg Cl <sub>2</sub>	2.0mM
dNTP	200 μ M
each primer	0.4 μ M
AmpliTaq Gold*	2.5U
DNA	<1 μ g
Water	up to 50 μ l

\* Perkin-Elmer 社

〈電気泳動〉

DNA sequencer は ABI PRISM 377 (Perkin-elmer 社) を使用した。

マニュアルに沿ってシ-クエンスゲル (4.5% 変性アクリルアミドゲル) および泳動サンプルを調整し、1.0X TBE にて 2.5 時間電気泳動を行った。(40mW)

核酸サイズマ-カ-として、GS500-TAMURA を使用した。

ゲル作成から電気泳動、泳動結果の解析終了まで約 5 時間であった。

〈Microsatellite typing- 定性および定量〉

ABI PRISM の付属解析ソフト Gene scan を用いて、

1. STR のサイズ (allele size) 同定
2. ホモあるいはヘテロ接合体の同定
3. allele peak の蛍光強度 (peak height) を測定した。

個体間の allele size [A] および [B] が異なる場合 (informative な場合)、その peak height [A'] および [B'] を用いて

$[\%A' = A' / (A' + B')] を算出し、mixed chimerism の相対的定量を行った。$

## C. 結果

〈D6S264 の定性的解析〉

末梢血あるいは骨髄液 35 検体の allele size 同定を行った。

2 bp 差の allele peak を同定可能であり、血縁者間においては 77.1%、非血縁者間においては 77.7% が D6S264 typing による個体識別が可能であった。(Table 1)

(CA)repeat 数 = 20 に強い集積を認め、34/35 例 (97.1%) に allele peak の発現を認めた。(Fig.1)

〈D6S264 の定量的解析〉

Daughter-3 と Others-2 (Table 1) の DNA を様々な割合で PCR 反応液中に混和し、microsatellite typing を行い、DNA 混合比率 (%) と、peak height によって算出された PCR 産物中の DNA 量比 ( $\%A = A / (A + B)$ ) の相関を検討した。(Fig.2)

Daughter-3 と Others-2 の混合 DNA 量比と PCR 産物中の蛍光強度比は強い正の相関を認め ( $r = 0.958$ )、5% の混合 DNA 量の検出が可能であった。しかしながら、statter peak (non-specific peak) の存在により allele peak が 8 bp 以上離れていない場合、同様の定量は不能であった。

## D. 考察

ヒト D6S264 の (CA) repeat 数による polymorphism を利用した個体識別とその相対的定量の基礎的検討を行った。

Microsatellite typing に DNA sequencer を用いた PCR 産物の解析を導入し、

1. STR の簡便、確実なサイズ決定、
2. allele peak が informative であり、かつ 8 bp 以上離れた場合、STR 混合比の高精度な定量

が可能であった。

しかしながら、1 repeat (2bp) 差の allele peak を発現する個体間の定量は不能であり、その原因である statter peak (non specific peak) を可能な限り抑制する為に、更に、PCR 条件の詳細な検討を行うことが必要と思われた。

DNA sequencer を利用した PCR 産物の定量的解析は今後、様々な分野に応用が可能と考えられ、例えば、腸管出血性大腸菌のベロ毒素遺伝子 (VT1 および VT2) の定量的検出による毒素産生能、菌の増殖能の評価等に有用と考えられた。

## E. 結論

DNA sequence ABI PRISM 377 を PCR 産物の分離、同定、および解析に用いた、遺伝子発現に関する簡便、高精度な定量的解析が可能であった。

## F. 引用文献

- 1) G. Mifflin, C.J. Stainer, G.I. Carter, J.L. Byrne, A.P. Haynes, N.H. Russell: Comparative serial quantitative measurement of chimerism following unmanipulated allogeneic transplantation of peripheral blood stem cells and bone marrow. British Journal of Haematology, 1999, 107, 429-440

## G. 学会発表

- 1) 小野葉子、村井一範、槍澤大樹、伊藤薫樹、石田陽治、厨 信一郎. Microsatellite typing による造血幹細胞移植後の mixed chimerism の定量的解析法、第 6 2 回日本血液学会総会、福岡、2000 年 3 月

# 《Qualitative analysis of D6S264-1》

allele size(bp/bp)		(CA)repeat数							
		18	19	20	21	22	23	24	25
father-1	111/111			■					
mother-1	111/115			■		■			
daughter-1	111/115			■		■			
daughter-1	111/115			■		■			
father-2	111/119			■				■	
mother-2	111/111			■					
son-2	111/111			■					
daughter-2	111/111			■					
father-3	111/111			■					
mother-3	111/113			■	■				
daughter-3	111/113			■	■				
daughter-3	111/113			■	■				
sister-4	111/121			■					■
sister-4	111/121			■					■
brother-4	111/113			■	■				
son of sister-4	111/111			■					
son of sister-4	111/115			■		■			
son of sister-4	111/115			■		■			
mother-5	111/111			■					
daughter-5	107/111	■		■					
mother-6	111/115			■		■			
daughter-6	111/111			■					
patient-1	111/121			■					■
related donor-1	111/111			■					
patient-2	107/111	■		■					
unrelated donor-2	111/111			■					
patient-3	109/111		■	■					
related donor-3	111/111			■					
patient-4	111/113			■	■				
related donor-4	111/111			■					
others-1	111/115			■		■			
others-2	119/119							■	
others-3	111/111			■					
others-4	111/111			■					
others-5	111/113			■	■				
n= (延べ)		2	1	34	6	7	0	2	3

■	ホモ接合体
■	ヘテロ接合体

Table 1

- 2bp (1 repeat) の差を分離可能であった。
- 35例中、15例 (42.9%) がホモ接合体であり、20例 (57.1%) がヘテロ接合体であった。
- 血縁者間 (延べ38組) においては、27組 (71.1%) がinformativeであった。
- 非血縁者間 (延べ990組) においては、769組 (77.7%) がinformativeであった。

《Qualitative analysis of D6S264-2》

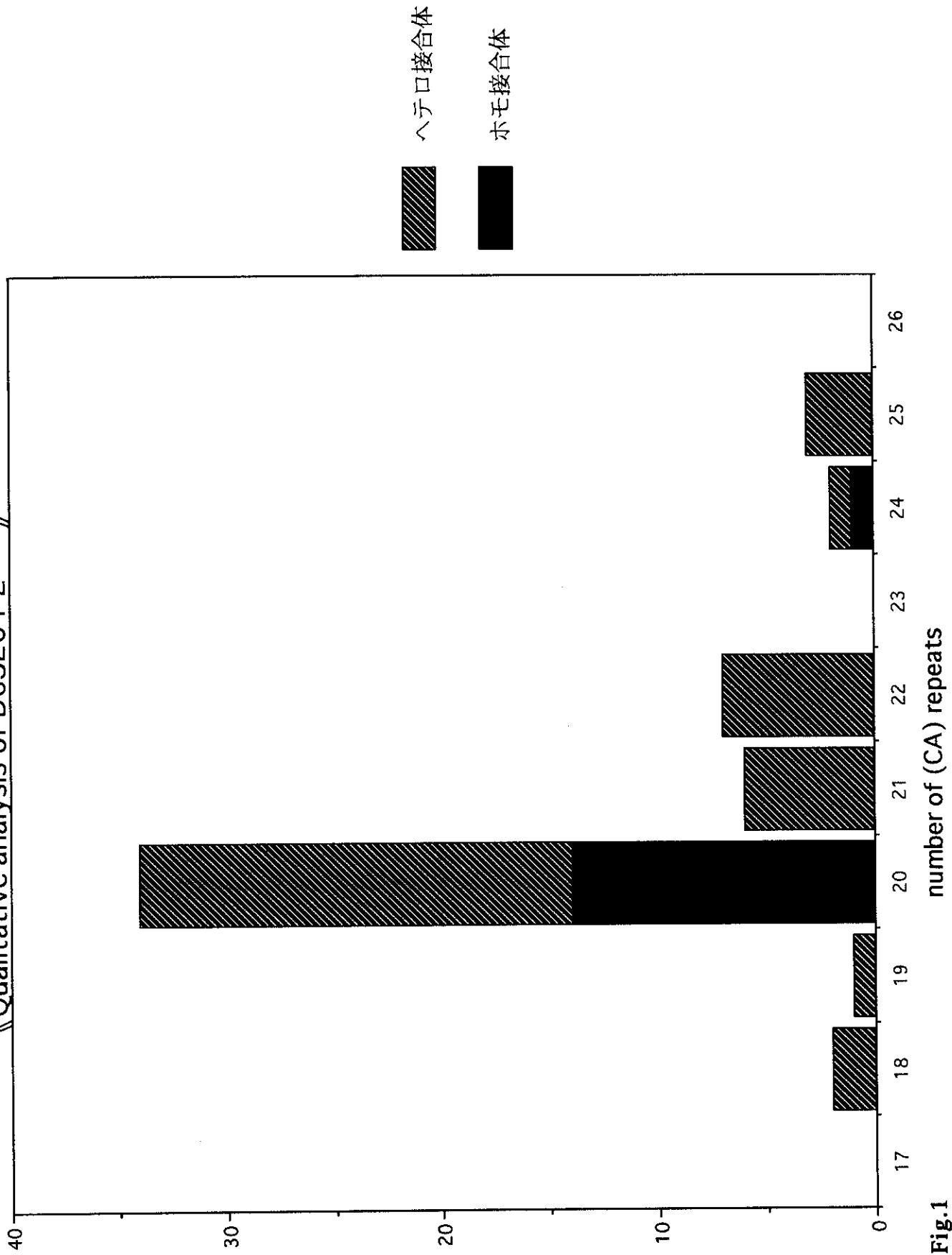
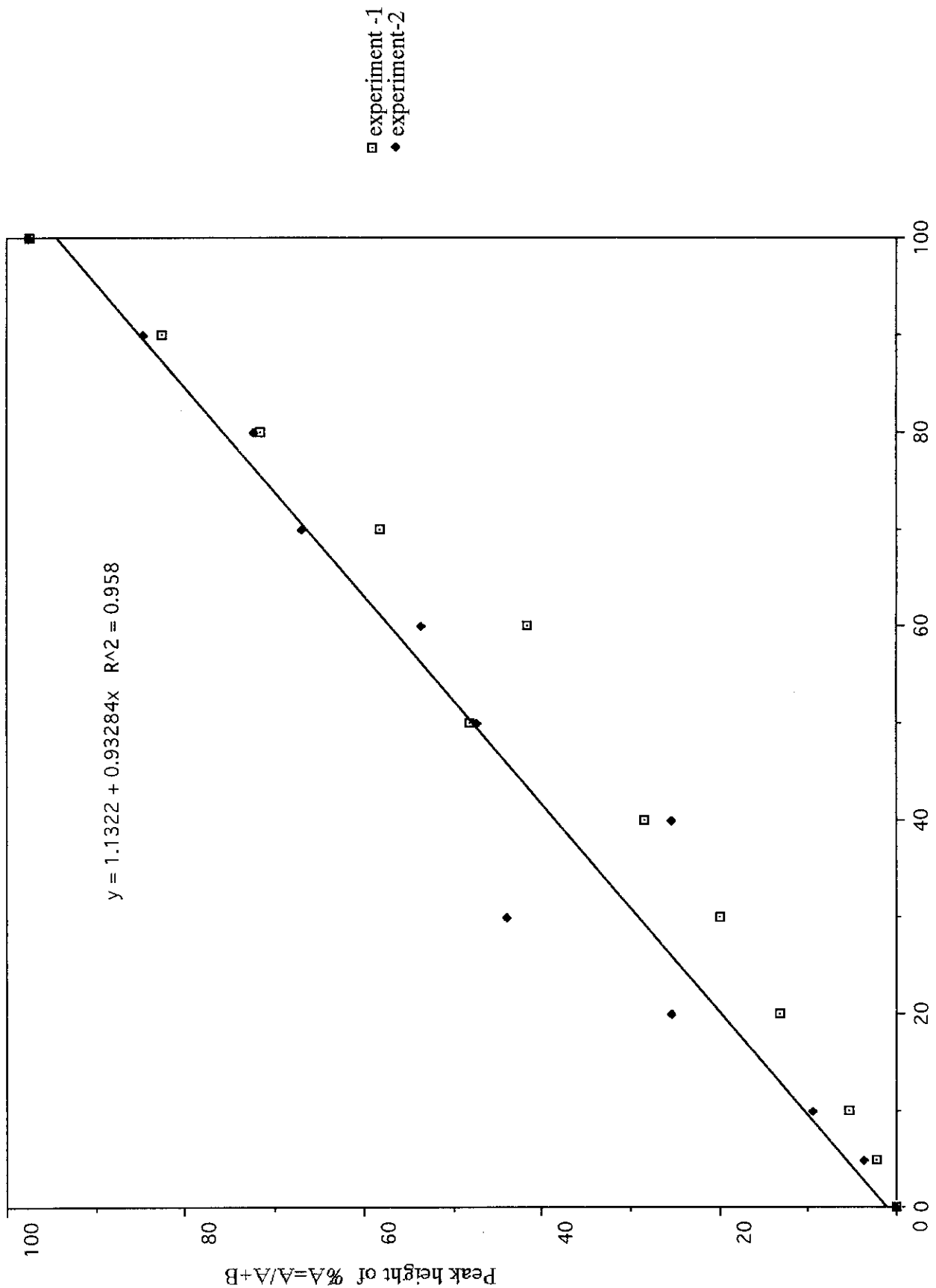


Fig.1

●D6S264の(CA) repeat数は18-25回に分布し、その分布は均一では無く20回に強い集積を示した。

# 《Quantitative analysis of D6S264》



**Fig.2** ●Peak heightより算出された%Aは、DNA混合量を正の相関を示した。(r=0.958)  
●PCR反応液中のDNA量5%の個体識別が可能であった。

## 14. GERBUアジュバントを用いた不活化Stx免疫による ウサギおよびウシ血清抗体価の推移

分担研究者 佐藤成大（岩手医科大学細菌学講座）  
研究協力者 後藤太一、川畑享子、萱野裕是（小岩井農場技術研究センター）  
高橋清実、下沖 収、一戸奈穂子（岩手医科大学細菌学講座）  
藤村 朗、野坂洋一郎（岩手医科大学口腔解剖第一講座）

### 研究要旨

O157感染症において、ヒトでは一般にStxに対する抗体産生が低いことが知られている。しかし、市販のGERBU adjuvant は0.1%ホルマリン不活化Stxあるいは0.1%ホルマリン不活化腸管出血性大腸菌O157免疫後の抗Stx1および抗Stx2抗体産生に十分なアジュバント効果があることが、それぞれウサギおよびウシへの免疫実験により示された。したがって、Stxについての免疫原性はStx1、Stx2とも確認され、Stxトキソイドの実用化に向けてアジュバントが重要な因子であることが示唆された。

### 研究目的

ヒトのO157感染症では一般にShiga-like toxin (Stx) に対する抗体産生が低いことが知られており、我々もこの点を確認している。特にStx2については抗体産生が低く、このことがStxトキソイドによる予防免疫を研究する上で大きな障害になることが予想される。そこで今回アジュバント効果が Freund complete adjuvant よりも高いとされる市販のGERBUアジュバントを用い、ウサギおよびホルスタインを免疫し、Stxの免疫原性とともに入血清抗体価のレベルと推移を検討することを目的に実験を行った。

### 実験方法

実験動物：免疫には日本白色種ウサギ、2.5 kgのオス、3匹を使用した。ウシは小岩井技術研究センターの妊娠ホルスタイン牛2頭を使用した。

不活化Stx: デンカ生研製の精製不活化Stx1(A280 0.75)およびStx2(A280 0.45)を使用した。

不活化O157: 1997年の盛岡市内小学校

の集団感染事例から分離されたStx1およびStx2産性のO157: H7を $1.1 \times 10^{10}$ /mlの菌数で生理食塩水に浮遊させ、最終的に0.1%の濃度になるようにホルマリンを加え、7日間4℃で固定した。

免疫スケジュール：ウサギについては表1に示したように、合計7回のStxの接種を行い、初めの4回の皮下接種についてはGERBU adjuvant (GERBU Biotechnik) を使用し、摂取量を4等分して前肢下肢の付け根付近4カ所に接種した。アジュバントの使用については添付説明書にある製造元の指示に従った。5回から7回目の接種は耳静脈から静注した。対照のウサギにはPBSのみを皮下に接種した。

妊娠ホルスタイン牛についてはO157LPS抗体価および抗Stx抗体価の低いウシを選び、図1a、図1bに示すごとく、5回のスケジュールで免疫し、毎回 $1.7 \times 10^{11}$ /15 mlの0.1%ホルマリン不活化O157を数カ所に分けて皮下に接種した。初めの2回についてGERBU adjuvantを使用した。

新生子牛への初乳授乳：新生牛への抗体の移行を調べるため双生新生牛の一頭には初



乳を授乳させ、一頭には初乳を授乳させず、合成乳を飲ませた。

抗体価測定：ウサギについてはトキソイドを接種する前に耳静脈より採血を行い、血清分離をおこなって抗体価測定まで-70℃に保存した。ウシについても同様にトキソイド接種前に採血を行った。抗Stx抗体価の測定は逆サンドイッチELISA法を用いて測定した（表1注）。

## 結果

ウサギではStx1、Stx2ともに免疫4回目以降（図2a、図2b）良好な抗体産生を示した。妊娠ホルスタイン牛では3回目以降Stx1、Stx2ともに良好な抗体産生を示した（図1a、図1b）。Stx2抗体価のレベルはウサギにおいてはStx1の1/3～1/4程度であったが、ウシでは1/20～1/100程度であった。これは免疫方法の違いによることと、単位重量当たりの抗原量の違いを反映しているものと考えられる。子牛への移行抗体は初乳を飲んだ新生牛では十分高いレベルに達していたが、合成乳を飲まされた新生牛では検出されなかった（図1c、図1d）。

## 考察

Stx1およびStx2の抗原性は確認されたが、ELISAで十分測定可能なレベルの抗体産生をみるまで、アジュバントを加えてなお3回以上の免疫が必要であったことは、今後アジュバントも含め免疫の方法を研究する余地が十分残されていると考える。しかし、ウサギのStx2抗体産生性が予想以上に高かったことは、Stx2のトキソイド化も十分期待できるものと考えられる。ウシについては多くのウシが低いながら抗Stx抗体を保有するとの報告があり、今回の接種でウシの抗体産生がウサギに比べ若干早く立ち上がったことは、ブースター効果によるものとみることにもできる。ウシの初乳中に非常に高いレベルの抗Stx抗体が含まれること

が示されたが、抗体を含むミルクを飲と、消化管内でStxが中和され吸収が阻害される可能性があることから、予防投与を目的とした食品として、今後の開発が期待される。

## ホルマリン不活化Stx免疫ウサギにおける血清抗体価の推移 (表 1)

### 準備

精製不活化Stx1 (A280 0.75, デンカ生研)  
 精製不活化Stx2 (A280 0.45, デンカ生研)  
 GERBU ADJUVANT GA100(GERBU Biotechnik)  
 PBS  
 ウサギ：日本白色種, オス

### 免疫スケジュール

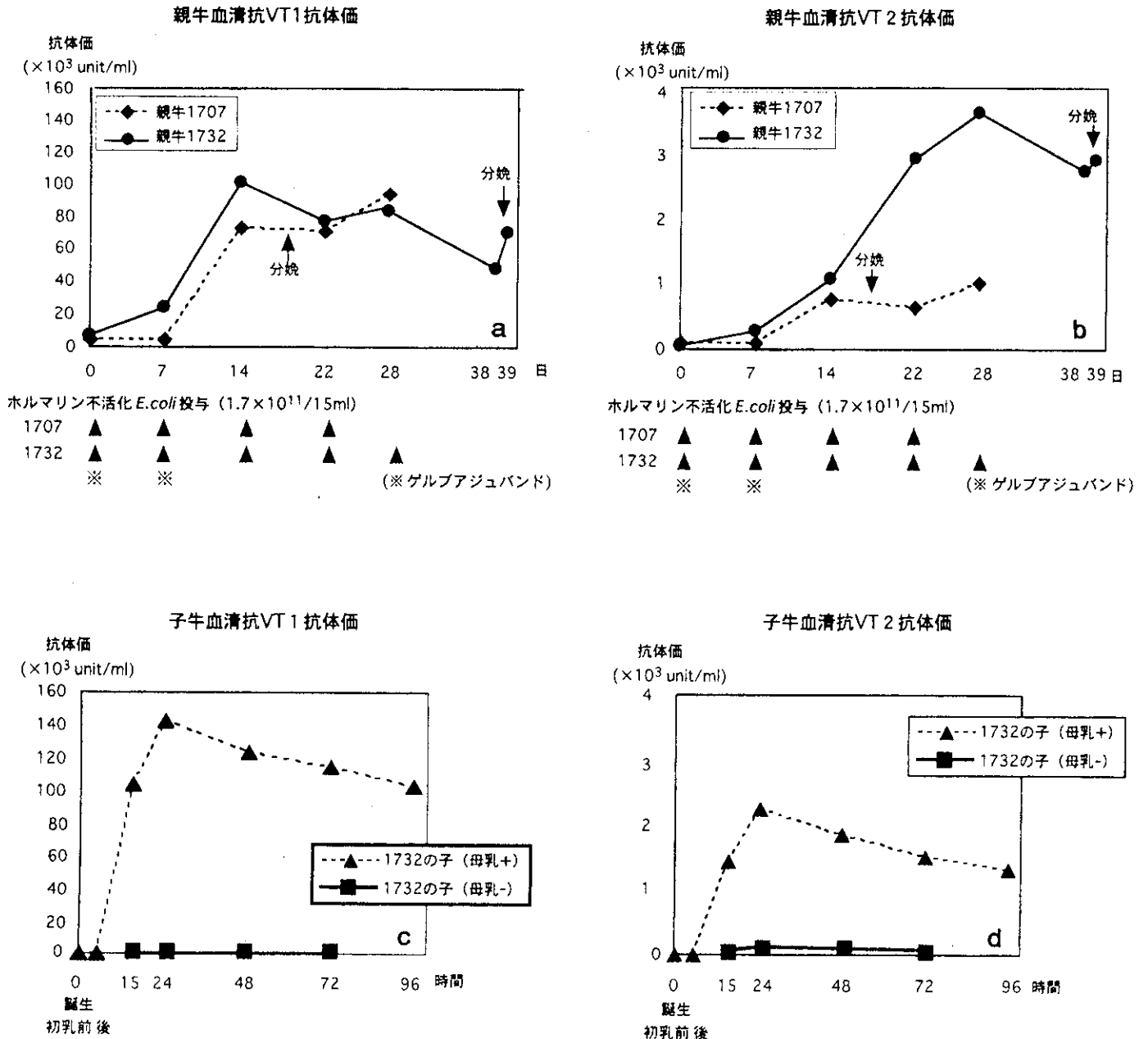
週 (week)	1	2	3	4	5	6	7
Stx1or2 接種量 ( $\mu\text{g}$ )	10	20	30	50	20	30	50
GA100	+	+	+	+	-	-	-
接種	皮下	皮下	皮下	皮下	耳静脈	耳静脈	耳静脈

いずれもStx接種前に採血して、血清を採取した。

### 血清抗Stx抗体測定法 (逆サンドイッチELISA法)

- (1) 精製Stx1(0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )または精製Stx2(0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )を各wellに100  $\mu\text{l}$ ずつ分注し、4°Cで一晩インキュベートして、コーティングする。
- (2) 洗浄後、被検血清(必要に応じて、1:4、1:40、1:100、1:400、1:1000に希釈)100  $\mu\text{l}$ を加え、緩やかに震盪しながら、室温で60分間反応させる。
- (3) 洗浄後、ビオチン標識Stx1 (0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )またはStx2(0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を100  $\mu\text{l}$ ずつ分注し、緩やかに震盪しながら、室温で60分間反応させる。
- (4) 洗浄後、ストレプトアビジン標識 $\beta$ -Dガラクトシダーゼ (1:50000に希釈)を100  $\mu\text{l}$ ずつ分注し、緩やかに震盪しながら、室温で60分間反応させる。
- (5) 洗浄後、基質4-メチルウンベリフェリル $\beta$ -D-ガラクトシド(0.2mM)を100  $\mu\text{l}$ ずつ分注し、緩やかに震盪しながら、37°Cで60分間反応させる。
- (6) 反応停止液(0.1Mグリシン-NaOH、pH10.2)を100  $\mu\text{l}$ ずつ分注して反応を止め、軽く攪拌後、蛍光光度計で測定する。

# ホルマリン不活化 *E.coli* 0157 投与後の 牛血清中抗VT1 および抗VT2 抗体の推移 (図1)



## ホルマリン不活化Stx免疫ウサギにおける 血清抗体価の推移 (図 2)

図1.Stx1免疫ウサギ血清抗Stx1抗体価

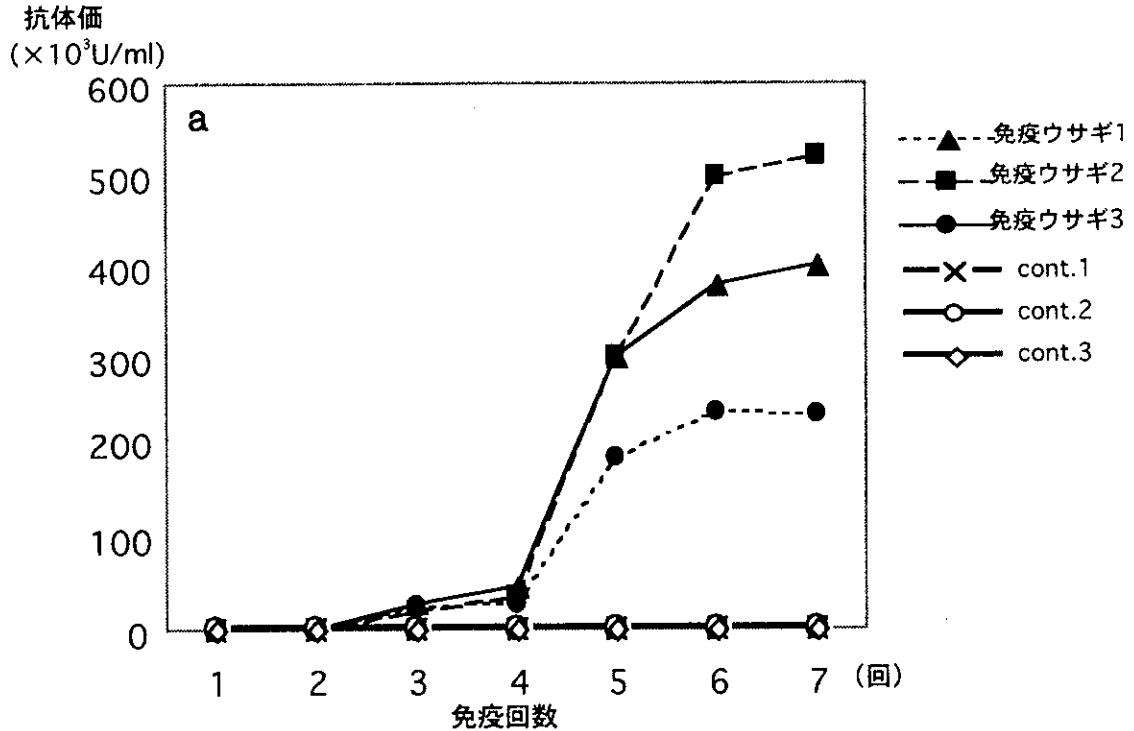


図2.Stx2免疫ウサギ血清抗Stx2抗体価

