直接および間接蛍光抗体法によるブリ主要病原細菌の識別^{*1}

楠田 理一, 河原栄二郎

(1986 年 7 月 16 日受理)

Direct and Indirect Fluorescent Antibody Identification of Yellowtail Pathogens^{*1}Riichi Kusuda^{*2} and Eijiro Kawahara^{*2}

Direct and indirect fluorescent antibody techniques were evaluated as methods for identification of yellowtail pathogens, *Streptococcus* sp., *Pasteurella piscicida*, *Nocardia kampachi* and *Vibrio anguillarum* (serotype J-O-3) in this study. Four antibody solutions were prepared against these pathogens for direct fluorescence tests. For indirect technique, four primary antibodies were obtained from rabbits immunized with formalin killed bacterial cells and the fluorescent antibody was prepared from goat immunoglobulin-G of anti-rabbit immunoglobulin-G (G-FA). The sensitivity and specificity of both techniques were examined by applying dilutions to microscope slides coated with heat-fixed antigens of eleven fish pathogenic strains. The sensitivity of the direct technique was higher than that of the indirect one. But concerning the point of specificity, the direct technique was superior than the indirect one. These results suggest that direct fluorescent antibody technique is better than indirect technique for the identification of yellowtail pathogens.

魚類の細菌性疾病の診断や病魚の組織中における原因菌の局在の追求に蛍光抗体法を応用するためには、まず魚病細菌に対する本報の特異反応性について検討する必要がある。また、本法には直接法と間接法の2法が知られているが、一般には前者のほうが後者に比べて検出感度は低い、特異性の点ではすぐれているとされている。¹⁾

そこで、本報ではブリの主要病原菌である *Streptococcus* sp., *Pasteurella piscicida*, *Nocardia kampachi* および *Vibrio anguillarum* を用いて、直接法と間接法の反応性を比較し、どちらの方法が魚病細菌の識別に適しているかを検討した。

実験方法

培養菌標本の作製 Table 1 に示す 11 株の魚病細菌を BHI ブイヨン (Difco) で 25°C, 48~96 時間培養した。なお、BHI ブイヨンの食塩濃度は各供試菌の発育至適濃度に調整した。培養菌液に 0.5% ホルマリンを添加して 37°C, 48 時間不活化後、遠心分離により集菌した。ホルマリンを除去するために、集めた菌を pH 7.2 のリン酸緩衝食塩水 (PBS) に再懸濁し、遠心分離をする洗浄操作を 3 回行った。こうして得られた不活性化菌体を波長 525 nm で吸光度が 0.85 となるように

PBS に懸濁し、スライドガラスに塗抹し、風乾後火炎固定した。

抗血清の作製 *Streptococcus* sp. YT-3, *Pasteurella piscicida* P-2337, *Nocardia kampachi* N-1 および血清型 J-O-3 の *Vibrio anguillarum* V-1109 の 4 種のホルマリン不活性化菌体を PBS に懸濁し、波長 525 nm で吸光度が 2.0 となるように調整した。そして、これに等量のプロイントの完全アジュバント (Difco) を加え、混合・乳化して、ウサギの両後足の指の皮下に各 0.4 ml ずつを、背部皮下に各 1.2 ml を接種した。接種後、1 週間毎に採血して抗血清を分離した。

直接標識抗体の作製 Banner *et al.*²⁾ の方法により行った。すなわち、DEAE Affi-Gel Blue (Bio-Rad) を用いたアフィニティクロマトグラフィーによって前記 4 種の抗血清から IgG を精製し、ポリエチレングリコール 20,000 で濃縮した。これを、さらに pH 9.0 の 0.25 mol 炭酸一重炭酸緩衝液 (CBB) に透析したのち、IgG 量が 20 mg/ml となるように CBB に溶解した。なお、IgG の量は Hudson and Hay³⁾ の方法により、波長 280 nm における吸光度から算出した。そして、IgG 量の 30% の celite-fluorescein isothiocyanate (celite-FITC, Sigma) を加えて 40°C, 15 分間攪拌して標識した。標識後に 10,000 rpm で 5 分間遠心して、未反応

^{*1} 本研究の要は 1984 年 4 月、日本水産学会春季大会において発表した。

^{*2} 高知大学農学部水族病理学講座 (Fish Disease Laboratory, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783, Japan).

Table 1. Organisms used for testing the specificity of primary antibody or fluorescent antibody

Organism	Strain number	Source	Fish
<i>Streptococcus</i> sp.	YT-3	Tosashimizu, Kochi	Yellowtail
<i>Streptococcus iniae</i>	KK-3	Wakayama	Ayu
<i>Pasteurella piscicida</i>	P-2337	Uchinoumi, Tokushima	Yellowtail
<i>Nocardia kampfchi</i>	N-1	Nomi, Kochi	Yellowtail
<i>Vibrio anguillarum</i> (J-O-1)	V-36	Nagato, Yamaguchi	Ayu
<i>Vibrio anguillarum</i> (J-O-2)	V-1155	Kiki, Tokushima	Ayu
<i>Vibrio anguillarum</i> (J-O-3)	V-1109	Hiwasa, Tokushima	Ayu
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525		
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 12633		
<i>Edwardsiella tarda</i>	EF-1	Fukuroi, Shizuoka	Eel
<i>Aeromonas salmonicida</i>	ATCC 14174		

Table 2. Staining titer of fluorescein-labeled anti-*Streptococcus* sp. YT-3 rabbit IgG against various fish pathogens

Antigen	Dilution of fluorescent antibody						
	1: 10	1: 50	1: 100	1: 500	1: 1000	1: 5000	1: 10000
<i>Streptococcus</i> sp. YT-3	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
<i>Streptococcus iniae</i> KK-3	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. piscicida</i> P-2337	—	—	—	—	—	—	—
<i>N. kampfchi</i> N-1	—	—	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-1) V-36	—	—	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-2) V-1155	—	—	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-3) V-1109	—	—	—	—	—	—	—
<i>Ps. fluorescens</i> ATCC 13525	—	—	—	—	—	—	—
<i>Ps. putida</i> ATCC 12633	+	—	—	—	—	—	—
<i>E. tarda</i> EF-1	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	—	—	—	—	—	—	—

+++ : intense fluorescence, ++ : clear fluorescence, + : distinct fluorescence, — : no definite fluorescence.

の celite-FITC を除去した。さらに, Sephadex G-75 (Pharmacia) を用いて, 0.01% NaN₃ 加 PBS で溶出してゲルろ過を行い, 標識抗体を精製した。

間接標識抗体の作製 市販の抗ウサギ IgG ヤギ IgG (Miles Yeda) を CBB に 20 mg/ml となるように溶解したのち, 直接標識抗体の作製と同様の手順で色素を標識した。

標識抗体の色素対タンパク (F/P) 結合モル比 280 nm および 495 nm の波長で吸光度を測定し, 次の式から算出した。³⁾ 色素 (F)/タンパク (P) = $2.87 \times OD_{495} / OD_{280} - 0.35 \times OD_{495}$ 。

直接法の反応方法 PBS で 10, 50, 100, 500, 1,000, 5,000 および 10,000 倍に希釈した標識抗体を培養菌標本に滴下し, 保湿箱に入れ, 室温で 30 分間反応させたのち, PBS で 10 分間洗浄した。洗浄後, 封入剤⁴⁾ で封入してカバーガラスをかけ, 落射型蛍光顕微鏡 (Fluophot, 日本光学) を用いて B 励起方式で観察し, 特異蛍光を蛍光強度により卅, 卅, +, - の 4 段階に分けて記載した。

間接法の反応方法 希釈した一次抗体と標識抗体を組

み合わせて反応させた。すなわち, PBS で 50, 100, 500, 1,000, 5,000 および 10,000 倍に希釈した 4 種の供試抗血清を, 培養菌標本に滴下し, 保湿箱に入れ, 室温で 30 分間反応させたのち, PBS で 10 分間洗浄した。次に PBS で 10, 25, 50, 100, 250, 500 および 1,000 倍に希釈したヤギ間接標識抗体 (G-FA) を直接法と同様の方法で反応させ, 検鏡によって蛍光強度を 4 段階に分けて記載した。

結 果

直接法 標識抗体の F/P 結合モル比は抗 *Streptococcus* sp. YT-3 標識抗体 (YT-3 FA) が 5.1, 抗 *P. piscicida* P-2337 標識抗体 (P-2337 FA) が 1.1, 抗 *N. kampfchi* N-1 標識抗体 (N-1 FA) が 3.5, 抗 *V. anguillarum* V-1109 標識抗体 (V-1109 FA) が 4.4 であった。

各培養菌標本に対する YT-3 FA の反応結果は Table 2 に示すとおりであった。すなわち, 抗原菌株 *Streptococcus* sp. YT-3 に対する蛍光強度は 1,000 倍までが卅, 5,000 倍および 10,000 倍が+となり, 反応力価は

Table 3. Staining titer of fluorescein-labeled anti-*P. piscicida* P-2337 rabbit IgG against various fish pathogens

Antigen	Dilution of fluorescent antibody						
	1: 10	1: 50	1: 100	1: 500	1: 1000	1: 5000	1: 10000
<i>Streptococcus</i> sp. YT-3	+	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus iniae</i> KK-3	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. piscicida</i> P-2337	+++	+++	+++	++	+	—	—
<i>N. kampachi</i> N-1	+	—	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-1) V-36	+	+	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-2) V-1155	+	+	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-3) V-1109	+	+	—	—	—	—	—
<i>Ps. fluorescens</i> ATCC 13525	+	—	—	—	—	—	—
<i>Ps. putida</i> ATCC 12633	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. tarda</i> EF-1	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	+	+	—	—	—	—	—

+++: intense fluorescence, ++: clear fluorescence, +: distinct fluorescence, —: no definite fluorescence.

Table 4. Staining titer of fluorescein-labeled anti-*N. kampachi* N-1 rabbit IgG against various fish pathogens

Antigen	Dilution of fluorescent antibody						
	1: 10	1: 50	1: 100	1: 500	1: 1000	1: 5000	1: 10000
<i>Streptococcus</i> sp. YT-3	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus iniae</i> KK-3	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. piscicida</i> P-2337	—	—	—	—	—	—	—
<i>N. kampachi</i> N-1	+++	++	+	+	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-1) V-36	—	—	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-2) V-1155	—	—	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-3) V-1109	—	—	—	—	—	—	—
<i>Ps. fluorescens</i> ATCC 13525	—	—	—	—	—	—	—
<i>Ps. putida</i> ATCC 12633	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. tarda</i> EF-1	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	—	—	—	—	—	—	—

+++: intense fluorescence, ++: clear fluorescence, +: distinct fluorescence, —: no definite fluorescence.

Table 5. Staining titer of fluorescein-labeled anti-*V. anguillarum* (J-O-3) V-1109 rabbit IgG against various fish pathogens

Antigen	Dilution of fluorescent antibody						
	1: 10	1: 50	1: 100	1: 500	1: 1000	1: 5000	1: 10000
<i>Streptococcus</i> sp. YT-3	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus iniae</i> KK-3	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. piscicida</i> P-2337	—	—	—	—	—	—	—
<i>N. kampachi</i> N-1	—	—	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-1) V-36	—	—	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-2) V-1155	+	—	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-3) V-1109	+++	+++	+++	++	+	—	—
<i>Ps. fluorescens</i> ATCC 13525	—	—	—	—	—	—	—
<i>Ps. putida</i> ATCC 12633	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. tarda</i> EF-1	+	—	—	—	—	—	—
<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	—	—	—	—	—	—	—

+++: intense fluorescence, ++: clear fluorescence, +: distinct fluorescence, —: no definite fluorescence.

Table 6. The titer of anti-*Streptococcus* sp. YT-3 primary antibody after indirect staining with fluorescein-labeled goat anti-rabbit IgG against various fish pathogens

Antigen	Dilution of primary antibody					
	1: 50	1: 100	1: 500	1: 1000	1: 5000	1: 10000
<i>Streptococcus</i> sp. YT-3	+++	++	++	++	++	+
<i>Streptococcus iniae</i> KK-3	—	—	—	—	—	—
<i>P. piscicida</i> P-2337	++	+	—	—	—	—
<i>N. kampachi</i> N-1	+	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-1) V-36	+	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-2) V-1155	+	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-3) V-1109	—	—	—	—	—	—
<i>Ps. fluorescens</i> ATCC 13525	—	—	—	—	—	—
<i>Ps. putida</i> ATCC 12633	—	—	—	—	—	—
<i>E. tarda</i> EF-1	+	+	—	—	—	—
<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	+	+	—	—	—	—

Dilution of the fluorescein-labeled goat antibody was 1: 50.

+++ : intense fluorescence, ++ : clear fluorescence, + : distinct fluorescence, — : no definite fluorescence.

Table 7. The titer of anti-*P. piscicida* P-2337 primary antibody after indirect staining with fluorescein-labeled goat anti-rabbit IgG against various fish pathogens

Antigen	Dilution of primary antibody					
	1: 50	1: 100	1: 500	1: 1000	1: 5000	1: 10000
<i>Streptococcus</i> sp. YT-3	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus iniae</i> KK-3	—	—	—	—	—	—
<i>P. piscicida</i> P-2337	+++	+++	+++	+++	++	++
<i>N. kampachi</i> N-1	++	+	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-1) V-36	++	++	+	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-2) V-1155	++	++	+	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-3) V-1109	++	++	+	+	—	—
<i>Ps. fluorescens</i> ATCC 13525	+	—	—	—	—	—
<i>Ps. putida</i> ATCC 12633	+	—	—	—	—	—
<i>E. tarda</i> EF-1	++	++	+	+	—	—
<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	+++	++	++	+	—	—

Dilution of the fluorescein-labeled goat antibody was 1: 50.

+++ : intense fluorescence, ++ : clear fluorescence, + : distinct fluorescence, — : no definite fluorescence.

少なくとも 10,000 倍まで確認された。交差性は *Ps. putida* ATCC 12633 に対して存在した。

P-2337 FA の反応結果は Table 3 に示すとおりであった。抗原菌株 *P. piscicida* P-2337 に対する蛍光強度は 100 倍までが卍, 500 倍が卄, 1,000 倍が+となり, 反応力価は 1,000 倍であった。交差性は *Streptococcus* sp. YT-3, *N. kampachi* N-1, 血清型 J-O-1 の *V. anguillarum* V-36, 血清型 J-O-2 の *V. anguillarum* V-1155, 血清型 J-O-3 の *V. anguillarum* V-1109, *Ps. fluorescens* ATCC 13525 および *A. salmonicida* ATCC 14174 に対して認められた。

N-1 FA の反応結果は Table 4 に示すとおりであった。抗原菌株 *N. kampachi* N-1 に対する蛍光強度は 10 倍が卍, 50 倍が卄, 100 倍および 500 倍が+となり, 反応力価は 500 倍であった。交差性は認められな

かった。

V-1109 FA の反応結果は Table 5 に示すとおりであった。抗原菌株 *V. anguillarum* V-1109 に対する蛍光強度は 100 倍までが卍, 500 倍が卄, 1,000 倍が+となり, 反応力価は 1,000 倍であった。交差性は血清型 J-O-2 の *V. anguillarum* V-1155 および *E. tarda* EF-1 に対して認められた。

間接法 G-FA の F/P 結合モル比は 5.2, また最適反応希釈倍率は 50 倍であった。

各培養菌標本に抗 *Streptococcus* sp. YT-3 血清と G-FA を反応させた結果は Table 6 に示すとおりであった。すなわち, 抗原菌株 *Streptococcus* sp. YT-3 に対する蛍光強度は一次抗体希釈が 50 倍が卍, 100 倍, 500 倍, 1000 倍および 5,000 倍が卄, 10,000 倍が+となり, 反応力価は少なくとも 10,000 倍までは確認さ

Table 8. The titer of anti-*N. kampachi* N-1 primary antibody after indirect staining with fluorescein-labeled goat anti-rabbit IgG against various fish pathogens

Antigen	Dilution of primary antibody					
	1: 50	1: 100	1: 500	1: 1000	1: 5000	1: 10000
<i>Streptococcus</i> sp. YT-3	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus iniae</i> KK-3	—	—	—	—	—	—
<i>P. piscicida</i> P-2337	—	—	—	—	—	—
<i>N. kampachi</i> N-1	++	++	+	+	+	+
<i>V. anguillarum</i> (J-O-1) V-36	—	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-2) V-1155	—	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-3) V-1109	—	—	—	—	—	—
<i>Ps. fluorescens</i> ATCC 13525	—	—	—	—	—	—
<i>Ps. putida</i> ATCC 12633	—	—	—	—	—	—
<i>E. tarda</i> EF-1	+	—	—	—	—	—
<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	—	—	—	—	—	—

Dilution of the fluorescein-labeled goat antibody was 1: 50.

++: clear fluorescence, +: distinct fluorescence, —: no definite fluorescence.

Table 9. The titer of anti-*V. anguillarum* (J-O-3) V-1109 primary antibody after indirect staining with fluorescein-labeled goat anti-rabbit IgG against various fish pathogens

Antigen	Dilution of primary antibody					
	1: 50	1: 100	1: 500	1: 1000	1: 5000	1: 10000
<i>Streptococcus</i> sp. YT-3	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus iniae</i> KK-3	—	—	—	—	—	—
<i>P. piscicida</i> P-2337	+	+	—	—	—	—
<i>N. kampachi</i> N-1	+	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-1) V-36	++	++	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-2) V-1155	++	++	++	+	—	—
<i>V. anguillarum</i> (J-O-3) V-1109	+++	+++	+++	+++	++	+
<i>Ps. fluorescens</i> ATCC 13525	+	—	—	—	—	—
<i>Ps. putida</i> ATCC 12633	+	—	—	—	—	—
<i>E. tarda</i> EF-1	++	+	+	—	—	—
<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	++	+	+	—	—	—

Dilution of the fluorescein-labeled goat antibody was 1: 50.

+++: intense fluorescence, ++: clear fluorescence, +: distinct fluorescence, —: no definite fluorescence.

れた。交差性は *P. piscicida* P-2337, *N. kampachi* N-1, 血清型 J-O-1 の *V. anguillarum* V-36, 血清型 J-O-2 の V-1155, *E. tarda* EF-1 および *A. salmonicida* ATCC 14174 に対して存在した。

抗 *P. piscicida* P-2337 血清と G-FA を反応させた結果は Table 7 に示すとおりであった。抗原菌株 *P. piscicida* P-2337 に対する蛍光強度は一次抗体希釈が 1,000 倍までが++, 5,000 倍および 10,000 倍が+となり, 反応力価は少なくとも 10,000 倍までは確認された。交差性は *N. kampachi* N-1, 血清型 J-O-1 の *V. anguillarum* V-36, 血清型 J-O-2 の *V. anguillarum* V-1155, 血清型 J-O-3 の *V. anguillarum* V-1109, *Ps. fluorescens* ATCC 13525, *Ps. putida* ATCC 12633, *E. tarda* EF-1 および *A. salmonicida* ATCC 14174 に対して認められた。

抗 *N. kampachi* N-1 血清と G-FA を反応させた結果は Table 8 に示すとおりであった。抗原菌株 *N. kampachi* N-1 に対する蛍光強度は一次抗体希釈が 50 倍および 100 倍が+, 500 倍, 1,000 倍および 5,000 倍が+であり, 反応力価は 5,000 倍であった。交差性は *E. tarda* EF-1 に対して認められた。

抗 *V. anguillarum* V-1109 血清と G-FA を反応させた結果は Table 9 に示すとおりであった。抗原菌株 *V. anguillarum* V-1109 に対する蛍光強度は一次抗体希釈が 1,000 倍までが++, 5,000 倍が+, 10,000 倍が+となり, 反応力価は少なくとも 10,000 倍まで確認された。交差性は *P. piscicida* P-2337, *N. kampachi* N-1, 血清型 J-O-1 の *V. anguillarum* V-36, 血清型 J-O-2 の *V. anguillarum* V-1155, *Ps. fluorescens* ATCC 13525, *Ps. putida* ATCC 12633, *E. tarda* EF-1 およ

び *A. salmonicida* ATCC 14174 に対して認められた。

考 察

蛍光抗体法の反応性は直接法では標識抗体の、間接法では一次抗体と標識抗体の良否によって決定される。すなわち、いずれの抗体も特異抗体含量が高く、交差性のないものがすぐれていえる。また、一般に標識抗体は F/P 結合モル比が 1~2 のものがよいとされている。¹⁾

今回作製した標識抗体の F/P 結合モル比は P-2337 FA を除いて高い値となった。この理由としては、通常標識抗体の色素には FITC が使用されるが、本研究では celite-FITC を用いたためだと考えられる。しかし、直接法と間接法の反応性について検討した結果では、これらの標識抗体は不都合がなく有効であると考えられる。

直接法の標識抗体の反応力価については、Kitao and Kimura⁵⁾ が *P. piscicida* の検出に用いたものが 32 倍堀内・甲賀⁷⁾ が *Ps. anguilliseptica* の検出に用いたものが 32 倍、堀内ら⁷⁾ が *E. tarda* の検出に用いたものが 16~32 倍であったとしている。これに対して本研究で作製した 4 種の直接標識抗体の反応力価はかなり高い値となった。この理由としては、標識抗体の F/P 結合モル比が高く、蛍光強度が大きくなったためではないかと考えられる。

直接法の標識抗体および間接法の一次抗体には程度の差はあったが、交差性が認められた。この原因としては、各抗体に対する抗原菌株と交差性を示した菌株とのあいだに共通抗原があるためではないかと考えられる。直接法と間接法の交差性を比較した場合、後者のほうが交差性は高いことが明らかとなった。この理由として、

培養菌標本に対する G-FA の非特異的吸着と、G-FA の作製に使用した抗ウサギ IgG ヤギ IgG 中に培養菌標本の抗原菌株に対して交差性を有する自然抗体が含まれていたことなどが考えられる。

医学や獣医学の分野では病原細菌の検出に蛍光抗体法を応用した報告は多いが、直接法と間接法の反応性について比較したものは少ない。川村¹⁾ は一般的に間接法は感度が直接法と比較して約 10 倍高いが、反応因子が多く非特異蛍光の介入が問題となると述べている。本研究においても間接法の感度は直接法に比べて 10 倍以上高かった。しかし、特異性の点では 4 種の魚病細菌識別のいずれの場合でも、直接法のほうが優れていることが明らかとなった。

これらのことから、蛍光抗体法を応用してブリ主要魚病細菌の識別を目的として検査する場合には、特異性の高い直接法が推奨される。

文 献

- 1) 川村明義：ウイルス実験学総論（国立予防衛生研究所学会編），改訂 2 版，丸善，東京，1973，pp. 297-329.
- 2) C. R. Banner, J. S. Rohovec, and J. L. Flyer: *Bull. Eur. Ass. Fish Path.*, **2**, 35-37 (1982).
- 3) L. Hudson and F. C. Hay: *Practical Immunology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1976, pp. 1-17.
- 4) J. Rodriguez and F. Deinhardt: *Virology*, **12**, 316-317 (1960).
- 5) T. Kitao and M. Kimura: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **40**, 889-893 (1974).
- 6) 堀内三津幸，甲賀清美：日水誌，**47**, 835-840 (1979).
- 7) 堀内三津幸，佐藤勉，高木博元，戸塚耕二：魚病研究，**15**, 49-55 (1980).