

破傷風患者の病原体診断目的で開発した ELISA 法と破傷風菌の毒素産生能への応用

◎志多田 千恵¹⁾、坂本 智代美¹⁾、高橋 元秀¹⁾、久米田 幸介²⁾
熊本保健科学大学¹⁾、KM バイオロジクス株式会社²⁾

【目的】国内の破傷風患者数は例年約 120 名と報告されているが、起因菌である *Clostridium tetani* は土壤中に芽胞として存在しており、日常の生活環境で破傷風菌の感染リスクがあることを意識する人は少ない。我々は既に、熊本県内の土壤中の破傷風菌の分布調査をおこない、科学的に感染リスクを再確認している。一方で、分離した破傷風菌の同定は実験動物（マウス）を利用して毒素活性（麻痺・致死）を試験する方法が一般的である。我々は毒素定量を目的に ELISA 法の開発を進めており、本研究では本 ELISA 法を実験動物法と比較することにより、本法の実験動物を用いない試験法への転換の可能性を検討した。【方法】開発した ELISA 法は、1 ステップ・サンドウィッチ法で、純度の破傷風特異抗体をプレートに固相化し、HRP 標識破傷風抗体とあらかじめ任意に希釈した標準毒素液（活性既知）および検体毒素（活性未知）を同時に添加・混合し、37°C 2 時間反応させた。基質として TMB を添加し、37°C 30 分間静置後、1M 硫酸を添加して反応を停止し 2 波長（450 nm、620 nm）で吸

光度を測定し、標準液と検体毒素の用量反応曲線から平行線定量法により検体毒素の相対値を算出した。検体は、県内の土壌から分離した破傷風菌 166 株を BHI 培地に 37°C 96 時間培養した上清で、この毒素量を上記 ELISA で測定した。【結果】開発した ELISA 法で標準毒素液を 2 倍階段希釈して得られた結果、マウスの致死活性相当では 800~6000 LD₅₀ の範囲で測定可能であった。分離した 166 株の破傷風菌の培養上清を ELISA 法とマウス法と比較した結果は、それぞれ高値、中程度、低値の菌株に分類された。【考察】破傷風毒素活性試験としてマウス法から開発した ELISA 法への転換が可能と考えられた。感染患者から破傷風菌が分離されない場合には他の病原体診断が求められる。感染部のデブリドマン後の材料等には破傷風菌増殖に伴う毒素が混入する可能性が高い。これらの患者検体から破傷風毒素を検出することは臨床診断の一助となる。この開発した ELISA 法を基礎として、さらに迅速な方法であるイムノクロマト法の開発も進めている。 連絡先 096-275-2271