

間接酵素抗体法による冷水病原菌の交差試験

相川 英明

A cross reaction test with antisera against *Flavobacterium psychrophilum* by Indirect Immunoperoxidase Technique .

Hideaki AIKAWA*

ABSTRACT

Indirect Immunoperoxidase Technique (IIPT) was developed for the diagnosis of coldwater disease. *Flavobacterium psychrophilum* cells were clearly distinguished from 6 species cells in the cross reaction test. The results suggested that IIPT was a rapid and reliable method for the diagnosis of coldwater disease.

緒言

現在、本邦において猛威を振るっているアユ冷水病について、筆者は間接酵素抗体法(以下、IIPT)による診断の有効性を明らかにした(相川 1998¹⁾)。しかし、血清学的診断手法の間接蛍光抗体法では交差反応の出現が報告されており(Gudding et.al²⁾)、IIPTでも交差反応による診断精度の低下が懸念される。

そこで、本報ではこれら問題に関して他の魚病細菌についても冷水病原菌 *Flavobacterium psychrophilum* に対する IIPT による交差試験を実施したので報告する。

材料及び方法

供試菌株

抗血清の作製に用いた菌株は徳島県のアユから分離された冷水病菌株、*Flavobacterium psychrophilum* の菌株 FPC840 (Wakabayashi et.al³⁾)である。また、交差試験に供試した菌株は Table 1 に示すとおり、冷水病菌以外の6菌種15株である。なお、*Flexibacter columnaris* は一次鑑別、コロニー形状、菌体観察から推定し、その他の菌株は魚病診断用抗血清によるスライド凝集で同定を行った。

Table 1. Specificity of rabbit anti-*Flavobacterium psychrophilum* against various bacterial species.

Organisms	Strain	Date of isolation	Fish	Location	Anti-FPC840		Anti-NCM
					Agglutinin titer of serum	IIPT	-1947 ³
<i>Flavobacterium</i> SP.	BGD-B-1-4 ^{*1}	June.14,1996	Brook charr	Yamanashi	<4	-	-
<i>Flavobacterium</i> SP.	BGD-B-1-5 ^{*1}	June.14,1996	Brook charr	Yamanashi	<4	-	-
<i>Flavobacterium</i> SP.	BGD-B-1-7 ^{*1}	June.14,1996	Brook charr	Yamanashi	<4	-	-
<i>Flavobacterium</i> SP.	BGD-B-1-8 ^{*1}	June.14,1996	Brook charr	Yamanashi	<4	-	-
<i>Flexibacter columnaris</i>		Dec. 9,1997	Carp	Kanagawa	<4	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>		May. 20,1996	Ayu	Kanagawa	<4	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>		Apl. 15,1997	Carp	Kanagawa	<4	-	-
<i>Aeromonas salmonicida</i>		Apl. 14,1997	Iwana	Kanagawa	<4	-	-
<i>Aeromonas salmonicida</i>		June.14,1996	Yamame	Kanagawa	<4	-	-
<i>Aeromonas salmonicida</i>		July. 7,1998	Yamame	Kanagawa	<4	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	FPC941		Ayu	Shiga	<4	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp.		May. 19,1997	Ayu	Kanagawa	<4	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp.		May. 21,1998	Ayu	Kanagawa	<4	-	-
<i>Streptococcus</i> sp.	92S3-0911 ^{*2}	Sep. 11,1992	Ayu	Wakayama	<4	-	-
<i>Streptococcus</i> sp.	92S3-0902-2 ^{*2}	Sep. 2,1993	Ayu	Wakayama	<4	-	-
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	FPC840		Ayu	Tokushima	512	+	+

*1 Supplied by Oshino branchi. Yamanashi Pref. Fish Exp. Stn.

*2 Supplied by Freshwater branchi, Wakayama Pref. Fish Exp. Stn.

*3 Supplied by Tokushima Pref. Fish Exp. Stn.

抗血清

冷水病菌株 FPC840 に対する家兎抗血清を常法により作製し、-80 で保存した。解凍した抗血清の供試菌 FPC840 に対する抗体価は 512 であった。この抗血清をプロテイン A カラムキット (Ampure PA Kit; アマシャム社) で精製し、安定剤として BSA を 1.0% となるように添加して 4 で保存した。また、徳島県水産試験場から分与された冷水病菌株 NCMB-1947 (Wakabayashi et. al³⁾) に対する家兎抗血清を同様に精製し供試した。

間接酵素抗体法

供試菌の塗沫標本を洗浄液 (WASH SOLUTION; KPL 社) で 5 分間 3 回洗浄し、PBS (-) で 10 倍に希釈した抗血清を標本に滴下した。これを保湿箱に入れ、37 で 30 分間反応させ、同様に洗浄した。次に PBS (-) で 50 倍に希釈したペルオキシターゼ標識抗体 (抗ウサギ IgG-ヤギ; 和光純薬工業社) を同様の方法で反応させ、洗浄した後、基質液 (4CN PEROXIDASE SUBSTRATE SYSTEM; KPL 社) で発色させた。さらに洗浄、風乾、グリセリンバッファーで封入後、光学顕微鏡で観察をした。

結果および考察

各供試菌株に対する IIPT の検鏡結果の一例を Fig. 1 に示す。Flavobacterium psychrophilum FPC840 は青色に染まったが、Flavobacterium sp. BGD-B-1-8 は染まらず冷水病菌のみに反応することが確認された。また、Table 1 に示すとおり冷水病菌以外の 8 菌種 15 株すべての凝集素価は 4 未満で、IIPT の結果も全て陰性であった。

これまでに、魚病学の分野ではいくつかの細菌性疾病の原因菌の検出に、血清学的手法の間接蛍光抗体法や IIPT の利用が試みられてきた。これら手法は、細菌性疾病の診断精度が細菌培養法に劣らずきわめて高く、また、その簡便性および迅速性において細菌培養法より優れ、実用性の高い診断法であると報告されている (許・若林 1994⁴⁾)。しかし、間接蛍光抗体法においてサケ科魚類の細菌性腎臓病原菌 Renibacterium salmoninarum の検出では共通抗原を有する細菌の存在 (吉水ら 1987⁵⁾)、また、サケ科魚類の間接蛍光抗体法による冷水病診断においては Flexibacter columnaris (Gudding et. al³⁾) および Aeromonas salmonicida (岐阜県 1998⁶⁾) との交差反応による偽陽性が指摘されている。このような交差反応の出現は正確な診断を困難にする。

この対策としてサケ科魚類の細菌性腎臓病原菌 Renibacterium salmoninarum では抗血清を精製すること (吉水ら 1987⁵⁾) や冷水病原菌の検出に対しては吸収操作が必須であること (Gudding et. al²⁾) が報告されている。

しかし、精製や吸収操作は煩雑であるため、実際の現場での診断方法としては困難を伴う。一方、本試験においては市販のキット用いることで抗血清を簡便に精製でき、魚病細菌の Flavobacterium sp., Flexibacter columnaris および Aeromonas salmonicida の交差試験の陰性が確かめられた。

既報では IIPT の早期診断の有効性を示したが、本試験においても上述のとおり IIPT の診断精度は高いことが確認された。このことから本法はアユ冷水病の迅速診断方

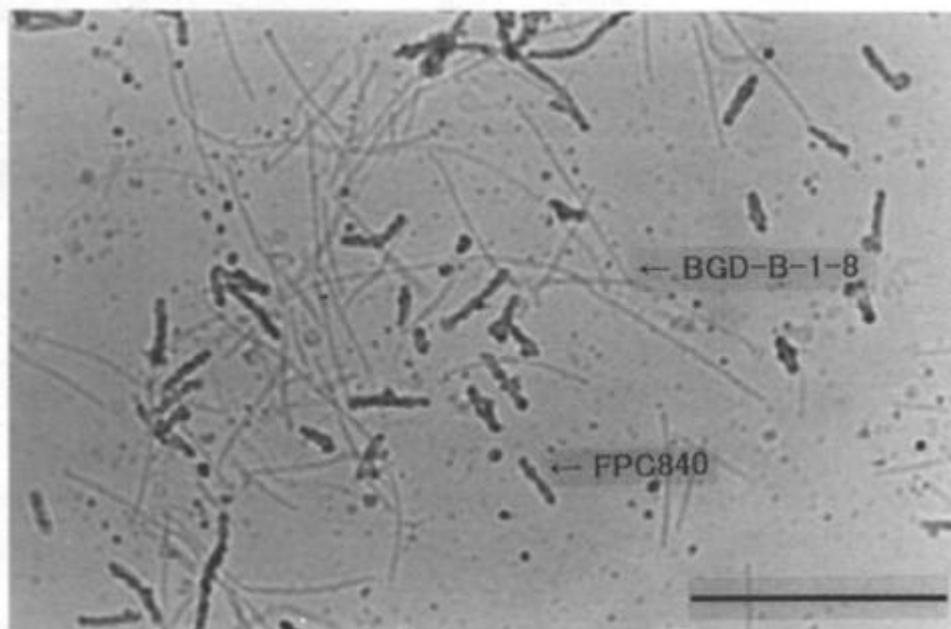


Fig.1 Light micrograph of Flavobacterium psychrophilum strain FPC840 positive for IIPT and Flavobacterium sp. strain BGD-B-1-8. Bar = 10 μ m.

法として有効であるとともに、病理組織学的手法による冷水病の感染機序の解明などに応用できるものと期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたり終始有益な御指導いただいたヤクルト中央研究所の大村浩氏に感謝いたします。また、貴重な保存菌株を分与頂きました東京大学の若林久嗣教授、山梨県水産技術センター忍野支所、和歌山県内水面漁業センターならびに抗血清を分与頂きました徳島県水産試験場に感謝します。

引用文献

- 1) 相川英明(1998):魚病研究,33,149-150.
- 2)Gudding ,R.,A.Lillehaug ,P.J. Midtlyng and F.Brown (1997):Fish Vaccinology,90,179-188.
- 3) Wakabayashi,H.,T.Toyama and T.Iida(1994):Fish Pathol.,29,101-104.
- 4) 許康俊・若林久嗣(1987):魚病研究,22,215-220.
- 5) 吉水守ら(1987):さけ・ますふ研報,41,121-127.
- 6)岐阜県(1998):第23回全国養鱒協議会魚病対策研究部会資料