HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	特異抗体を指標にしたサクラマス増養殖における Renibacterium salmoninarum 感染環の推定
Author(s)	奥田, 律子; 西澤, 豊彦; 吉水, 守
Citation	魚病研究, 41(4), 175-178 https://doi.org/10.3147/jsfp.41.175
Issue Date	2006-12
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/38370
Type	article
File Information	yoshimizu-241.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

魚病研究　Fish Pathology, 41 (4), 175–178, 2006. 12
© 2006 The Japanese Society of Fish Pathology

特異抗体を指標にしたサクラマス増養殖における *Renibacterium salmoninarum* 感染環の推定

奥田律子・西澤豊彦・吉水　守*

（2006年 6 月12日受付）

Infection-cycles of *Renibacterium salmoninarum* in Hatcheries of Masu Salmon *Oncorhynchus masou* by Monitoring Specific Antibodies

Ritsuko Okuda, Toyohiko Nishizawa and Mamoru Yoshimizu*

Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate 041-8611, Japan

（Received June 12, 2006）

ABSTRACT—Detection of antibodies against *Renibacterium salmoninarum* (R.s.), a causative agent of bacterial kidney disease (BKD), was conducted among apparently healthy fingerlings and broodstock of masu salmon *Oncorhynchus masou*. Antibodies against R.s. were detected from ≥ 50% of fingerlings in the hatcheries with BKD-histories and R.s. antigens were detected in some of antibody-positive fish, but not from those in the hatchery without a BKD-history. Although returning broodstock examined within two weeks after introduced into the hatchery showed all negative for anti-R.s. antibodies, 33% of those in the hatchery with BKD-histories became positive after two months of rearing for sexually maturation. Monitoring specific antibodies suggests that R.s. infection-cycle is completed between fingerlings and broodstock in hatcheries having BKD-histories.

Key words: *Renibacterium salmoninarum*, *Oncorhynchus masou*, bacterial kidney disease, BKD, antibody detection, ELISA

サケ科魚類の細菌性腎臓病（bacterial kidney disease: BKD）の発生は，これまでに北米，ヨーロッパ，日本およびチリのサケ科魚類で報告されている[1)]。本病の原因菌である *Renibacterium salmoninarum*（R.s.）は，非運動性のグラム陽性短桿菌（0.3〜1.0 × 1.0〜1.5 μm）で，その増殖速度は極めて遅く，コロニー形成までに通常 2 週間以上の培養を要し，不顕性感染魚からの分離では 4 ヶ月以上の培養を要することもある[2,3)]。そのため本病の診断には，蛍光抗体法（IFAT）等の免疫学的手法[4)] や PCR 等の分子生物学的手法[5,6)] を用いた R.s. の検出法が多用されている。また，血清中の抗 R.s. 抗体の検出により間接的に R.s. の存在や感染履歴を把握する方法も検討されている[7)]。

わが国における BKD の初発生は，1973 年に北海道のマスノスケ *Oncorhynchus tshawytscha* で[8, 9)]，その後ギンザケ *O. kisutch* を中心に本州でも発生が認められ，現在では日本各地のサケ科魚類に発生している。わが国のサケ・マス増殖事業において，サクラマス *O. masou* はシロサケ *O. keta* に次ぐ増殖対象魚として期待されるが，近年各地の孵化場および養魚場で飼育中のサクラマス幼魚で BKD による死亡が認められ問題になっている。本研究では，サクラマスにおける R.s. 感染状況を明らかにするため，病歴および飼育形態の異なる 3 カ所の孵化場のサクラマス幼魚および成熟後採卵した親魚を対象に，IFAT による R.s. 検出調査ならびに ELISA による抗 R.s. 抗体保有調査を実施し，孵化場内における R.s. 感染環の推定を行った。

材料と方法

本調査は2003年 7 〜 9 月にかけて，BKD 発生歴の無い孵化場 A および発生歴のある 2 カ所の孵化場 B と C を対象に実施した。A および B 孵化場では，それぞれ幼魚30尾および成熟後採卵した親魚60尾を供試し，C 孵化場では，幼魚90尾，遡上親魚60尾および催熟蓄養した親魚120尾を供試し，これらの魚について IFAT および抗体検出 ELISA を行った。

A 孵化場では過去 5 年間に BKD の発生は認められていないが，B 孵化場では2003年に，C 孵化場では2002年および2003年に各々スモルト生産幼魚で BKD の発生が確認された。なお，B および C 孵化場における BKD 発生状況は類似しており，慢性的な死亡（月間死亡率 1 〜 2 %程度）が長期間続き，死亡魚からは IFAT により R.s. が検出された。A 孵化場では遡上親魚の催熟蓄養施設と孵化および幼稚魚の飼育施設は約 20 Km 離れており，それぞれ別々の支流に位置している。A および B 孵化場の遡上親魚は何れも採卵前 2 週間以内に捕獲したもので，実質的な催熟蓄養を行っていない。C 孵化場の親魚180尾のうち60尾は捕獲後 2 週間以内のもので，残る 120 尾は 2 ヶ月間催熟蓄養した魚である（Table 1）。

IFAT では，まず供試魚の腎臓塗抹標本を作製し，火炎固定後 Dulbecco phosphate buffered saline（PBS）で

北海道大学大学院水産科学研究院
* Corresponding author
E-mail: yosimizu@fish.hokudai.ac.jp

Table 1. Detection of antibodies against *Renibacterium salmoninarum* from apparently healthy fingerlings and broodstock of masu salmon at hatcheries with or without BKD-histories

Hatchery	Sampling date	Detection ratio（positive/examined samples）				History of BKD-occurrence
		Fingerlings		Broodstock*1		
		Antibody（ELISA）	Antigen（IFAT）	Antibody（ELISA）	Antigen（IFAT）	
A	September	0%（0 / 30）	0%（0 / 30）	0%（0 / 60）	0%（0 / 60）	Non
B	September	97%（29 / 30）	0%（0 / 30）	0%（0 / 60）	0%（0 / 60）	in 2003
C	July	50%（15 / 30）	7%（2 / 30）	0%（0 / 60）	NT*2	in 2002, 2003
	September	65%（39 / 60）	5%（3 / 60）	33%（40 / 120）	3%（3 / 120）	

*1: Broodstock from the hatcheries A and B were subjected to ELISA for anti-*R. salmoninarum* antibodies and IFAT for *R. salmoninarum* within 2 weeks after captured, while the tests for broodstock of the hatchery C were performed at 2 weeks and 2 months after captured for their sexually maturation.
*2: Not tested.

50倍に希釈した抗 R.s. 家兎血清および FITC 標識抗ウサギ Ig ブタ血清（Dako, Denmark）で処理した。次いで，グリセリン緩衝液（90% glycerol – 0.5 M sodium bicarbonate buffer, pH 9.5）で封入した後，蛍光顕微鏡（BX51，Olympus）で観察した。なお，判定は1,000 倍下で50視野検鏡し，R.s. が 2 菌体以上確認されたものを陽性とした。一方，抗体検出 ELISA では，KDM 2 培地[10] で培養したR.s. Tok46株（道内の BKD 幼魚由来）の加熱死菌（100°Cで30分間）を抗原とし，Yoshimizu *et al.*[11] およびNishida *et al.*[12] の方法に準じ，PBS で40倍に希釈したサクラマス血漿中の抗 R.s. 抗体を検出した。ELISA 用マイクロプレート（Greiner）への抗原固定は37°Cで 1 晩行い，プレート洗浄液として0.05% Tween 20 含 PBS（PBS-T）を，ブロッキング液として２%スキムミルク含 PBS-T を各々用いた。また，2 次血清として抗サクラマス IgM 家兎血清を，3 次血清としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ Ig ブタ血清（Dako）を，さらに発色液として OPD 溶液（0.1 mg/mL *o*-phenylndiamine, 100 mM Na_2HPO_4, 50 mM citric acid, 0.03% H_2O_2）を用いた。発色反応を 2N の硫酸で停止後，マイクロプレートリーダー（MTP-120, Corona）で吸光値（492 nm）を測定し，吸光値が0.2以上のものを抗 R.s. 抗体陽性とした。

結果および考察

BKD 発生歴のある B 孵化場のサクラマス幼魚では，30尾中29尾（97%）が抗体検出 ELISA で抗 R.s. 抗体陽性であったが，供試検体全てが IFAT で R.s. 陰性であった。同じく BKD 発生歴のある C 孵化場の幼魚においては，7 月の調査で30尾中15尾（50%）が抗 R.s. 抗体陽性で，内 2 尾から R.s. が IFAT で検出され，また 9 月の調査では，60尾中39尾（65%）が抗 R.s. 抗体陽性で，内 3 尾から R.s. が IFAT で検出された。これに対し，BKD 発生歴の無い A 孵化場の幼魚30尾について調査した結果，何れも抗 R.s. 抗体陰性であり，IFAT でも R.s. 陰性であった（Fig. 1, Table 1）。抗体検出 ELISA のみでは，感染と感染履歴を明確に区別することは困難であるが，B および C 孵化場の幼魚において BKD による慢性的な死亡が認められていることから，両孵化場の幼魚の多くが IFAT の検出限界以下のレベルで既に R.s. に不顕性感染していると考えられた。さらに，BKD 発生歴を有する孵化場と発生歴の無い孵化場の幼魚における抗 R.s. 抗体陽性率に明確な差異が認められたことから，本抗体検出 ELISA により R.s. 感染状況の把握が可能であることが示された。

次いで，3 孵化場で使用する卵を得るために用いた親魚を対象とした抗R.s. 抗体保有調査および IFAT による R.s. 検出結果について述べる（Fig. 1, Table 1）。C 孵化場の捕獲直後の採卵用親魚60尾を抗体検出 ELISA に供した結果，何れも抗 R.s. 抗体陰性であったが，同孵化場で 2 ヶ月間催熟蓄養した親魚では120尾中40尾（33%）が抗 R.s. 抗体陽性となり，内 3 尾（3%）が IFAT により R.s. 陽性であった。A および B 孵化場では採卵用親魚の催熟蓄養を行っておらず，河川で捕獲され，捕獲場あるいは孵化場内の親魚池に収容されて 2 週間以内の採卵用親魚60尾を調査対象としたが，何れからも IFAT で R.s. は検出されず，抗 R.s. 抗体も全て陰性であった。本実験結果は，河川遡上したサクラマスが，捕獲後の催熟蓄養中に孵化場内で R.s. に接触あるいは感染していることを示すものである。Mesa *et al.*[13] および Price and Schreck[14] は，R.s. に感染した幼魚が海水移行時のストレスで発症し高率に死亡することを報告している。これは，保菌した幼魚を放流してもそれらは海水中で死亡するため資源増殖につながらないことを意味し，回帰し河川遡上した親魚が R.s. フリーあるいは感染しているとしても極めて低いレベルである可能性を示唆する。従って，本研究で明らかにしたように，採卵用親魚における高率な抗 R.s. 抗体保有は河川遡上後の催熟蓄養が原因であり，その間に新たな R.s. 感染を受ける，または低濃度で存在した R.s. の体内増殖が起こると考えられる。

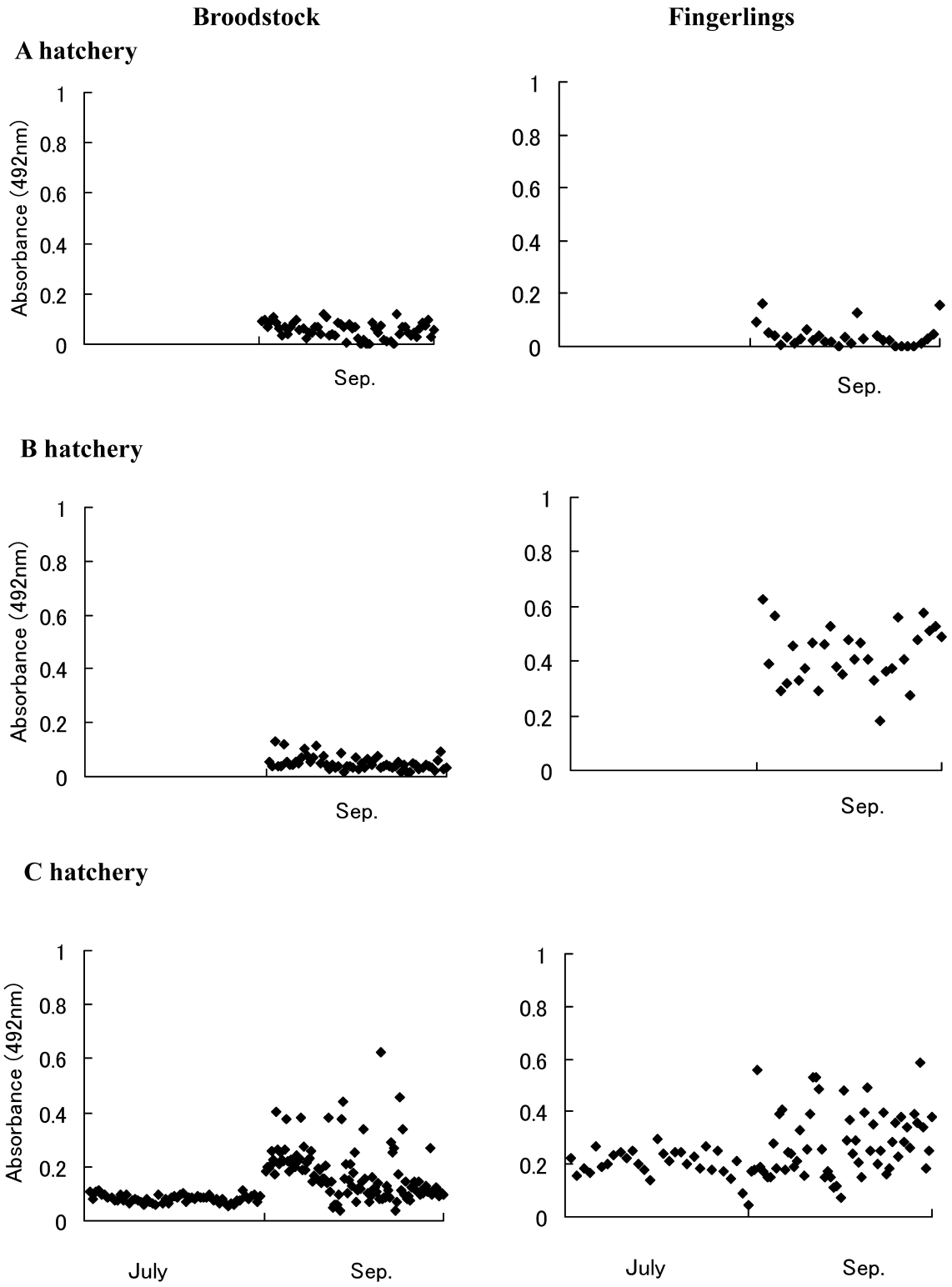

Fig. 1. Antibody titers against *Renibacterium salmoninarum* in sera of apparently healthy fingerlings and broodstock at masu salmon hatcheries with or without BKD-histories. A hatchery: without a BKD-history, B and C hatcheries: with BKD histories.

以上の結果をまとめると，BKD 発生歴を有するサクラマス孵化場では，1+ 幼魚から催熟蓄養親魚への水平感染，採卵親魚から孵化仔魚への水平感染，さらには 1+ 幼魚から 0+ 幼魚への水平感染といった R.s. の感染環が既に成立しており，飼育している幼魚の多くがR.s.に不顕性感染状態にあることが示唆された。また，サクラマス増養殖事業で行われている「河川遡上親魚の催熟蓄養」ならびに「スモルト生産（約 1 年半の間幼魚を飼育

する)」という増養殖形態が，幼魚と親魚あるいは魚令の異なる幼魚間の接触の機会を生み，R.s. の感染環の成立を助長しているのではないかと考えられた。最後に，サクラマスの回帰率は，シロサケに比べ大幅に低いが，前述のとおり，R.s. 感染あるいは感染履歴を有する稚魚は資源につながっていない可能性があることから，孵化場内で成立してしまった R.s. の感染環を断ち切ることが，サクラマスの回帰率回復に大きく寄与するのではないかと考える。A 孵化場のように親魚の遡上河川と稚魚・幼魚の飼育施設を離すことは，感染環を切る一つの方策と考えられる。

文　　献

1）Wiens, G. D. and S. L. Kaattari（1999）: In “Fish diseases and disorders, vol. 3.”（eds. Woo, P. T. K. and Bruno, D. W.）. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 269–301. 2）Benediktsdóttir, E., S. Helgason and S. Gudmundsdóttir（1991）: *J. Fish Dis.*, **14**, 97–102. 3）Sanders, J. E. and J. L. Juvenileer（1980）: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **30**, 496–502. 4）Bullock, G. L. and H. M. Stuckey（1975）: *J. Fish. Res. Board Can.*, **32**, 2224–2227. 5）Brown, L. L., T. P. T. Evelyn, G. K. Iwama, W. S. Nelson and R. P. Levine（1995）: *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 227–231. 6）Chase, D. M. and R. J. Pascho（1998）: *Dis. Aquat. Org.*, **34**, 223–229. 7）Jansson, E. and O. Ljungberg（1998）: *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 93–99. 8）木村喬久・粟倉輝彦（1977）: 日水誌, **43**, 143–150. 9）Kimura, T., and M. Yoshimizu（1981）: *Develop. Biol. Standard.*, **49**, 135–148. 10）Evelyn, T. P. T.（1977）: *Bull. OIE.*, **87**, 511–513. 11）Yoshimizu, M., S. Direkbusarakom, T. Nomura, Y. Ezura and T. Kimura（1992）: *Fish Pathol.*, **27**, 73–82. 12）Nishida, H., M. Yoshimizu and Y. Ezura（1998）: *Fish Pathol.*, **33**, 207–211. 13）Mesa, G. M., A. G. Maule, T. P. Poe and C. B. Schreck（1999）: *Aquaculture*, **174**, 25–41. 14）Price, C. S. and C. B. Schreck（2003）: *Aquaculture*, **222**, 331–341.