サケ・マスのウイルス性疾病・診断の迅速化について

西 村 定 一*

Rapid Diagnosis on Viral Diseases of Salmonids

Teiichi NISHIMURA*

Dept. of Aquacul., Tokyo Univ. of Fish., Konan, Minato-ku, Tokyo, Japan

Virus isolation and neutralization test are too time consuming for diagnosis on fish viral diseases. Minimum mortality and prevention from following transmission are brought by proper and timely countermeasures. Therefore more rapid diagnosis of the viral diseases is desired strongly.

Several procedures developed in medicine for more rapid diagnosis are introduced here and some of them applied to the fish viral diseases are reviewed. Most rapid diagnosis was performed using direct fluorescent antibody technique of stamp smear preparation of IPN infected trout tissues. Enzyme antibody technique is hopeful having many advantages against fluorescent antibody technique. Further studies will be necessary to applicate some hopeful and available methods to the fish viral diseases.

現在、サケ・マス類のウイルス性疾病の診断およびウイルスの同定には培養細胞を用いるウイルス分離・中和試験法が用いられている。このため、ウイルスの同定には7～14日間以上を必要としている。IPNV, IHNVについては中和反応を用いなくてもCPE像から3～7日後におおよその見当をつけうるが、血清学的同定を同時に行なえる簡便、迅速な診断同定法が必要である。

医学方面では種々の迅速診断法が開発されている。その中のあるものはサケ・マス類のウイルス病へ既に応用されている。ここでは医学方面で新しく開発されつつある迅速診断法の魚類ウイルス病への応用について考察するとともに、既に応用が試みられた方法について総述し、魚類ウイルス病のより迅速、簡便な診断方法の開発の一助としたい。

ウイルス病の診断とウイルスの検出あるいは抗体の検出の迅速化に医学方面では次のような方法が用いられている。それは1) 蛍光抗体法、2) 酵素抗体法、3) 迅速免疫電顕法、4) 免疫拡散法、5) ラジオイムノアッセイ法、6) 逆受身血球凝集反応、7) 対向免疫電気泳動法などであり、前2者はサケ・マスのウイルス病診断への応用例が報告されている。

1. 蛍光抗体法 (FAT)

抗血清の免疫グロブリンに蛍光色素を標識し、抗原と抗原抗体反応をおこさせた後、蛍光顕微鏡で蛍光色素を発光させてその存在場所から抗原の位置を知ろうとするのが蛍光抗体法である。1950年頃から発達し、現在では広く用いられている。感度、特異性および迅速性の点ですぐれており、その染色方法には直接法、間接法、補体法などがある。

魚類ウイルス病ではこの蛍光抗体法の応用例が多く、IPN, IHN, VHSで報告されている。それらの例をまとめると、表1になる。

IPNへの応用 JØRGENSEN (1974) と Underwood *et al.* (1977) は間接法、他は直接法を用いている。IPNVと他ウイルスとの交差の問題、即ち特異性については UNDERWOOD *et al.* (1977) と YAMAZAKI *et al.* (1979) で交差が認められた。既に前者では Tellina V との間に、後者では Eel virus of Europe, EVE (SANO *et al.* 投稿中) との間に交差が認められた。EVE との間の交差はごく弱いものであったものの、EVE はニジマスに病原性はないが感染性を持つという性状から、FAT による診断に問題が生じる可能性がある。しかし、陽性対照をおくことにより実用上は問題はないであろう。Tellina V のニジマスへの病原性などについては不明で

* 東京水産大学水産養殖学科

表 1. サケ・マス類のウイルス性疾患とそのウイルスへの蛍光抗体法 (1-10) と 酵素抗体法 (11) の報告例

報 告 者	年	染色 方法	標本, 細胞	抗血清用抗原	感染後の時間	特異蛍光, 反応の有無
1. JØRGENSEN	1972	直接	RTG-2	IPNV _{Sp}	24-48 (15°C)	IPNV _{Sp} , IPNV _{Ab} , VHSV, AIDV, IHNV + - - - -
		直接	FHM	VHSV _{F1}		VHSV _{78isolates} , IPNV _{Sp} , IPNV _{Ab} , AIDV, IHNV + - - - -
2. JØRGENSEN <i>et al.</i>	1972	直接	RTG-2	VHSV	8 (10TCID/cell) 16 (1TCID/cell) (15°C)	VHSV +
		直接	感染魚の凍結切片	VHSV		
3. PIPER <i>et al.</i>	1973	直接	RTG-2, AS	IPNV _{Dm}	4-5 (20°C)	IPNV _{Dm} , IPNV _{BHN} , IPNV _{VR200} + +(<homo) -
4. TU <i>et al.</i>	1974	直接	RTG-2	IPNV _{VR200}	6 (MOI: 0.01PFU/cell) 24 (MOI: low) (20°C)	IPNV _{VR200} , IHNV, REOV + - -
5. JØRGENSEN	1974	間接	RTG-2, FHM	IPNV _{Sp} , IPNV _{Ab}	24-48 (15°C)	互いに交差がある (homo > hetero)
				VHSV _{F1}		VHSV, IPNV _{Sp} , IPNV _{Ab} + - -
6. McALLISTER <i>et al.</i>	1974	間接	CHSE-214	IHNV	2 (18°C)	IHNV +
7. MEIER <i>et al.</i>	1975	間接	FHM (寒天重層)	VHSV _{F1}	24-48 (15°C)	ウイルス分離法と同様の感度を持つ
8. UNDERWOOD <i>et al.</i>	1977	間接	RTG-2	IPNV _{Sp} , TellinaV	24 (15°C)	互いに交差がある
9. 渡辺ら	1978	間接	RTG-2, YNK	IHNV		IHNV, IPNV + -
10. 山崎ら	1979	直接	RTG-2	IPNV _{Buhl} , EVE	8 (20°C)	IPNV _{7serotypes} , EVE, IHNV, EVEX, EVA + ± - - -
		直接	感染魚のスタンプ標本			IPNV +
11. NICHOLSON <i>et al.</i>	1978	直接	AS	IPNV _{Dm}	6-8 (20°C)	IPNV _{Dm} , IPNV _{VR200} , IPNV _{BHN} , IHNV + + + -
		間接	AS	IPNV _{Dm}		IPNV _{on} , IPNV _{VR200} , IPNV _{BHN} + + +

ある。同一ウイルスの血清タイプの区別については JØRGENSEN (1972) では可能であつたが他の例では必ずしも可能ではない。

IHN への応用 McALLISTER *et al.* (1974) と渡辺ら (1978) の報告があり、前者は間接法により 18°C 培養でウイルス接種 2 時間後からウイルス抗原を検出し、6 時間後には細胞は蛍光物質で充満したと報告した。他ウイルスとの交差に関する実験は行われていない。後者は間接法を用いて抗血清のニジマス生体内通過と異種細胞での染色により非特異的抗体成分を取り除き、IHN の検出に成功した。

VHS への応用 4 報告があり、JØRGENSEN (1972) と JØRGENSEN *et al.* (1972) は直接法、他は間接法を用いている。他のウイルスと交差を示す例はない。JØRGENSEN (1972) は中和反応で差が認められた VHSV の分離株を FAT で区別することはできなかったと報告した。

実際の診断にあたっては特異性ととともに迅速性と感度が重要である。迅速性の点では著者を含めた YAMAZAKI *et al.* (1979) が最も短時間であり、病魚入手後 3 時間で診断が可能であった。しかし、感度に関する検討、即ちごく少量の抗原の場合、この方法で充分かどうかについての検討がなされていない。JØRGENSEN *et al.* (1972) の凍結切片法もかなり迅速な方法と考えられる。彼らは VHS の急性型では十分な感度を有するが、慢性型の場合はこの方法だけでは診断法として不充分であると報告している。同じウイルスで MEIER *et al.* (1975) は結果が得られるのが 24 あるいは 48 時間後と多少迅速性は劣るが、ウイルス分離法と感度が等しく、しかも半分の時間で診断可能な方法を発表している。

染色法について 直接法の方が反応に関与する因子が少なく、非特異反応の介入がより少ないと考えられ、出来れば直接で行なうのが良い (川村明義, 1976) とされている。しかし、間接法では抗血清さえ用意できれば、抗原ごとに蛍光色素を標識する必要がなく、市販の抗家兎 IgG 標識血清を利用できる。さらに、間接法の感度は直接法に比べ、10 倍高い利点もあるので、間接法をすすめていく方がよいであろう。これは後述の酵素抗体法についても同様である。間接法の感度の良さについては MEIER *et al.* (1975) も直接法より高感度であることをウイルス分離法との関連から推察している。

FAT で重要なことは浜島 (1971) も述べているように、蛍光の特異性の確認と非特異蛍光の除去である。前者は特異性の高い抗血清を用い、かつ充分な対照をおく

ことにより確認できる。後者は、(1) 高希釈で使用可能で特異性の高い抗血清の作製、(2) 臓器あるいは細胞粉末などでの吸収、(3) 免疫用抗原作製細胞と FAT 染色細胞種を変えること、などにより少なくすることができる。

(1) のためには抗原の濃縮、精製が基本的な必須の手段と考えられる。PIPER *et al.* (1973), JØRGENSEN (1974) および NICHOLSON *et al.* (1978) ではいずれも IPNV を濃縮、精製を何ら行なっていないが、他の研究者は種々の濃縮、精製法を用いている。JØRGENSEN (1972), JØRGENSEN *et al.* (1972) および JØRGENSEN (1974) では高速遠心 (30,000 G, 60 分, 2°C) により VHSV を濃縮している。Tu *et al.* (1974) は水性二相分配法あるいは密度平衡遠心法を用い、McALLISTER *et al.* (1974) では超遠心法 (55,000 G, 60 分) により濃縮している。YAMAZAKI *et al.* (1979) はポリエチレン・グリコール・NaCl 法により IPNV を 10 倍に濃縮したのち、15,000 rpm, 2 時間の高速遠心により 100 倍に濃縮している。この濃縮法は超遠心機を用いずに 100 倍濃縮が可能な、比較的簡便な方法である。かつ、ポリエチレン・グリコール・NaCl 法の反復処理による 100 倍濃縮よりもその精製度が高い (西村ら 1979)。

(2) の吸収についても種々な方法が試みられている。JØRGENSEN (1972), JØRGENSEN *et al.* (1972) ではマスの筋肉、腎、脾、肝の磨碎液による吸収を行ない、Tu *et al.* (1974) と YAMAZAKI *et al.* (1979) では RTG-2 細胞による吸収を行なっている。渡辺ら (1978) はニジマス生体内通過と RTG-2 細胞により吸収を行なっている。注目すべきは PIPER *et al.* (1973) と NICHOLSON *et al.* (1978) の細胞単層による吸収法である。彼らが精製していない抗原により作製した抗血清を用いて FAT と酵素抗体法に成功している理由はこの吸収法にあるかもしれない。それは通常の臓器あるいは細胞の粉末で行なう方法より簡単なので、試みる価値がある。

(3) は渡辺ら (1978) も試みている。また、現在著者らの研究室では、IHN の抗血清をつくるにあたって、抗原を FHM 細胞で調製して抗血清を作製している。染色時には RTG-2 細胞あるいは魚体スタンプ標本を用いて行ない、非特異蛍光をより減らすことを目指している。

2. 酵素抗体法 (EAT)

蛍光抗体法にヒントを得て、蛍光色素のかわりに酵素を抗体に標識し、抗原と結合した標識抗体の位置を酵素を発色させて知ろうとする方法で NAKANE *et al.* によ

り 1966 年発表され、以来、改良を加えられつつ発達してきた。蛍光抗体法に比べれば、その歴史は浅いが、蛍光顕微鏡を必要とせず、通常の光学顕微鏡で観察可能であり、標本は半永久的に保存が可能である。また、電子顕微鏡レベルでも観察可能であるという非常に有利な特徴を有する、さらに通常の光顕で観察可能なので周囲の組織構造と抗原の関係をより明らかにできる。ただし、内因性の酵素、即ち標識酵素と同様な酵素が標本内に生来存在する時はその処置に注意を要する。中根 (1975) によれば、感度の点でも FAT に比べて勝るとも劣らずという性能をもつので、今後、この方法はさらに広く使われるであろう。標識用の酵素として西洋ワサビからとった Horseradish peroxidase がもっぱら使われている。それゆえ、Immunoperoxidase technique ともいわれる。その染色法には直接法と間接法がある。間接法を行なうにあたっては、現在のところ FAT に比べ、わが国では市販の標識抗体がまだ得にくい状況にある。

魚類ウイルス病に EAT が応用された例は FAT に比べ、ごく少ないが IPNV に NICHOLSON *et al.* (1978) が応用した報告がある。応用例が少ないのはより新しい方法であることによるのであろう。彼らは直接法と間接法の両方を行ない、6~8 時間後に ウイルス抗原を検出した。両方法とも IPNV の血清タイプの区別はできなかった。間接法ではわずかな非特異染色はあるが、直接法と同様に陽性対照は明瞭に染まり、容易に区別できたと報告している。

この結果は彼らも述べているように、この方法で IPNV の同定が病魚入手 10~12 時間後に可能であることを示している。本法の間接法はその実用性が高いと考えられるので、検出感度、より迅速化のための魚体のスタンプ標本への応用、IHNV の本法による同定などについて、本法をさらに発展させることが早急に望まれる。

EAT の一種である酵素イムノアッセイ法 (Enzyme-linked immunosorbent assay 法 ELISA) が種々のウイルスあるいは抗体の検出に用いられている。この方法は後述するラジオイムノアッセイ法に匹敵する感度を有する上に、放射能による環境汚染の心配がなく、設備が簡便でよいなどの特徴をもつので、さらに発展が予想される。魚類ウイルス病への応用も期待できる。

3. 迅速免疫電顕法

検査材料の磨砕液と抗血清を混合、反応させ、抗原と抗体の特異反応によるウイルス凝集を遠心によって集めた後、あるいは特異抗血清処理をした電顕用グリッドに

患部材料をのせてウイルスを吸着させた後、negative 染色を行ない、電顕観察する方法が本法である。すなわち、抗原抗体反応を直接電顕でみようとする方法である。後者のやり方は特に迅速性にすぐれ、30 分程度でウイルス検出が可能である (Milne *et al.*, 1977)。従来、フェリチンなどを標識物質として抗体に標識し、抗原と結合させ、その存在部位を超薄切片の電顕観察により確認する方法として免疫電顕法が知られているが、ここに紹介する方法は従来の免疫電顕法とは異なる。本法は感受性を有する細胞がないウイルスをも追求できるという大きな利点を有する上にウイルスのタイプ分けも可能 (KAPIKIAN *et al.*, 1975) であるとされている。また、本法を逆に利用し、血中抗体価の測定も可能 (吉沢, 1978) とされている。UNDERWOOD *et al.* (1977) は IPNV および Tellina V の血清学的関連を本法を用いて調べている。 10^8 個/ml の粒子数が必要 (MILNE *et al.*, 1977) なので、それほど高感度ではないが、迅速性を生かし、魚類ウイルス病の迅速診断法の一つとして、発展させる価値があろう。ただし、本法を行なうには電顕を必要とするという装置上の制約をもつ。

4. 免疫拡散法

寒天などの支持体中を抗原と抗体を拡散させると、両者の最適濃度比のところに沈降線を生じる。

この方法が免疫拡散法であり、やり方によっていくつかの方法に分かれる。その中の一元免疫拡散法が血清肝炎の HB 抗原のルーチンな検査法として臨床医学で行われている。すなわち、特異抗血清を含有する寒天プレートに小孔を明けたものが市販されており、非常に簡便な手技で 1~14 時間後に容易に判定が可能である。しかし、その感度は HBs 抗原の場合、沢部ら (1976) によれば、後述するラジオイムノアッセイ法や逆受身血球凝集反応法の約 1/300 あるいは 1/100 である。それでも、本法は手技が非常に簡便なこと、判定時間が比較的短かいこと、および特別な設備が不要などの利点を有すことから、魚類ウイルス病の迅速診断法の一つとして検討されてよいと考える。

なお、JØRGENSEN (1969) は抗 VHSV 血清と VHSV および IPNV の二重拡散法を行ない、VHSV との間に生じる沈降線が IPNV との間には生じないことを報告している。

5. ラジオイムノアッセイ法 (RIA)

本法は抗原または抗体を ^{125}I で標識し、抗原抗体反応

で生じる沈降物を液体シンチレーションカウンターによる放射能測定によって定量することによる。本法は感度が極めて高く、かつその操作は簡単であり、迅速性も持つ。しかし、本法はシンチレーションカウンターという特殊な装置が必要であり、かつ放射能公害という面も生じる。その上、同程度の感度を有する方法が他にあって、現在のところ、魚類ウイルス病においては、本法の応用を検討する必要はないと考える。

6. 逆受身血球凝集反応

本法は間接血球凝集反応ともいわれ、HBs 抗原の検出で、RIA 法につぐ、あるいは匹敵する高感度な方法(今井ら, 1975; 小松ら, 1977; 吉原, 1979)としてルーチ的に用いられ、そのキットが市販されている。道具として通常のマイクロタイトレーション用具があればよく、手技も簡単で1~2時間後に結果を判定できるという迅速性も併せ持つ。その原理は抗体を吸着させた血球に抗原が結合すると、血球が凝集し、その凝集が肉眼で観察可能になることを利用したものである。この方法も魚類ウイルス病の迅速診断法として応用の可能性が高いと考えられる。同様な方法がレッドマウス病で血中抗体価の測定に試みられている(BUSCH, 1978)。

7. 対向免疫電気泳動法

本法は寒天平板を用いた電気泳動の際、抗原は陽極側に、抗体は陰極側に移動することを利用し、自然拡散を待たずに電流を流すことにより、30~90分の短時間内に感度よく抗原、抗体複合物の沈降線を形成させる方法であり、同時に抗原、抗体の両方の検出も可能である。この方法もHBs 抗原、抗体の検出に用いられる方法で、最も短時間で検査できる。本法用に孔をあけた寒天プレートが市販されている。本法は器具として電気泳動装置があればよく、極めて迅速で簡便な方法として魚類ウイルス病診断への応用の可能性がある。

む す び

以上述べたように魚類ウイルス病の迅速診断として検討されたのは蛍光抗体法と酵素抗体法であり、より普及が可能という点で酵素抗体法、中でもその間接法は有望である。その他の方法も、その感度と迅速性、簡便性および試薬の保存性、コストなどを検討しつつ、必要十分な方法を見出し、使い分けをする必要がある。

いずれの方法を行なうにしても高い特異性を有する、出来るだけ高い中和力価の抗血清が必要である。IPNV

の抗血清は高力価のものが容易に作製できる(JØRGENSEN, 1972; PIPER *et al.*, 1973, UNDERWOOD *et al.*, 1977; SANO *et al.*, 1979 *in press*) が IHNV の抗血清は高力価のものができにくいようである。文献上も50%ブラック減少力価が152, 164(McCAIN *et al.*, 1971), 50(WOLF *et al.*, 1973), 1700(HILL *et al.*, 1975)とかなり低い値である。わが国のサケマスの自然発生ウイルス病は現在のところ、ほとんどIPNとIHNなので診断にあたっては少なくとも、この両ウイルスの診断を行なわなくてはならない。そのためには、FATあるいはEIAに使用可能な抗IHNV血清を作ることが急務である。McALLISTER *et al.* (1974)はIHNVの間接FATで一次血清を1:2に希釈して用いている。理論的にはこれでも可能であるが、少なくとも1:50~100に希釈可能な抗血清を実用上は必要であろう。

また、ニジマスに病原性が証明されたヨーロッパウナギのシラスから分離されたEVEX(SANO *et al.*, 1977; 佐野ら, 1979)およびアメリカウナギから分離されたEVA(SANO, 1976)の抗血清も用意しておかねばならない。さらにVHSVの迅速診断技術を確立しておくために、抗VHSV血清の準備は必須である。また、ヒメマスから分離されたウイルスNEVTA(佐野, 1976)およびヤマベから分離されたウイルスOMV(木村ら, 1979)についても同様である。

文 献

- BUSH, R. A. (1978): Enteric red mouth disease (hagerman strain). *Marine Fish. Rev.*, 40 (3), 42-51.
- 浜島義博・京極方久 (1975): 免疫組織学, 医学書院, 東京.
- HILL, B. J., B. O. UNDERWOOD, C. J. SMALE and F. BROWN (1975): Physico-chemical and serological characterization of five rhabdoviruses infecting fish. *J. gen. Virol.*, 27, 369-378.
- 今井光信・山主公子・小沢直宏・高橋和明・佐藤政子・真弓 忠 (1975): HBs 抗原と抗体の検出法—R-PHAとPHAについて. *Medical Technology*, 3 (4), 239-244.
- JØRGENSEN, P. E. VESTERARD (1968): Serological identification of Egtved virus (Virus of Viral Haemorrhagic Septicaemia of rainbow trout). A preliminary report. *Bull. Off. int. Epiz.*, 69 (7-8), 985-989.
- JØRGENSEN, P. E. VESTERARD (1972): Egtved virus: Antigenic variation in 76 virus isolates examined in neutralization tests and by means of the fluorescent antibody technique. *Symp.*

- zool. Soc. Lond., No. 30, L. Mawdsley-Thomas, ed. Academic Press, London and New York, 333-340.
- JØRGENSEN, P. E. Vesterard and A. MEYLING (1972): Egtved virus: Demonstration of virus antigen by the fluorescent antibody technique in tissues of rainbow trout affected by Viral Haemorrhagic Septicaemia and in cell cultures infected with Egtved virus. *Arch. ges. Virusforsch.*, **36**, 115-122.
- JØRGENSEN, P. E. Vesterard (1974): Indirect fluorescent antibody techniques for demonstration of trout viruses and corresponding antibody. *Acta vet. Scand.*, **15**, 198-205.
- KAPIKIAN, A. Z., S. M. FEINSTONE, R. H. PURCELL, R. G. WYATT, T. S. THORNHILL, A. R. KALICA and R. M. CHANOCK (1975): Detection and identification by immune electron microscopy of fastidious agents associated with respiratory illness, acute nonbacterial gastroenteritis, and hepatitis A. *Perspect. Virol.*, **9**, 9-47.
- 川村明義 (1976): けい光抗体法, 「ウイルス実験学総論, 国立予防衛生研究所学友会編, 528, 丸善, 東京」 297-329.
- 木村喬久・吉水 守・三戸秀敏・田中 真 (1979): 魚病に関する研究—XXV. ヤマベ (*Oncorhynchus masou*) 親魚体腔液から分離された新しいウイルスについて. 昭和 54 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 211.
- 小松文夫・吉川昭美・矢野節子・佐藤ヒロミ・須田真美子・松田美枝子・竹内重五郎 (1977): セロ-ディ-ア HBs 法による HBs 抗原の検出率について. 臨床検査, **21**, 1613-1615.
- MCALLISTER, P. E., J. L. FRYER, and K. S. PILCHER (1974): Further characterization of Infectious Hematopoietic Necrosis virus of salmonid fish (Oregon strain). *Arch. ges. Virusforsch.*, **44**, 270-279.
- MCCAIN, B. B., J. L. FRYER, and K. S. PILCHER (1971): Antigenic relationships in a group of three viruses of salmonid fish by cross neutralization. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)*, **137**, 1042-1046.
- MEIER, W. and P. E. Vesterard JØRGENSEN (1975): A rapid and specific method for the diagnosis of Viral Hemorrhagic Septicaemia (VHS) of rainbow trout. *Piscic. Ittiop.*, **10**, 11-18.
- MILNE, R. G. and E. LUISONI (1977): Rapid immune electron Microscopy of virus preparations. *Methods in virology*, VI, K. Maramorsch and Koprowski, ed. Academic Press, New York, San Francisco, London, 265-281.
- NAKANE, P. K. and PIERCE, G. B. (1966): Enzyme-labeled antibody, preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 929-931.
- NICHOLSON, B. L. and E. A. HENCHAL (1978): Rapid identification of Infectious Pancreatic Necrosis virus in infected cell cultures by immunoperoxidase techniques. *J. Wildl. Dis.*, **14**, 465-469.
- 西村定一・福田穎穂・佐野徳夫 (1979): 日本産魚類のウイルス病に関する研究—XX. ウナギウイルス EVE の濃縮と精製について. 昭和 54 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 214.
- PIPER, D., B. L. NICHOLSON, and J. DANN (1973): Immunofluorescent study of the replication of Infectious Pancreatic Necrosis virus in trout and Atlantic salmon cell cultures. *Infect. Immunity*, **8**, 593-599.
- SANO, T. (1976): Viral diseases of cultured fishes in Japan. *Fish Path.*, **10** (2), 221-226.
- SANO, T., T. NISHIMURA, N. OKAMOTO and H. FUKUDA (1977): Studies on viral diseases of Japanese fishes—VII. A rhabdovirus isolated from European eel, *Anguilla anguilla*. *Bull. Jap. Soc. Fish.*, **43** (5), 491-495.
- 佐野徳夫・鳥羽光晴 (1979): 日本産魚類のウイルス病に関する研究—XXII. 輸入ウナギから分離されたラブドウイルスの日本産魚類に対する病原性. 昭和 54 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 217.
- SANO, T., N. OKAMOTO, and T. NISHIMURA (1980): Virological study on a new epizootic in eel-culture ponds in Japan. *J. Fish Dis.*, 投稿中.
- 沢部孝昭・中山 昇・大倉久直・向島 達 (1977): 二種の逆受身赤血球凝集反応による HBs 抗原検出法の比較検討. 臨床検査, **21**, 1609-1612.
- TU, K., R. S. SPENDLOVE, and R. W. GOEDE (1974): Immunofluorescent cell assay of Infectious Pancreatic Necrosis virus. *Appl. Microbiol.*, **27** (3), 593-599.
- UNDERWOOD, B. O., C. J. SMALE and F. BROWN (1977): Relationship of a virus from *Tellina tenuis* to Infectious Pancreatic Necrosis virus. *J. gen. Virol.*, **36**, 93-109.
- 渡辺 翼・佐野正安・高橋恵子 (1978): 螢光抗体間接法による鮭鱒類病原性ウイルス抗原の検出, 非特異螢光の除去. 昭和 53 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 229.
- WOLF, K., M. C. QUIMBY, L. L. PETTIJOHN, and M. L. LANDOLT (1973): Fish viruses: Isolation and identification of Infectious Hematopoietic Necrosis in eastern North America. *J. Fish. Res. Board Can.*, **30**, 1625-1627.
- 吉原みな子 (1979): 精製 HBs 抗原サブタイプ (adr, adw) に関する市販キット 11 種の検出感度の比較検討. 臨床検査, **23** (5), 505-508.
- 山崎英夫・福田穎穂・西村定一・佐野徳夫 (1979): 日

本産魚類のウイルス病に関する研究—XXI. 蛍光抗体法の応用について. 昭和 54 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 215.

質疑応答

【問】 北尾: 蛍光ラベル抗体の非特異抗体の除去方法として, 魚類肝臓アセトン乾燥粉末の使用の御経験がありましたら教えてください。

【答】 西村: 私はその経験がありません。Jørgensen *et al.* (1972) は組織のホモジネートによる吸収を試みております。

【追加】 渡辺: 北尾先生の質問に関連して, 私どもの経験によると, 抗ウイルス血清 (このウイルスは RTG-2 でつくられたもの) をニジマスの血中に注射して, 4 時間後に採血した血清を使うことにより, 非常によく非特異的蛍光を吸収する。