

### 3 3) 酵素抗体免疫測定法(ELISA)による冷水病菌に対する アユ血中特異抗体検出系の作製

金辻宏明

**【目的】** *Flavobacterium psychrophilum* を原因菌とするアユ冷水病は近年、非常に問題となっており早急に対策を講じる必要がある。この対策の一つにワクチンが考えられるが、開発を行うためには基礎的知見が乏しい。そこで本研究では冷水病に対するアユの免疫応答を明らかにする一環としてワクチン接種魚血清中の特異抗体(IgM)を酵素抗体免疫測定法(ELISA)で検出する系を作製した。

**【方法】** 用いた供試菌株(SG990302株)および培養方法およびホルマリン不活化菌体(FKC)の作製方法は前報<sup>1)</sup>と同様とした。ELISAでIgMおよびFKC特異アユIgMの検出を行った。なお、各試薬の調製法および略記は前報<sup>2)</sup>と同様とする。**正常血清中IgMの検出**：まず正常アユ血清をCBBで100～50万倍希釈し、ELISAプレートの各ウエルに100  $\mu$ lを加えて4°Cで16h固相化を行った。2回洗浄後、BSA-PBSを200  $\mu$ l/well加えて室温で30minブロッキングを行った。2回洗浄後、PBSで0.5、1および2.0  $\mu$ g/mlになるように希釈したアユIgMに対するHRP-IgGを100  $\mu$ l/well加えて4°Cで16h静置した。2回洗浄後、前述<sup>2)</sup>と同様にして発色、測定を行った。**特異抗体(IgM)の検出①**：まず、冷水病注射ワクチンを接種して凝集抗体価が1：16を示すアユ血清(特異アユ血清)をCBBで1、5および10万倍希釈し、100  $\mu$ l/wellを加えて4°Cで16h固相化を行った。2回洗浄後、BSA-PBSを200  $\mu$ l/wellを加えて室温で30minブロッキングを行い、2回洗浄してPBSで10  $\mu$ g/mlに希釈した超音波破壊FKCを各ウエルに100  $\mu$ l加えて室温で2h反応させた。2回洗浄後、PBSで1  $\mu$ g/mlに希釈した冷水病菌に対するHRP-IgGを100  $\mu$ l/well加えて4°Cで16h静置した。2回洗浄後、前述<sup>2)</sup>と同様にして発色、測定を行った。**検出②**：超音波破壊FKCを10  $\mu$ g/mlにCBBで希釈し、100  $\mu$ l/wellを加えて4°Cで16h固相化した。2回洗浄後、PBSで1、5および10万倍希釈した特異アユ血清を100  $\mu$ l/well加えて室温で2h反応させた。2回洗浄後、PBSで1  $\mu$ g/mlになるように希釈したアユIgMに対するHRP-IgGを各ウエルに100  $\mu$ l加えて4°Cで16h静置した。2回洗浄後、前述<sup>2)</sup>と同様にして発色、測定を行った。

**【結果】** 正常血清中のIgMをELISAで検出した結果を図1に示した。血清希釈倍率が50万倍から1万倍までの範囲で反応は直線(HRP-IgGが1  $\mu$ g/mlで特に良好)となり、それより濃厚な場合は1万倍と同程度の発色を示した。ゆえに、アユ血清中のIgMを検出する場合の血清希釈倍率は1万倍以上でHRP-IgGの濃度は1  $\mu$ g/mlの条件がよいと考えられた。つぎに、特異アユ血清中の特異抗体をELISAで検出した結果を図2および3に示した。検出①ではFKC濃度の上昇にともなって、各IgM検出区およびコントロールの発色がほぼ同程度であった。このことからこの系は非特異反応が高いと考えられ、検出には適さないと考えられた。検出②では特異アユ血清の希釈倍率が1万倍で10～1000ng/mlの範囲の濃度のFKCを検出することができた。ゆえに、特異抗体を検出する場合、特異アユ血清の希釈倍率は1万倍で前述のFKC濃度を検出可能と判断された。

文献 1) 金辻宏明：冷水病菌体を用いた免疫原性強化ワクチン作製方法の検討，平成14年度滋賀水試事報，in press (2003).  
2) 金辻宏明：酵素抗体免疫測定法(ELISA)によるアユ冷水病菌体検出系の作製，平成14年度滋賀水試事報，in press (2003).

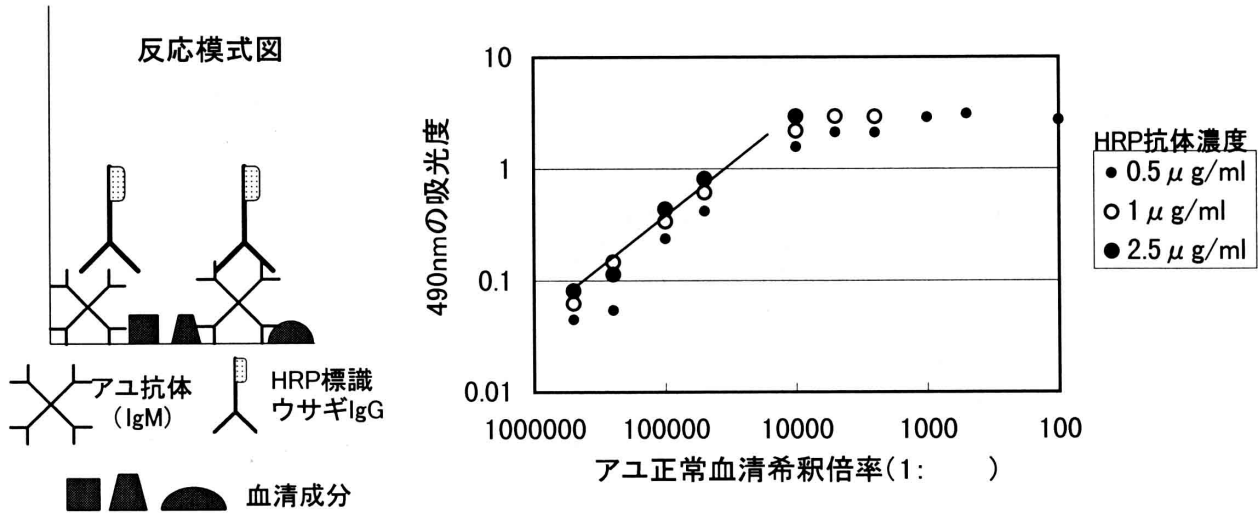


図1. アユ血清を固相化し、アユIgMに対する酵素標識IgGで検出したときの検量線.

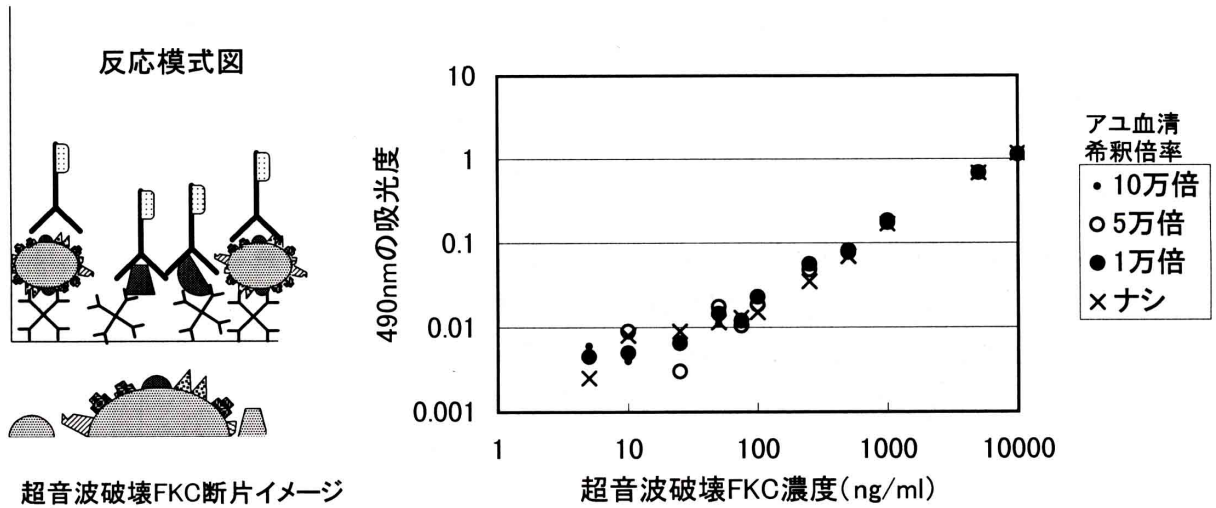


図2. アユ血清を固相化し、超音波破壊した冷水病FKCを反応させてFKCに対する酵素標識IgGで検出したときの検量線.

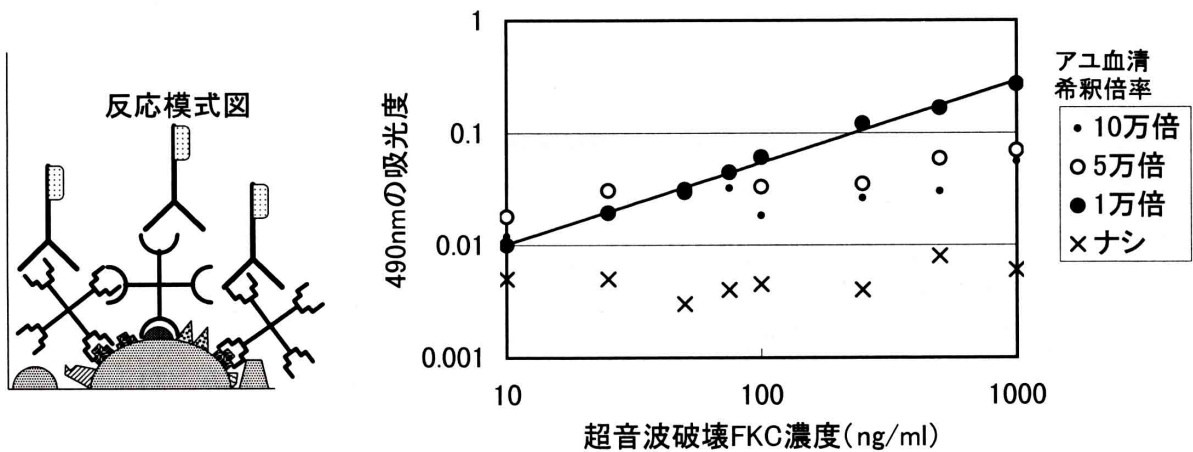


図3. 超音波破壊した冷水病FKCを固相化し、アユ血清を反応させてアユIgMに対する酵素標識IgGで検出したときの検量線.