

培養細胞に接種した IHN ウイルスの 蛍光抗体法と酵素抗体法による検出

山本章造・西村定一*・佐野徳夫*

Detection of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Inoculated in Cultured
by Indirect Fluorescent Antibody Technique and Enzyme Antibody Technique

Syozo YAMAMOTO, Teiichi NISIMURA and Tokuo SAN0

IHN (伝染性造血器壊死症)は、ラブドウイルス科に属する RNA ウイルスの感染によって起こるサケ科魚類の病気である。この病気はニジマス *Salmo gairdnerii iridideus* やアマゴ *Oncorhynchus rhodurus* var. *macrostomus* などの養殖に大きな被害を及ぼしているにもかかわらず、ウイルス性疾病であることから適切な治療法は確立されていない。

IHN ウイルス (以下 IHNV という) に関しては多数の報告があり、PILCHER and FRYER¹⁾ が総説しているが、迅速診断及び血清学的同定に関しては蛍光抗体法 (以下、FA 法と略す) が応用されて成果を上げている²⁻⁴⁾。しかし、培養細胞や魚体中の IHNV が FA 法や酵素抗体法 (以下、EA 法と略す) によって検出される感度などについては、まだ十分に明らかにされているとは言えない。そこで、本研究は培養細胞を用いて一次抗体 (抗 IHNV 血清) の希釈倍数によって、FA 法と EA 法の検出感度を調べ、二、三の知見を得たので報告する。

材料と方法

接種に用いた IHNV は長野 HV-7601 GU 株を FHM 細胞で 4 継代したものである。

20℃で24時間、MEM5-Hepes でカバースリップに単層培養した CHSE214 細胞に、ウイルスを M. O. I. が 0.07~0.1 の範囲になるように接種した。接種後 1 時間よくテイルティングして細胞にウイルスを吸着させた後、MEM5-Hepes を追加し、15℃で15時間培養した。培養後 HANK's BSS で5分間3回洗浄し、冷風で十分に乾燥した。これを冷アセトン (4℃) で30分間固定後再び風乾し、FA 法及び EA 法の試料に供するまで 4℃

でデシケーター中に保存した。

固定した細胞を図 1, 2 に示した FA 法及び EA 法の手順に従って反応させ、観察に供した。固定から反応までは48時間以内を実施した。

FA 法は佐野²⁾が開発した2次反応に FITC 標識プロテイン A (FITC-Sp A) を作用させる間接蛍光抗体法を用い、EA 法では ABC-GO 法*を採用した。

ABC-GO 法で検出するにあたって、基質としてニトロブルー-テトラゾリウム (以下、NBT と略す) とテトラニトロブルー-テトラゾリウム (TNBT) を用い、培養細胞内の IHNV に対する発色性を比較した。1次抗体の希釈倍数80倍から 80×2³ 倍の範囲で両者の発色性を比較し、表 1 に従って示した。

次に IHNV に対する FA 法と ABC-GO 法の検出感

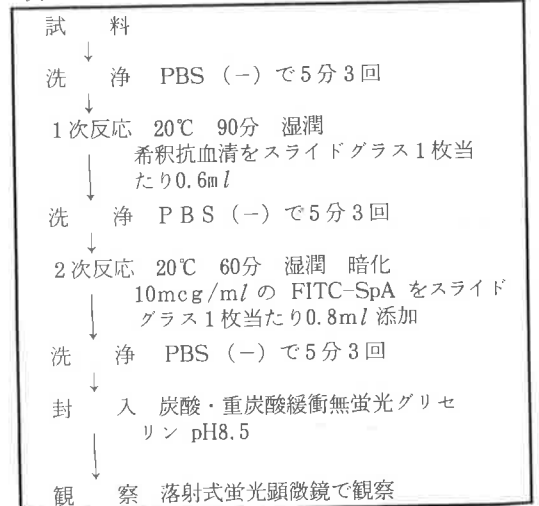


図 1 間接蛍光抗体法の手順

* 東京水産大学

* Vectastain ABC-GO キット, Vector 社製

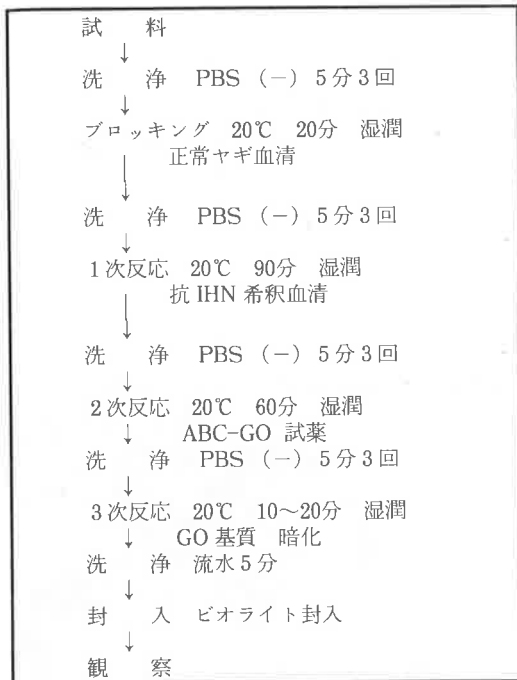


図2 酵素抗体法の手順

表1 FA法及びE A法による発色と識別性の表示

| | - | ± | + | ⦿ | ⦿⦿ |
|-----|----|------|-----|----|----|
| 発色性 | なし | 判断不可 | うすい | 普通 | 濃い |
| 識別性 | なし | 判断不可 | 可能 | 良好 | 明瞭 |

度を比べるために、1次抗体を80倍から80×2⁹倍までの範囲の2倍希釈段階を作製し、両者の方法で検出できる最高希釈倍数を求めた。

結果と考察

培養細胞内のIHNV感染細胞の識別性をABC-GO法のNBTとTNBTで比較した結果を表2に示した。

NBTを用いた場合には1次抗体の希釈倍数が80×2³倍まででは対照区の培養細胞が強い非特異染色を呈した。

表2 ABC-GO法における基質の比較

| 抗IHN血清 希釈倍数 | NBT | | | TNBT | | |
|-------------------|-----|-----|-----|------|-----|-----|
| | 発色 | | 識別性 | 発色 | | 識別性 |
| | 対照区 | 接種区 | | 対照区 | 接種区 | |
| 80 | ⦿ | ⦿ | ± | + | ⦿ | + |
| 80×2 | ⦿ | ⦿ | ± | + | ⦿ | + |
| 80×2 ² | + | ⦿ | + | ± | ⦿ | ⦿ |
| 80×2 ³ | + | ⦿ | + | ± | ⦿ | ⦿ |

その結果、ウイルス接種区における感染細胞と非感染細胞の染色性に若干の濃淡の差が認められたが、明瞭に区別することは困難であった。また、NBTの染色は赤紫色とされているが、むしろ黒に近い黒紫色を呈し、染色が濃い細胞質には多数の顆粒性の沈着物を生じた。これらの顆粒は1次抗体及びビオチン化2次抗体の濃度が濃いほど増加し、対照区の細胞質にも存在することから、非特異染色によるものが多いと考えられた。

一方、TNBTでは1次抗体が80倍から80×2倍までの希釈範囲では対照区の細胞が濃く染色されるために、ウイルス接種区の感染細胞と非感染細胞を明瞭に区別することは難しかった。しかし、1次抗体を80×2²倍に希釈すると対照区の非感染細胞の染色性が弱くなり、感染細胞との区別が可能になった。また80×2³倍に希釈すると識別性がより良好になったことから、さらに高い希釈倍数で識別性を検討する必要があると考えられた。TNBTは黒色とされているが、感染細胞の細胞質は黒に近い紫青色に染色された。

以上の結果、ABC-GO法では1次抗体の希釈が80×2³倍までの範囲ではIHNVに対してNBTよりもTNBTの方が識別性が良好と考えられ、以後の観察にはすべてTNBTを使用した。

次にIHNVに対するFA法及びABC-GO法の検出感度を1次抗体の希釈倍数を基準にして比較した結果を表3に示した。

FA法では1次抗体の希釈倍数を80倍から80×2⁸倍で検討した。陰性対照区ではいずれの希釈倍数でも非特異蛍光を発しなかったが、ウイルス接種区では80倍から80×2⁵倍の範囲で感染細胞に特異蛍光を発し、ウイルスの存在が確認された。その特異蛍光は1次抗体の希釈倍数が増加するにつれて弱くなったことから、ウイルスの存在を明瞭に確認できる最大希釈倍数は80×2⁵であ

表3 IHNV検出感度のFA法とABC-GO法の比較

| 抗IHNV血清 希釈倍数 | FA法 | | | ABC-GO法 | | |
|-------------------|-----|-----|-----|---------|-----|-----|
| | 発色 | | 識別性 | 発色 | | 識別性 |
| | 対照区 | 接種区 | | 対照区 | 接種区 | |
| 80 | - | ⦿ | ⦿ | ⦿ | ⦿ | + |
| 80×2 | - | ⦿ | ⦿ | ⦿ | ⦿ | + |
| 80×2 ² | - | ⦿ | ⦿ | + | ⦿ | ⦿ |
| 80×2 ³ | - | + | + | + | ⦿ | ⦿ |
| 80×2 ⁴ | - | + | + | ± | ⦿ | ⦿ |
| 80×2 ⁵ | - | + | + | - | ⦿ | ⦿ |
| 80×2 ⁶ | - | ± | ± | - | ⦿ | ⦿ |
| 80×2 ⁷ | - | - | - | - | + | + |
| 80×2 ⁸ | - | - | - | - | + | + |
| 80×2 ⁹ | - | - | - | - | ± | ± |

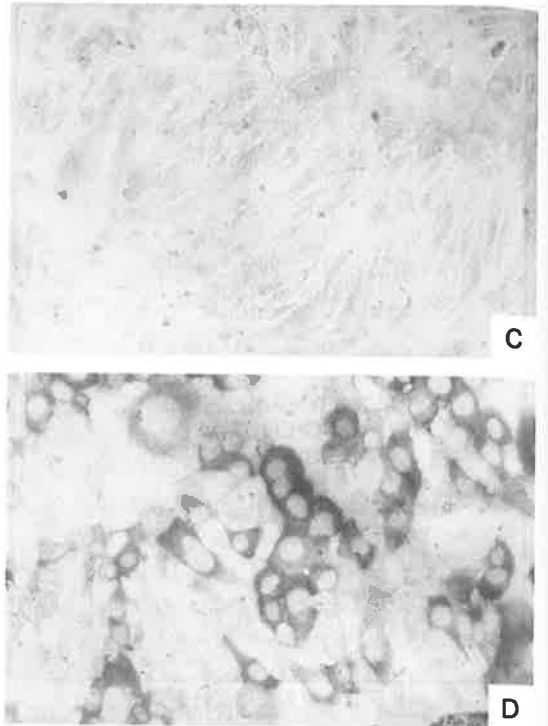
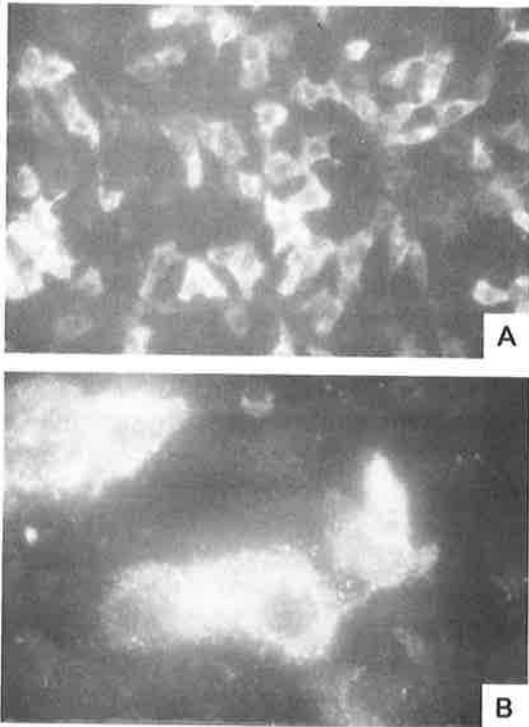


図3 CHSE細胞におけるIHNVのFA法及びABC-GO法による発色像

- A IHNV接種15時間後における感染細胞の特異蛍光
- B 同特異蛍光
- C ウイルスを接種していないCHSE細胞
- D 接種15時間後における感染細胞の特異染色
- E 同特異染色



った。

一方、ABC-GO法では1次抗体の希釈倍数が 80×2^3 倍以下で対照区の培養細胞に紫青色の非特異染色が現れたが、この非特異染色は希釈倍数が増加するにつれて淡くなり、 80×2^4 倍以上になると消失した。ウイルス接種区では希釈倍数が80倍から 80×2^5 倍までの範囲で感染細胞が紫青色を呈し、その染色性は希釈倍数が増加するにつれて弱くなり、最大希釈倍数は 80×2^8 倍であった。しかし、1次抗体の希釈が少ないと非特異染色が強いために感染細胞と非感染細胞の識別性が低くなった。その結果、識別性はそれらのコントラストが高い希釈倍数 80×2^3 から 80×2^5 倍の範囲で良好であった。

なお、1次抗体を反応させていない細胞にABC-GO染色をしても、いずれの細胞も全く染色されないことから、非感染細胞における紫青色の非特異染色は1次抗体に使用した抗IHNV血清に由来すると考えられた。

以上の結果、培養細胞に感染したIHNVを検出できる1次抗体の最大希釈倍数は、ABC-GO法では 80×2^8 倍、FA法は 80×2^5 倍で前者の検出感度が約10倍高かった。また、IHNVに感染した細胞を明瞭に識別できる希釈倍数はABC-GO法では 80×2^3 倍から 80×2^5 倍の範囲、FA法では80倍以下から 80×2 倍の範囲であった。

ABC-GO法は、FA法よりも感度が高いことから、

感染細胞や魚体組織内の IHNV をより早期にしかも詳細に検出できる利点がある。従って、IHNV の魚体への進入門戸や魚体内での伝播及び増殖過程などを調べることも可能で、それによって感染や発病機構を明らかにすることができると思われる。しかし、ABC-GO 法は検出感度が高く低希釈の一次抗体では非特異染色が強いため、本法を応用するに当たっては、1次抗体に使用する抗 IHNV 血清の吸収操作などによって非特異染色をとり除く必要があると考えられた。

要 約

1. 培養細胞に接種した IHNV の FA 法と EA 法による検出感度を調べた。
2. IHNV 感染細胞の識別性に対し、EA 法の一つである。ABC-GO 法の基質を検討した結果、1次抗体の希釈倍数が 80×2^3 倍まででは TNBT が良好であった。
3. IHNV 感染細胞のウイルスを検出できる1次抗体

の最大希釈倍数は、ABC-GO 法が 80×2^8 倍、FA 法が 80×2^5 倍であり、前者が約10倍高かった。

4. 低希釈の1次抗体を用いると、ABC-GO 法は FA 法よりも非特異染色が強いため、抗血清の吸収操作などをさらに検討する必要があることを指摘した。

文 献

- 1) K. S. PILCHER and J. L. FRYER . 1980 : CRC Critical Reviews in Microbiology, 7, 287-364.
- 2) 佐野徳夫・西村定一, 1982 : 魚類ウイルス病の迅速診断法の開発に関する研究—間接法による IHNV の蛍光抗体法, 昭和56年度魚病対策技術開発研究成果報告書, pp.15
- 3) —・—, 1983 : —— IHNV 病魚の臓器塗抹標本に対する間接蛍光抗体法, 昭和57年度魚病対策技術開発研究成果報告書, pp.18
- 4) 西村定一, 1980 : サケ, マスのウイルス性疾患・診断の迅速化について, 魚病研究, 14, 191-197