



Title	蛍光標識アビジン・ビオチン抗体法のBKDキャリアー検索への応用について □FAT間接法との比較
Author(s)	吉水 時 紀 栄興 佐見 学 味村 喬久
Citation	魚病研究 □23□B□171□174
Issue Date	1988□9
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/38331">http://hdl.handle.net/2115/38331</a>
Type	article
File Information	yoshin izu□65□pdf



[Instructions for use](#)

## 蛍光標識アビジン・ビオチン抗体法の BKD キャリヤー 検索への応用について—FAT 間接法との比較

吉水 守<sup>\*1</sup>・紀 栄興<sup>\*2</sup>・佐見 学<sup>\*1</sup>・木村喬久<sup>\*1</sup>

(1988年2月22日受付)

### Comparison of FITC Conjugate Avidin-Biotin Complex (ABC) Method and Indirect FAT for the Detection Rate of *Renibacterium salmoninarum* Antigen in Carrier Fish in BKD

Mamoru YOSHIMIZU<sup>\*1</sup>, Rongxion Ji<sup>\*2</sup>, Manabu SAMI<sup>\*1</sup> and Takahisa KIMURA<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup>Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido  
University, Minato 3-1-1, Hakodate, 041 Japan

<sup>\*2</sup>Department of Aquaculture, Xiamen University of Fisheries,  
7 Tongan Road, Xiamen, Fujian, China

(Received February 22, 1988)

To increase the fluorescence intensity in the fluorescent antibody test (FAT), fluorescein labeled avidin-biotinylated antibody complex (ABC) was tested for the detection of *Renibacterium salmoninarum* antigen in the carrier fish of BKD. In comparison with indirect FAT, fluorescence intensity observed by ABC method was increased about 50% by multiscan fluorescent method using 96 well microtiter plate. The detection rate of *R. salmoninarum* antigens in kidney smears of masu salmon was also increased about 50% in comparison with indirect FAT.

The procedure of the ABC method is as follows: A tissue smear was incubated for 30 minutes with antibody against *R. salmoninarum*. After several washings with phosphate buffered saline, goat anti-rabbit IgG covalently linked to biotin was added and allowed to react for 30 minutes. The preparation was washed again and a solution containing fluorescein-labeled avidin was added and allowed to react for 30 minutes. After final rinsing, the smear is mounted in glycerol buffered to pH 9.0 and observed by fluorescence microscope.

### 緒 言

サケ科魚類の細菌性腎臓病 (BKD) はその原因菌 *Renibacterium salmoninarum* の分離培養が困難であり、適確な治療もないことからサケ科魚類の難病の一つに数えられている (木村, 1978)。本病の防疫対策としてはエリスロマイシンの親魚への投与、卵吸水時の用水への添加、稚魚への経口投与の3段階投薬法が推奨されているが (木村ら, 1986)、採卵親魚の *R. salmoninarum* 保有の有無あるいは卵の本病原因菌による汚染の有無を事前に検査し、垂直伝播を避ける方法が最も現実的と考える。しかし無症状のキャリアーとなった採卵親魚の腎臓ある

いは卵表面に存在する *R. salmoninarum* 菌量は少量であり、増菌培養による検査が困難である現在、*R. salmoninarum* キャリヤーの検索は血清学的手法に頼らざるを得ない。BKD のキャリアーの検索には FAT 法が最も適しており (PATERSON *et al.*, 1979, EVELYN *et al.*, 1981, YOSHIMIZU and KIMURA, 1985)、現在広く推奨されているが (BULLOCK and STUCKEY, 1975, BULLOCK *et al.*, 1980, LAIDLER, 1980)、母数無限大の集団の場合 95% 信頼の検査結果を得るためには 60 尾以上の検体を検査しなければならず (AMOS, 1985)、各検体 100 視野観察時の労力は並み大抵ではない。

本報では BKD キャリヤー検索のための FAT 法における観察時の労力軽減のため蛍光発色を強める目的で FITC 標識アビジン・ビオチン抗体 (ABC) 法の導入を試み、従来の FAT 間接法との比較を行い良好な成績が

<sup>\*1</sup> 北海道大学水産学部微生物学講座

<sup>\*2</sup> 厦門水産大学養殖系 (中国福建省厦門市同安路 7 号)

得られたので報告する。

### 実験材料と方法

#### 供試魚

北海道内の3孵化場のヤマベあるいはサクラマス (*Oncorhynchus masou*) 飼育群よりそれぞれ無作為に60尾を採取し腎臓の塗抹標本を作製した。なおA孵化場のBKD病魚の腎臓塗抹標本を陽性対照に用い、さらに供試血清の有効希釈倍率の測定にも供試した。

#### 供試菌株および抗血清

BKD原因菌として*R. salmoninarum* ATCC 33209を供試し、抗血清としては自家製の抗*R. salmoninarum* Otobe株家兎血清(OKD-3)を供試した。ビオチン化抗ウサギIgGヤギ血清、FITC標識アビジンDおよびFITC標識抗ウサギIgGヤギ血清はそれぞれ市販のもの(Vector Laboratory Inc., 協和メデックス)を用いた。

#### FAT間接法

FAT間接法は木村ら(1986)の方法によった。すなわち火炎固定した供試魚腎臓の塗抹標本に一次血清として抗*R. salmoninarum*ウサギ血清(1:100 v/v in PBS)を37°Cで30分間反応させ、PBSでよく洗浄後、2次血清としてFITC標識抗ウサギIgGヤギ血清(1:100 v/v in PBS)を加え37°Cで30分間反応させた。PBSでよく洗浄後緩衝グリセリン液(pH 8.5~9.0)でマウントし、蛍光顕微鏡で特異蛍光を発する*R. salmoninarum*抗原の有無を3分間観察および40倍の対物レンズを用いた100視野の観察法で行った。

#### ABC法

FAT間接法と同様1次血清として抗*R. salmoninarum*ウサギ血清(1:100)を反応させ、PBSで洗浄後、2次血清としてビオチン化抗ウサギIgGヤギ血清(1:100 v/v in 10 mm phosphate; pH 7.8, 0.15 M NaCl, 0.08% NaN<sub>3</sub>)を37°Cで30分間反応させた。PBSでよく洗浄後FITC標識アビジンD(1:100 in 50 mm So-

dium bicarbonate 0.15 M NaCl, 0.08% NaN<sub>3</sub>)を37°Cで30分間反応させ、PBSで洗浄後緩衝グリセリン液をマウントし同様に検鏡を行った。

#### 免疫蛍光法による蛍光発色度の比較

まず*R. salmoninarum*の加熱死菌懸濁液(McFARLAND No. 3 in PBS, pH 7.3)を作製し96 wellプレートに50  $\mu$ lずつ分注後、0.5% グルタルアルデヒド(in PBS)を各well 50  $\mu$ lずつ重層し、室温で15分間静置した後、真空オープン中で45~50°C, 90分間乾燥した。菌を固定した各wellにBS(FBS 5 ml, 0.1 M NaCl 95 ml, NaN<sub>3</sub> 0.1 g, 1 M MgCl<sub>2</sub> 0.1 ml)を50  $\mu$ lずつ分注し、37°Cで60分間反応させ、PBSで3回洗浄後、1次血清として抗*R. salmoninarum*ウサギ血清を50  $\mu$ lずつ加え、37°Cで60分間反応させた。PBSで洗浄後次にFAT間接法では2次血清としてFITC標識抗ウサギIgGヤギ血清を50  $\mu$ lずつ加え、37°Cで60分間反応させ、PBSで洗浄後pH 9.0の緩衝液(0.06 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.06 M NaHCO<sub>3</sub>)を50  $\mu$ lずつ添加し、マルチプレート分光光度計(コロナMTP-22)の蛍光付属装置(MTP-F)を用い蛍光発色度を測定した。

ABC法は2次血清にビオチン化抗ウサギIgGヤギ血清を用い、次いでFITC標識アビジンDを50  $\mu$ lずつ分注し、共に37°Cで60分間反応させPBSで3回洗浄後緩衝液を50  $\mu$ lずつ加え上法同様蛍光発色度を測定した。

### 結 果

#### ABC法とFAT間接法における蛍光発色度の比較

免疫蛍光法によるABC法とFAT間接法の蛍光発色度の比較を96 wellプレートを用いたマルチスキャン分光光度計を用いて測定した結果をTable 1に示した。2回実施した各8 wellの平均値はFAT間接法で0.61と0.66, ABC法で0.90と0.95であり、蛍光発色度の比率はFAT間接法を1とした場合ABC法は1.46であった。

Table 1. Comparison of indirect FAT and fluorescein labeled avidin-biotinylated antibody complex (ABC) method on fluorescence intensity

Test	Indirect FAT	ABC method
I	0.61*	0.90
II	0.66	0.95
Rate of ABC/IFAT method	1.00	1.46

\* Measured by microplate photometer (Corona, MTP-22), average number of 8 well.

**Table 2.** Detection of *R. salmoninarum* antigen in kidney smears of masu salmon collected from 3 salmonid hatcheries observed by indirect FAT and ABC method

Hatchery	Employed	Number of fish			
		Showed the positive result			
		Indirect FAT		ABC method	
		3 min	100 fields	3 min	100 fields
A	60	16	23	22	26
B	59	0	1	1	4
C	60	9	14	14	22
Total	179	25	38	37	52

### ABC法とFAT間接法による*R. salmoninarum*抗原検出率の比較

北海道内の3孵化場から供試魚各60尾を採取し腎臓塗抹標本を作製し、FAT間接法とABC法による*R. salmoninarum*抗原の検索を行った結果をTable 2に示した。

観察時間を3分間とした場合、A孵化場ではFAT間接法で16検体、ABC法では22検体が抗原検出陽性となり、B孵化場では前者では0、後者では1検体が陽性となった。さらにC孵化場ではFAT間接法で9検体が、ABC法では14検体が反応陽性となり、3孵化場を合計するとFAT間接法で25検体、ABC法で37検体が抗原検出陽性となり、FAT間接法に対するABC法の抗原検出率は1.48倍であった。

現在よく利用されている100視野観察法の結果ではA孵化場の場合FAT間接法で23検体、ABC法では26検体が反応陽性を示した。BおよびC孵化場ではそれぞれ前者で1および14検体、後者で4および22検体が*R. salmoninarum*抗原陽性となった。3孵化場を合計するとFAT間接法で38検体、ABC法で52検体が抗原検出陽性となり、FAT間接法に対するABC法の抗原検出率は1.39倍であった。尚、観察された菌体数は少なくこれらはいずれもキャリアーと判定された。

### 考 察

サケ科魚類の細菌性腎臓病(BKD)キャリアーの的確かつ迅速な診断を行うために、従来のFAT間接法の蛍光発色強度を高める目的でまずABC法の導入を試み、従来のFAT間接法と蛍光発色度を比較すると共に*R. salmoninarum*キャリアーを対象にした*R. salmoninarum*抗原の検出率を比較検討した。ABC法と従来のFAT間接法の発色度をマイクロタイタープレートを用いた免疫蛍光法で測定し比較したが、蛍光発色度は

ABC法で約1.5倍となりかなりの増強効果が得られた。ただしこの値は病魚の腎臓塗抹標本を用い、各供試抗血清の有効希釈倍率を求め、FAT間接法およびABC法ともに1次血清の濃度を100倍、FAT間接法の2次血清、ABC法のビオチン化抗ウサギIgGヤギ血清およびFITC標識アビジンDも100倍として使用した場合の値であり、ビオチン化抗ウサギIgGヤギ血清およびFITC標識アビジンDの濃度によっては多少の変動も予想される。

次に同濃度の血清を用いBKDの発生がみられる孵化場を含め、北海道内の3孵化場よりサクラマスあるいはヤマメ稚魚各60尾を採捕し、腎臓の塗抹標本を作製してABC法と従来のFAT間接法による*R. salmoninarum*の検出率を比較した。まず観察時間を3分間として*R. salmoninarum*抗原の検出率を比較したところFAT間接法で菌体が見いだせなかった1ヶ所を除き他は共にABC法での陽性検体数がFAT間接法の約1.5倍となり、先のマイクロタイタープレートを用いた蛍光発色度の増強倍率と近似した値が得られた。

従来40倍の対物レンズによる100視野観察法(菌体の確認は100倍の対物レンズ使用)が広く行われているが、この条件での観察結果を比較するとABC法での陽性検体数がFAT間接法の約1.4倍となり、3分間の観察法よりも両者における検出率の差が少なくなった。このことは蛍光発色度の増強が観察時間を区切った場合により強く反映されたものと考えられる。

しかしABC法では蛍光発色度が増加することにより、非特異蛍光も必然的に増加することが考えられ、さらに最近*R. salmoninarum*と共通抗原を持つ細菌の存在も報告され(AUSTIN *et al.*, 1985, 吉水ら, 1987)本法の導入に際しては使用する抗血清の反応特異性を前もって十分検討し確認しておく必要があると考える。

## 要 約

サケ科魚類の細菌性腎臓病 (BKD) 原因菌キャリアーの的確かつ迅速な診断への FITC 標識アビジン・ビオチン抗体 (ABC) 法の導入を検討し以下のような結論を得た。

1. 従来の FAT 間接法に比し蛍光発色度は ABC 法で約 1.5 倍となり、かなりの発色増強効果が得られた。

2. 飼育魚の腎臓塗抹標本を用いての ABC 法と従来の FAT 間接法による *R. salmoninarum* の検出率の比較では、観察時間を 3 分間とした場合 ABC 法で FAT 間接法の約 1.5 倍、また従来と同様 100 視野観察時の比較では ABC 法で従来法の約 1.4 倍となり、蛍光発色度の増強が観察時間を区切った場合の検出率により強く反映された。

3. ABC 法では蛍光発色度が増加することにより、非特異蛍光も必然的に増加することが予想される。本法の導入に際しては使用する抗血清の反応特異性を前もって十分検討し確認しておく必要がある。

## 文 献

- AMOS, K. H. (1985): Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens (Third Edition). Fish Health Section, American Fisheries Society, 114 p.
- AUSTIN, B., D. BUCKE, S. FEIST and J. RAYMENT (1985): A false positive reaction in the indirect fluorescent antibody test for *Renibacterium salmoninarum* with a "Coryneform" organism. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.*, **5**, 8-9.
- BULLOCK, G. L. and H. M. STUCKEY (1975): Fluorescent antibody identification and detection of the *Corynebacterium* causing kidney disease of salmonids. *J. Fish. Res. Board. Can.*, **32**, 2224-2227.
- BULLOCK, G. L., B. R. GRIFFIN and H. M. STUCKEY (1980): Detection of *Corynebacterium salmoninus* by direct fluorescent antibody test. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **37**, 719-721.
- EVELYN, T. P. T., J. E. KETCHESON and L. PROSPERIPORTA (1981): The bacterial kidney disease carrier. *Fish Pathology*, **15**, 293-300.
- 木村喬久 (1978): サケ科魚類の細菌性腎臓病. 魚病研究, **13**, 43-52.
- 木村喬久・吉水 守・原 武史 (1986): サケ科魚類の細菌性腎臓病 (BKD) の診断技法. 魚類防疫技術書シリーズ, 日本水産資源保護協会, 60 p.
- LAIDLER, L. A. (1980): Detection and identification of the bacterial kidney disease (BKD) organism by the indirect fluorescent antibody technique. *J. Fish. Disease*, **3**, 67-69.
- PATERSON, W. D., C. GALLANT, D. DESAUTELS, and L. MARSHALL (1979): Detection of bacterial kidney disease in wild salmonids in the Margaree River system, and adjacent waters using an indirect fluorescent antibody technique. *J. Fish. Res. Board. Can.*, **36**, 1464-1468.
- YOSHIMIZU, M. and T. KIMURA, (1985): A coagglutination test with antibody sensitized staphylococci for rapid and simple diagnosis of bacterial and viral disease of fish. *Fish Pathology*, **20**, 243-261.
- 吉水 守・紀 栄興・野村哲一・木村喬久 (1987): BKD 原因菌 *Renibacterium salmoninarum* ATCC 33209 と共通抗原を有する *Pseudomonas* 属細菌の存在について. さけ・ますふ研報, **41**, 121-127.