

学 位 論 文 題 名

Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay
(ELISA) system to detect specific antibodies against
infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)

（サケ科魚類の伝染性造血器壊死症ウイルスに対する
抗体検出 ELISA 法の確立とその応用に関する研究）

学位論文内容の要旨

伝染性造血器壊死症 (infectious hematopoietic necrosis: IHN) は、世界各地の孵化場や養殖場で甚大な被害をもたらすサケ科魚類のウイルス感染症である。IHN は、もともと北米西海岸のベニザケおよびマスノスケの風土病であったが、IHN ウイルス (IHNV) 汚染卵の移植によりその発生が世界各地へ広がり、現在ではニジマス養殖で大きな問題となっている。日本では、1970 年代に北米から輸入した汚染卵が原因で本症が発生した。その後、IHN は日本各地へ伝播し、全国で IHN が流行するようになった。IHN 対策として、卵消毒、飼育施設の消毒、飼育水の殺菌、隔離飼育等の防除対策が実施され、稚魚期での IHN 発生はほとんど認められなくなった。しかし、近年になり、成魚サイズのニジマスも IHN により死亡するようになり、隔離施設で IHNV フリーの稚魚を生産しても、池出し後に養殖池で IHNV に感染し死に至ることから、新たな問題となっている。このような状況下において、同一水系に位置する養殖場での IHNV 感染履歴および感染状況の正確な把握が防疫対策を考える上で重要な課題となっている。

IHNV の検出法として、魚類株化細胞を用いた分離培養法、IHNV に対する抗血清を用いた蛍光抗体法 (IFAT) および抗原検出 ELISA、ウイルスゲノムを標的とした RT-PCR などが開発されてきたが、いずれも直接検出法であることから、検査対象魚を殺処分しなければならず、感染履歴の把握には不向きであり、また不顕性感染魚 (キャリアー) からの IHNV 検出には検出感度が不十分である。一方、魚を殺すことなく検査する方法として、血液を

用いた間接検出法があり、供試魚血清を用いた IHNV の間接検出法としては、中和試験が実施されているが、本法は多大な労力と検査結果を得るまでに長時間を要すること、また検出感度の点でも十分とはいえない。これに対し、抗体検出 ELISA 法は、安価で短時間に多量の検体を処理できることから、ヒトをはじめ温血動物では感染歴の把握を目的とした一次スクリーニング法として広く普及している。魚類においても抗体検出 ELISA 法が古くから検討されてきたが、検査結果（ELISA 吸光値）の再現性が低いため、ほとんど普及していない現状にある。

そこで、本研究では従来用いられてきた魚類の抗体検出 ELISA 法の問題点について再検討し、特異抗体のみを検出する ELISA 法を確立するとともに、抗体検出 ELISA 法による養殖魚の感染履歴および感染状況の把握が可能かどうか検証した。

まず第 1 章では、魚類での抗体検出 ELISA における再現性の低さの原因と対策について検討した。抗原未固定の ELISA プレートに各種ブロッキング剤；スキムミルク、FBS、豆乳、BSA、ゼラチンおよび Blocking reagent[®] で処理し、ニジマス、サクラマス、ヒラメおよびコイ血清を反応させたところ、何れも強い発色反応（ELISA 吸光値 0.3-1.0）が認められた。一方、魚類血清をスキムミルクで処理すると、ほとんど発色が認められなくなったことから、魚類 IgM が ELISA プレート上のブロッキング剤と非特異的に吸着していることが明らかになった。また、BSA を固定した ELISA プレートに、スキムミルクで前処理した抗 BSA コイ血清を反応させたところ、抗原量あるいは抗体量に依存した発色が認められたことから、スキムミルク処理により血清中 IgM の抗原抗体反応が阻害されないことが示された。これらの結果から、魚類血清をスキムミルクで前処理することにより、魚類 IgM の非特異的反応が大幅に軽減され、魚類血清中の特異抗体のみを定量的に検出することが可能であることが示された。

第 2 章では、前章で明らかになったスキムミルク処理したニジマス血清を用いて IHNV に対する抗体検出 ELISA 法について検討した。まず、IHNV を抗原として固定した ELISA プレートを用い、IHN 発症歴有（IHN 有歴）および無（IHN 無歴）ニジマス血清からの IHNV に対する抗体の検出を行った。その結果、IHN 有歴血清の ELISA 吸光値は 0.26-1.03 であったのに対し、IHN 無歴血清の ELISA 吸光値は 0.04-0.64 であり、IHN 有歴血清の吸光値は無歴血清に比べ相対的に高い値を示した。しかしながら、IHN 無歴血清であるにもかかわらず

わらず、IHNV 抗原に対し高い ELISA 吸光値を示す検体が多数認められ、本 ELISA 条件では IHNV に対する特異抗体のみを検出しているとは考え難い結果となった。そこで、この原因について検討するために、IHNV と同属のノビラブドウイルス属に属する魚類病原ウイルスであるが、IHNV とは血清学的に異なるウイルスである VHSV および HIRRV を抗原とした ELISA も行い、各々の吸光値の変化を調べた。その結果、IHN 有歴血清の VHSV あるいは HIRRV 抗原に対する ELISA 吸光値は、IHNV 抗原に対する値に比べ明らかに低かったが、IHN 無歴血清では、VHSV、HIRRV および IHNV 抗原に対する ELISA 吸光値に差異はほとんど認められなかった。特に、IHNV 抗原に対し高い ELISA 吸光値を示した IHN 歴無血清でも、VHSV あるいは HIRRV 抗原に対し、ほぼ同程度の吸光値が認められた。本試験結果は、ニジマス血清がウイルス培養液中に存在する IHNV 以外の夾雑抗原と反応していることを示唆するものであり、IHNV を抗原とした吸光値から VHSV あるいは HIRRV 抗原に対する吸光値を差し引いた値が、IHNV 抗原と特異的に反応した抗体の吸光値を示していると考えられた。本仮説に基づき、IHNV および VHSV 抗原を用いた ELISA 法により、IHN 有歴および無歴ニジマス全 206 尾の血清について検討したところ、有歴血清の吸光値は 0-0.7 (平均 0.27) であったのに対し、無歴血清は何れも 0.1 以下 (平均 0.01) となり、本改良 ELISA 法により IHNV 感染履歴を把握できることが示された。

そこで、第 3 章では、第 1 章および 2 章で確立した ELISA 法を用い、静岡県下で IHN 発症歴を有する 8 養魚場と IHN 発症歴の無い 3 養魚場、さらに発症歴不明の 1 養魚場で飼育中のニジマス全 552 尾を対象に、IHNV に対する抗体保有状況の調査を実施した。その結果、有歴血清の吸光値は 0-1.2 (平均 0.20) であったのに対し、無歴血清の吸光値は全て 0.2 以下 (平均 0.02) となり、本 ELISA 法により感染履歴の有無の推定が可能であることが確認された。さらに、ELISA 吸光値 0.2 以上の検体が存在した場合には IHN 発症歴有り、全て 0.1 以下であった場合には発症歴無しと判断して差し支えないと考えられた。実験に供した IHN 発症歴不明血清では、ほとんどの血清の ELISA 吸光値 0.20 が以下であったが、127 検体中 6 検体 (4.7%) の血清が、ELISA 吸光値 0.2 以上であったことから、これらの魚はすでに IHNV に感染していた可能性が高いと考えられた。以上の結果から、本 ELISA 法により、抗 IHNV 特異抗体が検出可能であること、また飼育群の IHNV 感染履歴の把握が可能であることが示された。

これまで、魚類の抗体検出 ELISA 法は検査結果の再現性が低いことから、検査・診断法として普及しなかったが、本研究により魚類でも特異抗体の検出が可能になり、ヒトや家畜と同様、血清疫学が可能になると考える。すなわち、本 ELISA により養殖場ごとの IHNV 感染履歴や水系ごとの感染状況の把握、さらに種苗の移動による感染の拡大や防疫対策を実施した場合の感染縮小等が把握できるようになり、より確実な防除対策が実施できると考える。また、池出し後の IHN 対策として歩留まり確保を目的にワクチンの開発が進められているが、ワクチンの評価やワクチン普及時の効果判定に本法は不可欠なツールであると考ええる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 水 守
副 査 教 授 梶 山 雅 秀
副 査 准教授 西 澤 豊 彦
副 査 助 教 笠 井 久 会

学 位 論 文 題 名

Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system to detect specific antibodies against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)

(サケ科魚類の伝染性造血器壊死症ウイルスに対する
抗体検出 ELISA 法の確立とその応用に関する研究)

サケ科魚類の伝染性造血器壊死症 (infectious hematopoietic necrosis: IHN) は、世界各地の孵化場や養殖場で甚大な被害をもたらすウイルス病である。IHN 対策として、飼育施設の消毒、飼育水の殺菌、卵消毒、IHNV に感受性を有する期間の隔離飼育が実施され、稚魚期での IHN 発生はほとんど認められなくなった。しかし、近年、成魚サイズのニジマスが IHN により死亡するようになり、同一水系に位置する養殖場での IHNV 感染履歴および感染状況の正確な把握が防疫対策を考える上で重要な課題となっている。抗体検出 ELISA 法は、特異抗体を検出する方法であり、安価で短時間に多数の検体を処理できることから、ヒトをはじめ温血動物では感染歴の把握を目的とした一次スクリーニング法として広く普及している。魚類においても抗体検出 ELISA 法が古くから検討されてきたが、検査結果 (ELISA 吸光値) の再現性が得られないことがあり、この改善が課題となっている。そこで本研究では、従来用いられてきた魚類の抗体検出 ELISA 法の問題点について再検討し、IHNV に対する特異抗体のみを検出する ELISA 法を確立するとともに、抗体検出 ELISA 法による養殖魚の IHNV 感染履歴および感染状況の把握が可能かどうか検証した。

まず、魚類抗体検出 ELISA における再現性の低さの原因と対策について検討した。抗原未固定の ELISA プレートを各種ブロッキング剤 (スキムミルク、FBS、豆乳、BSA、ゼラチンおよび Blocking reagent[®]) で処理し、ニジマス、サクラマス、ヒラメおよびコイ血清を反応させたところ、何れも強い発色反応 (ELISA 吸光値 0.3-1.0) が認められた。一方、魚

類血清をスキムミルクで処理すると、ほとんど発色が認められなくなったことから、魚類 IgM が ELISA プレート上のブロッキング剤と非特異的に吸着していることが明らかになった。また、BSA を固定した ELISA プレートに、スキムミルクで前処理した抗 BSA コイ血清を反応させたところ、抗原量あるいは抗体量に依存した発色が認められたことから、スキムミルク処理により血清中 IgM の抗原抗体反応が阻害されないことが示された。これらの結果から、魚類血清をスキムミルクで前処理することにより、魚類血清中の特異抗体の検出が可能であることが示された。

次いで、スキムミルクで前処理したニジマス血清を用い、IHNV に対する抗体検出 ELISA 法について検討した。IHNV 抗原に対し、IHNV 感染履歴を有するニジマス血清 (有歴血清) の ELISA 吸光値は 0.26-1.03 であったのに対し、IHN 無歴血清の ELISA 吸光値は 0.04-0.64 であり、IHN 無歴血清にもかかわらず、IHNV 抗原に対し高い ELISA 吸光値を示す検体が多数認められ、本 ELISA 条件では IHNV に対する特異抗体のみを検出しているとは考え難い結果となった。そこで、この原因について検討するために、IHNV と同属で、血清学的には IHNV と異なる VHSV および HIRRV を抗原とした ELISA を行い、各々の吸光値を比較した。その結果、IHN 有歴血清の VHSV あるいは HIRRV 抗原に対する ELISA 吸光値は、IHNV 抗原に対する値に比べ明らかに低かったが、IHN 無歴血清では、VHSV、HIRRV および IHNV 抗原に対する ELISA 吸光値に差異はほとんど認められず、VHSV あるいは HIRRV を抗原とした場合の吸光値は、IHNV 以外の夾雑抗原との反応であると考えられた。したがって IHNV を抗原とした吸光値から VHSV あるいは HIRRV 抗原に対する吸光値を差し引いた値が、IHNV 抗原と特異的に反応した抗体の吸光値を示していると考えられた。本仮説に基づき、IHNV および VHSV 抗原を用いた ELISA 法により、IHN 有歴および無歴ニジマス全 206 尾の血清について検討したところ、有歴血清の吸光値は 0-0.7 (平均 0.27) であったのに対し、無歴血清は何れも 0.1 以下 (平均 0.01) となり、IHN 発症歴の有無で ELISA 吸光値に明らかな差が認められた。

そこで、本改良 ELISA 法により、静岡県下で IHN 発症歴を有する 8 養魚場と発症歴の無い 3 養魚場、さらに発症歴不明の 1 養魚場で飼育中のニジマス全 552 尾を対象に、IHNV に対する抗体保有状況の調査を実施した。その結果、有歴血清の吸光値は 0-1.2 (平均 0.20) であったのに対し、無歴血清の吸光値は全て 0.2 以下 (平均 0.02) となり、本 ELISA 法により感染履歴の有無の推定が可能であることが確認された。さらに、ELISA 吸光値 0.2 以上の検体が存在した場合には IHNV 感染履歴があると判断して差し支えないと考えられた。IHN 発症歴不明血清では、ほとんどの血清の ELISA 吸光値 0.20 が以下であったが、127 検体中 6 検体 (4.7%) の血清が、ELISA 吸光値 0.2 以上であったことから、これらの魚はすでに IHNV に感染していた可能性が高いと考えられた。以上の結果から、本 ELISA 法により、抗 IHNV 特異抗体が検出可能であること、また飼育群の IHNV 感染履歴の把握が

可能であることが示された。

これまで、魚類の抗体検出 ELISA 法は検査結果の再現性が低いことから、検査・診断法として普及しなかったが、本研究により魚類でも特異抗体の検出が可能になり、ヒトや家畜と同様、血清疫学が可能になると考える。