

## ELISA による鶏ロイコチトゾーン症の診断法

誌名	鶏病研究会報
ISSN	0285709X
著者	磯部, 尚
巻/号	22巻3号
掲載ページ	p. 97-101
発行年月	1986年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



《 解 説 》

ELISA による鶏ロイコチトゾーン症の診断法

Diagnosis of *Leucocytozoon caulleryi* Infection by ELISA Technique.

磯 部 尚

農林水産省家畜衛生試験場鶏病支場，岐阜県関市倉知 4909-58

Takashi ISOBE

Poultry Disease Laboratory, National Institute of Animal Health  
4909-58 Kurachi, Seki, Gifu, 501-32 Japan

鶏のロイコチトゾーン症については秋葉<sup>1,2,3)</sup> および森井<sup>13,14,15)</sup> の解説があり，周知のとおりである。現在まで本症の血清学的診断法として，寒天ゲル内沈降（AGP）反応<sup>12)</sup>，カウンター電気泳動法<sup>4)</sup> および間接蛍光抗体（IFA）法<sup>6)</sup> がある。しかし，これらの方法には手技が簡便であるが感度が低い，あるいは感度は優れているが手技が煩雑であるなど，それぞれに一長一短がある。一方，感度が高く，各段階での操作を容易にして省力化が可能となる器具，機材が開発され，多数の検体を短時間に処理できる方法として，ELISA（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）が確立されている。また，この方法の鶏病および寄生虫病の診断への応用について種々報告されている<sup>5,16,17,18)</sup>。ここでは，ELISA の鶏ロイコチトゾーン症診断への応用<sup>7,8,9,10)</sup> について，その術式，利点などについて紹介する。

ELISA 用抗原の作製

図1に示した方法に準じて行う。抗原は作製後，使用時まで小分けするか，又はプレートに吸着させ，超低温（-80℃）で保存しておく。抗原の活性は1年以上でも保持されている。抗原濃度は，標識抗体および被検血清の抗体力価に影響されるので，lot 毎に Box Titration を行って決定されねばならない。我々は蛋白量として 6.0 μg/well で使用した。

ELISA の術式

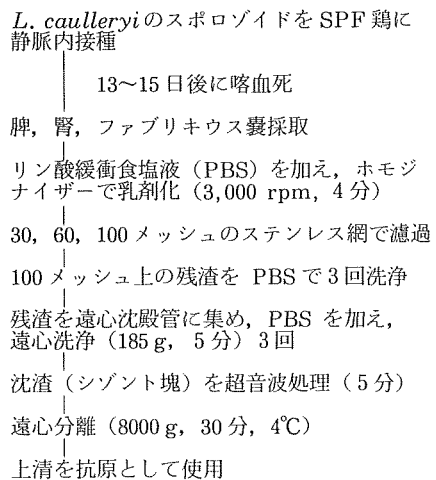
図2に示した方法で行う。

イ) 酵素標識抗体：市販のペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG 抗体又は，市販の鶏免疫グロブリンクラス別特

1986年4月15日受付

鶏病研報，22巻3号，97～101頁（1986）

図 1. 抗原の作製方法



異抗血清に過ヨウ素を用いてペルオキシダーゼを標識して<sup>19)</sup> 使用する。

ロ) 基質：0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.2）10 ml に，1% オルソフェニレンジアミン・エタノール溶液 0.6 ml，3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水溶液 0.03 ml の割合で加えたものを用いる。但し，基質溶液は使用前に調製する。

ハ) 呈色反応の停止液：4 N の H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を用いる。

ニ) 洗浄液：0.05% の割合に Tween 20 を含む PBS（pH 7.2）。

ホ) その他，必要な器具・機材：

・市販の平底ポリスチレン製 ELISA 用マイクロプレート。

・マイクロピペットおよび手動式 8 連又は 12 連マルチチャンネル分注器。

図2. ELISA の術式

A. 抗原の吸着

抗原を pH 9.6, 0.01M EDTA 加 0.1M 炭酸重炭酸緩衝液で希釈後マイクロプレートに 100  $\mu$ l/穴分注

37°C, 1 時間

余分の抗原を捨てる。

1%牛血清アルブミン(BSA)加緩衝液を 200  $\mu$ l/穴分注

37°C, 1 時間

余分な緩衝液を捨て、0.05%Tween20加リン酸緩衝食塩液 (PBS Tween) で 3 回洗浄

B. 抗原抗体反応

被検血清を 0.25%BSA加PBS Tween で希釈後、100  $\mu$ l/穴分注

37°C, 1 時間

余分な希釈血清を捨て、PBS Tween で 3 回洗浄

ペルオキシダーゼ標識家兎抗鶏IgG抗体を 1%BSA加PBS Tween で希釈後100  $\mu$ l/穴分注

37°C, 1 時間

余分な標識抗体を捨て、PBS Tween で 5 回洗浄

C. 酵素活性測定

基質溶液(1%オルソフェニレンジアミン+0.1Mリン酸緩衝液+1% $H_2O_2$ )を100  $\mu$ l/穴分注

37°C, 30分, 暗所

呈色反応の停止(4N  $H_2SO_4$ を100  $\mu$ l/穴 添加)

吸光度測定(492nm)

- ・自動プレート洗浄機
- ・自動マイクロプレート比色計および記録計。

成 績

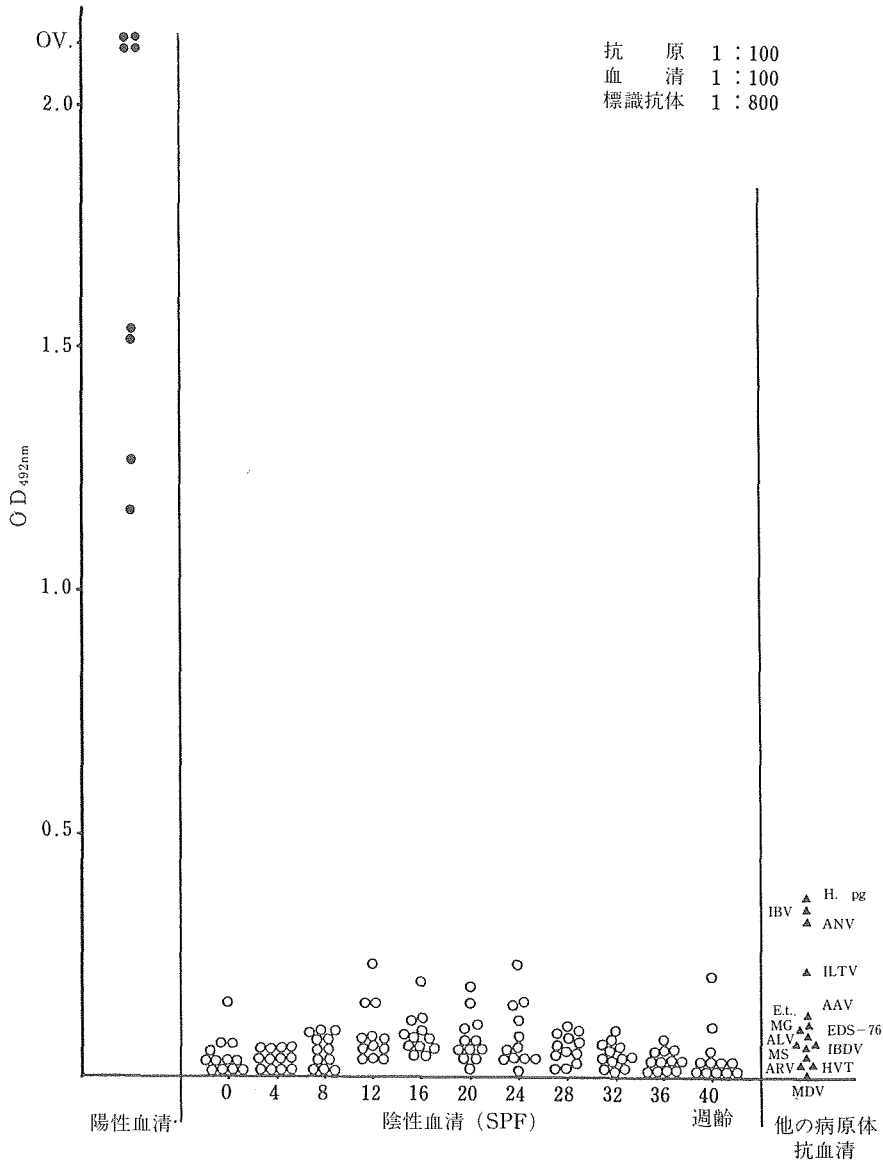
特異性：12羽のSPF鶏(PDL-1)について0~40週齢まで4週毎に採取した血清132例および*Escheria tenella* (E. t.), *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS), *Hemophilus paragallinarum* (H. pg), マレック病ウイルス(MDV), 七面鳥ヘルペスウイルス(HVT), 伝染性喉頭気管炎ウイルス(ILTV), 伝染性気管支炎ウイルス(IBV), 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス(IBDV), トリアデノウイルス(AAV), トリレオウイルス(ARV), 鶏貧血因子(CAA), 鶏腎炎ウイルス(ANV), 鶏白血病ウイルス(ALV), 産卵低下症候群1976ウイルス(EDS-76)に対する抗血清15種について, ELISAを実施した。その結果, 全て陰性で, 非特異反応および交叉反応は認められなかった(図3)。

感度：*L. caulleryi* のスポロゾイトをSPF鶏に静脈内接種後, 種々の時期に採取した血清61例についてELISA, IFAテストおよびAGP反応を実施し, 各々の抗体価間の相関関係について調べた。その結果, ELISA抗体価はAGP抗体価およびIFA価と正の相関関係にあり, AGP抗体価の約100~400倍(図4), IFA価の約3~10倍(図5)と高く, 感度の点でも優れていた。

実験感染鶏血清への応用：

28日齢SPF10羽に*L. caulleryi* のスポロゾイトを1羽当たり $1 \times 10^2$ 個づつ静脈内接種を行い, 10週まで毎週採取した血清についてELISAを実施した。標識抗体にはペルオキシダーゼ標識抗鶏IgM( $\mu$ 鎖特異的)抗体および抗鶏IgG(Fcフラグメント特異的)抗体を用いた。その結果, 図6に示すように, AGP抗体がスポロゾイト接種後3週から検出されるのに対し, ELISA・IgM抗体はスポロゾイト接種後2週から検出され始め, 3週で最も高い値を示し, その後低下し, 以

図 3. 特 異 性



後低い値で推移していた。ELISA・IgG 抗体も同じく接種後 2 週から一部の鶏に検出され始めたが、その値は低く、その後、週を重ねる毎に上昇し、接種後 8~10 週で高い値を示していた。以上のことから、ELISA により感染早期の抗体が検出できると共に、IgM および IgG 両クラスの抗体を測定することにより、感染のおおよその時期の推定が可能であることが示された。

自然感染鶏血清への応用：

鶏を自然感染に暴露し、13 ヶ月間 (1982 年 6 月から

1983 年 6 月まで)、毎月一回、定期的に採取した血清について ELISA を実施した。その結果、図 7 のように、末梢血液中に原虫が検出されると共に、ELISA 抗体は上昇し、その後様々な値を示すものの、翌年の流行期まで陰転することなく抗体が検出された。これに対し、AGP 反応では、抗体が検出されたり、検出されなかったりしていた。以上のことから、自然感染鶏群においても、ELISA は AGP 反応に比べ、抗体検出感度が高いことが示された。また AGP 反応では一部抗体の検出

図4. ELISA 抗体価と AGP 抗体価の相関

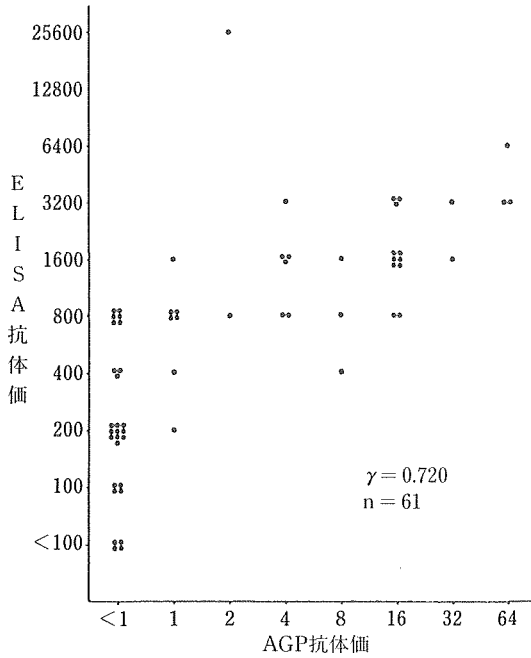


図5. ELISA 抗体価と IFA 抗体価の相関

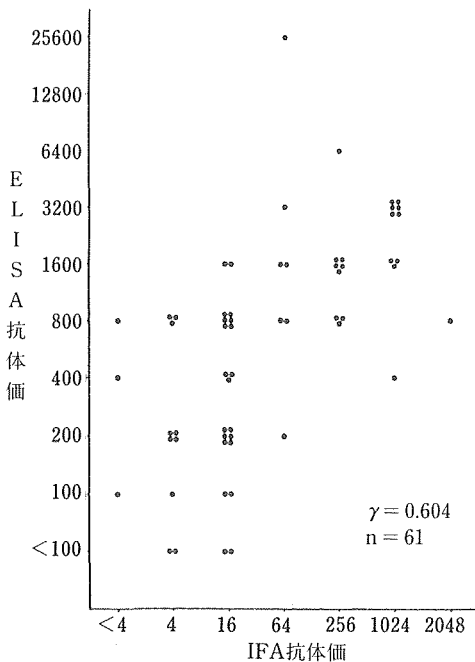
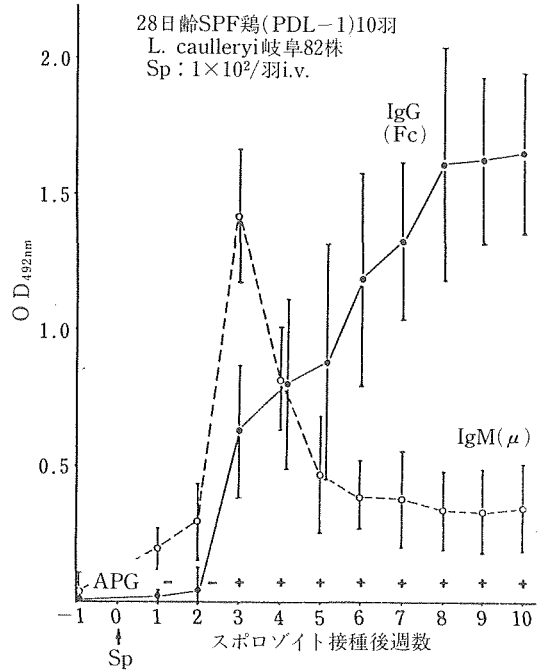


図6. *L. caulleryi* 実験感染鶏における血清 IgG および IgM 抗体の推移

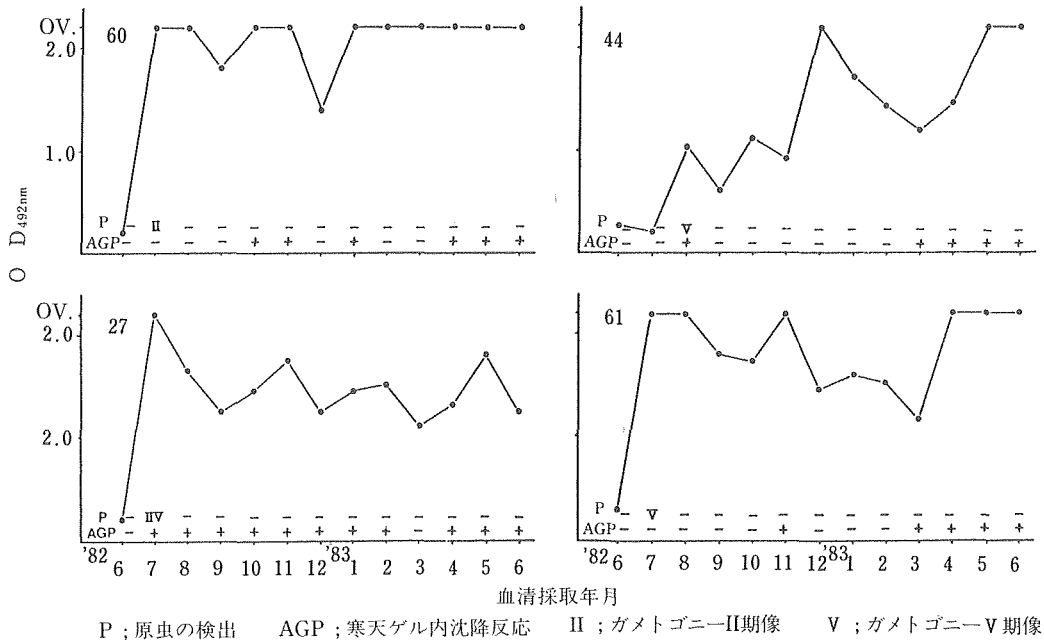


AGP: 寒天ゲル内沈降反応

が困難な冬期において、ELISA による抗体検査を行うことにより、本症の感染経歴の有無が把握でき、さらに鶏が本症の再感染に抵抗する傾向が認められる<sup>10)</sup>ことから、翌年の流行時における鶏群の対策が講じやすくなると考えられる。

現在のところ、鶏ロイコチトゾーン症の ELISA は我々の研究室を中心に利用されているにすぎない。しかし、農林水産省が昭和 59 年度に予算化した「農林水産業・食品産業等バイオテクノロジー先端技術開発事業」の一環として、畜産局衛生課の主管のもとで「免疫利用による家畜疾病の簡易診断法の開発事業」が昭和 59 年から 5 ケ年にわたって実施され、より精度が高く、操作が容易で、しかも短時間で大量の検査が可能な ELISA の応用・実用化、キット化抗原および抗体の開発が進められている。一方、各都道府県の家畜保健衛生所に、自動プレート洗浄機、自動マイクロプレート比色計等、ELISA に必要な器機が、畜産局の検査システム整備事業のもとで逐次設置されつつある。このような状況下において、鶏ロイコチトゾーン症に ELISA が応用可能であることが示されたことは、抗原の精製や標準化、術

図 7. 自然感染鶏血清での ELISA



式の統一など実用化へにはまだまだ解決されねばならない問題があるものの、今後、鶏の生産性、特に産卵鶏において問題となっている鶏ロイコチゾーン症の予防および診断に大いに役立つものと考えられる。

参 考 文 献

- 1) 秋葉和温: 鶏ロイコチゾーン症の年度別流行の特徴と衛生対策の現状からみた同症の防疫限界(1). 畜産の研究, 35, 623-630 (1981)
- 2) 秋葉和温: 鶏ロイコチゾーン症の年度別流行の特徴と衛生対策の現状からみた同症の防疫限界(2). 畜産の研究, 35, 735-740 (1981)
- 3) 秋葉和温: ロイコチゾーン症. 鶏病診断, 家の光協会, 423-442 (1982)
- 4) FUJISAKI, K., et al.: Rapid detection by counter-immunoelectrophoresis of antigens and antibodies in the sera of chickens infected with *Leucocytozoon caulleryi*. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)* 20, 96-100 (1980)
- 5) 今田忠男: 鶏ウイルス性疾病診断への ELISA の応用現況について. 鶏病研報, 20, 175-178 (1984)
- 6) ISOBE, T. & AKIBA, K.: Indirect Immunofluorescent Antibody Test in Chicken Leucocytozoonosis. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)* 22, 163-169 (1982)
- 7) 磯部 尚・鈴木 恭: ELISA による *Leucocytozoon caulleryi* 感染鶏血清の抗体測定. 寄生虫学雑誌, 34 (増刊号), 64 (1985)
- 8) 磯部 尚・鈴木 恭: ELISA による *Leucocytozoon caulleryi* 感染鶏血清の抗体測定. 実験及び自然感染鶏血清での検討, 第 99 回日本獣医学会講演要旨, 194 (1985)
- 9) 磯部 尚・鈴木 恭: *Leucocytozoon caulleryi* 感染鶏における IgM 及び IgG 抗体の推移, 第 101 回日本獣医学会講演要旨, 197 (1986)
- 10) ISOBE, T. & SUZUKI, K.: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to *Leucocytozoon caulleryi*. *Avian Pathol.*, 15, 199-211 (1986)
- 11) MORII, T. & KITAOKA, S.: Some aspect on immunity to *Akiba caulleryi* infection in chickens. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)* 10, 151-159 (1970)
- 12) MORII, T.: Presence of antigens and antibodies in the sera of chickens infected with *Akiba caulleryi*. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)* 12, 161-167 (1972)
- 13) 森井 勤: 鶏のロイコチゾーン症(1). 畜産の研究, 31, 591-595 (1977)
- 14) 森井 勤: 鶏のロイコチゾーン症(2). 畜産の研究, 31, 729-732 (1977)
- 15) 森井 勤: 鶏のロイコチゾーン症とその対策. 鶏病研報, 14, 2-13 (1978)
- 16) 野々村勲: 鶏の細菌性疾病診断への ELISA の応用. 鶏病研報, 20, 179-181 (1984)
- 17) ROSE, M.E. & MOCKETT, A.P.A.: Antibodies to coccidia: detection by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Parasite Immunol.*, 5, 479-489 (1983)
- 18) VOLLER, A., et al.: Enzyme immunoassay for parasitic diseases. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 70, 98-106 (1976)
- 19) 安田健太郎: 酵素抗体法. 新酵素組織化学, 朝倉書店, 485-519 (1980)