

ELISA を用いたアユ血清中の抗冷水病菌抗体の測定手法

岡村 貴司

1. 目的

アユの養殖場において、依然として冷水病による被害が大きく、本県では抗病性の付与技術やワクチン開発に関する研究を進めている。これらの研究を進める中で、免疫獲得状況を数値化する手法としてマイクロタイター法が用いられている。しかし、この手法は測定結果を測定者が目視で判断するため、測定者による判断が大きく反映されるほか、血清の必要量が多く、精細なデータを多量に得ることは難しい。

このため、吸光度を機器で読み取る ELISA によりアユの血清中の抗冷水病菌抗体を測定する手順を確立し、今後の研究への一助とする。

2. 方法

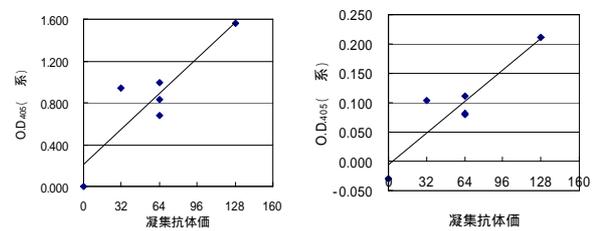
ELISA の測定手順は、下記の二つの系によって行った。

系では、抗原（冷水病菌）のコーティング、ブロッキング（ブロックエース、DSファーマイティカル(株)）、一次抗体（アユ血清中の抗冷水病菌抗体）の反応、二次抗体（Anti-IgM、AYU、Mouse-Mono、AQD 社）の反応、三次抗体（アルカリフォスファターゼ標識抗体：Anti-IgG、Mouse、Goat-Poly、KPL 社）の反応、p-ニトロフェニルリン酸六水和物による発色、吸光度（405nm）の測定を行った。

系では抗原のコーティング、ブロッキング、一次抗体の反応、二次抗体（上記[系の]の抗体にアルカリフォスファターゼ標識キット（双EIAイ(株)）により標識）の反応、発色、吸光度（405nm）の測定を行った。系のの標識キット以外は系と同じ試薬を用いた。

3. 結果

マイクロタイター法で測定した凝集抗体価と ELISA による測定値を比較したところ、系および系とも凝集抗体価との間に相関関係がみられた（ピアソンの積率相関係数、系の測定値と凝集抗体価 $r=0.89$ 、系の測定値と凝集抗体価 $r=0.92$ ）（図 1）。



凝集抗体価の 0 値は、<4 を指す。

図 1. 凝集抗体価と ELISA による測定値

次に、系および系を用いて同一サンプルを測定したところ、系の方が系よりも発色の度合いが高かったが、各系の測定値の間に高い相関関係が認められた（ピアソンの積率相関係数 $r=0.99$ ）（図 2）。

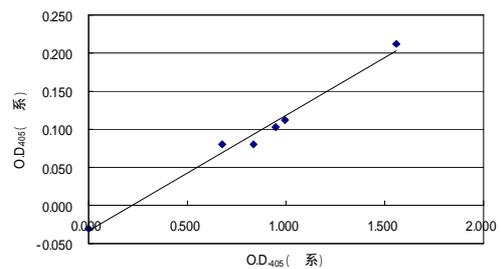


図 2. 系および系による同一サンプルの測定値(吸光度値 405nm)

系は三次抗体の反応を行わないため、作業や時間が短縮される。その代わり測定値が小さく誤差が高くなる可能性があるが、今回の結果からは問題なく測定に用いることができた。