HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	特異抗体感作staphylococciを用いたcoagglutination testセッソウ病迅速診断への応用について
Author(s)	木村, 喬久; 吉水, 守
Citation	魚病研究, 17(4), 259-262
Issue Date	1983-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/38320
Type	journal article
File Information	yoshimizu-27.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

魚病研究 Fish Pathology 17 (4) 259-262, 1983. 3

特異抗体感作 staphylococci を用いた coagglutination test のセッソウ病迅速診断への応用について*

木村喬久・吉水　守**

(昭和 58 年 3 月 2 日受理)

Coagglutination Test with Antibody-Sensitized Staphylococci for Rapid and Simple Serological Diagnosis of Fish Furunculosis

Takahisa KIMURA and Mamoru YOSHIMIZU

Lab. Microbiol., Fac. Fish., Hokkaido Univ., Hakodate, Hokkaido, Japan

(Received March 2, 1983)

The application of a coagglutination test using staphylococci sensitized with specific antibody for the diagnosis of furunculosis causing by *A. salmonicida* in salmonids was studied.

This test proved to be a simple, rapid and reliable diagnostic procedure of furunculosis in the field as well as in the laboratory without any special apparatus.

The procedure of this method is summarized as follows;

1) Furuncle or kidney sample from diseased fish is homogenized with nine volumes of PBS, and heated in a boiling water for 30 min.

2) The supernatant is collected after centrifugation at 4000 rpm for 20 min. This may be omitted if a centrifuge is unavailable.

3) One drop of the supernatant and one drop of anit-*A. salmonicida* antibody-sensitized staphylococci suspension are mixed on a glass slide and incubate at room temperature. The results is read after 30 and 60 min.

4) If positive results was observed by means of the coagglutination test, the existence of *A. salmonicida* in the same samples which were employed on the coagglutination test should be reconfirmed by using a conventional cultural procedure.

前報（木村・吉水，1981）において *Staphylococcus aureus* のある種の株が含有する protein A に抗血清を感作させた，いわゆる staphylococci 試薬（診断液）を用いた coagglutination test による細菌性腎臓病（BKD）原因菌抗原の検出法が，BKD の迅速且つ平易な診断法として優れた方法であることを明らかにした。

本研究ではこの coagglutination test による *Aeromonas salmonicida* 抗原検出の可能性について検討を行い，本法がセッソウ病の迅速診断法の一つとしても充分実用に供しうることを明らかにし得たので報告する。

実験材料および方法

供試 *Staphylococcus aureus*: Protein A 含有 *Staphylococcus aureus* として前報同様 EDWARD and LARSON (1974) の報告を参照し，ATCC 12958 (COWAN I 型) 株を用いた。

供試抗血清: 抗血清として自家製の抗 *Aeromonas salmonicida* 家兎血清（抗 Ar-3, ATCC 14174），抗 BKD 家兎血清（抗 OKD-3, Otobe 株）および抗 *Vibrio anguillarum* 家兎血清（抗 V-6, NCMB 6）を，また対照血清として正常家兎血清を供試した。

供試菌: 供試菌としては Table 1 に示す自家製抗血清に対応する 3 菌株の他，23 株の魚病関連菌を加えた 26 株を供試し，後述の方法により抗原を調製して実験に供した。

* 本研究の一部は昭和 55 年度日本水産学会春季大会において発表した。

** 北海道大学水産学部微生物学講座

Table 1. List of the strain employed

Aeromonas salmonicida (Ar-3)	ATCC 14174
Vibrio anguillarum (V-6)	NCMB 6
BKD bacterium strain Otobe (O-1)	
Aeromonas hydrophila	IAM 1018
Aeromonas punctata	IAM 1646
Aeromonas liquefaciens	EFDL
Aeromonas salmonicida	NCMB 1102
Aeromonas salmonicida Nagano (M-8)	
Aeromonas salmonicida Nagano (N-17)	
Aeromonas salmonicida Hokkaido (1M)	
Aeromonas salmonicida Hokkaido (5M)	
Aeromonas salmonicida Wakayama	
Aeromonas salmonoicida Iwate	
Aeromonas salmonicida subsp. *masoucida*	NCMB 2020
Aeromonas pseudosalmonicida No. 1	
Vibrio metschnikovii	IAM 1039
Vibrio tyrogenes	IAM 1080
Vibrio piscium var. *japonics*	TUF
Vibrio anguillarum	NCMB 828
Vibrio anguillarum	NCMB 829
Vibrio anguillarum KAY-2	
BKD bacterium strain Erimo (E-6)	
Escherichia coli O-6	
Pseudomonas fluorescens	EFDL
Micrococcus lysodeikticus	
Bacillus subtilis	NRRL 558

Table 2. List of the fish employed

Sampling		Number of fish employed	Species of fish
Place	Date		
Iwate	Nov. '79	28	coho salmon*[2]
Gifu	Dec. '79	12	amago*[3]
Tokyo	Dec. '79	30	yamabe*[4]
Laboratory*[1]	Mar. '80	10	rainbow trout*[5]

*[1] Artificially infected by intramuscular injection.
*[2] *Oncorhynchus kisutch.*
*[3] *Oncorhynchus rhodurus.*
*[4] *Oncorhynchus masou.*
*[5] *Salmo gairdneri.*

供試魚: Table 2 に示すセッソウ病の発生が推察された飼育群より無作為に抽出したサケ科魚類3種 70 尾および標津川遡上カラフトマス腎臓より分離された *A. salmonicida* No. 561 株（野村・木村, 1981）を筋肉内に 1.2×10^5 cells/尾宛接種し，斃死直前もしくは直後のニジマス (*Salmo gairdneri*) 10 尾を供試した。

安定化 staphylococciの 調製法及び抗血清感作法: Staphylococci の安定化および安定化 staphylococci の抗血清感作法も前報同様 EDWARD and LARSON (1974) の報告に従った。

供試菌抗原の調製法: 供試菌抗原の調製にはまず供試菌を普通寒天培地 (*Vibrio* には NaCl 濃度を 1.5% に増量) に 25°C 48 時間培養後，集菌秤量してその 99 倍量の PBS, pH 7.2 (w/v) を加えた懸濁液を調製し，100 C 30 分間加熱後遠心分離して得られた上澄を加熱抽出抗原，沈殿した菌体の 10% (w/v) PBS 懸濁液を加熱死菌懸濁抗原とした。

供試魚の腎臓および患部抽出抗原の調製法: 供試魚の腎臓および患部抽出抗原の調製は加熱抽出により行った。すなわち腎臓および患部の重量を秤量摩細後，4 倍量あるいは 9 倍量の PBS を加え，100 C で 30 分間加熱後遠心分離（4000 回転，20 分）して得られた上澄液を腎臓あるいは患部加熱抽出抗原とした。

Coagglutination test の実施法: 前述の方法により調製した抗血清感作 staphylococci 懸濁液 0.05 m*l* と供試抗原液 0.05 m*l* を載せガラス上にて混合し湿潤箱に収めて室温で 30 分，60 分間反応させ，coagglutination の有無を肉眼的に観察した。

腎臓および患部からの原因菌分離法: セッソウ病原因菌 *A. salmonicida* の分離には供試魚の腎臓と患部を対象に TSA 培地 (BBL) を用いて行った。すなわち体表を 70% アルコールで消毒後，腎臓からの菌の分離の場合は無菌的に開腹し，滅菌メスにて切り口を入れた腎中央部に白金耳を挿入し，他方患部の場合もメスにて患部を切開して白金耳を挿入し，共に TSA 培地平板に塗抹し，20 C で 5 日間培養した。発生したコロニーについては褐色色素の産生能を確認した後，直接載せガラス板にとり生理的食塩水で懸濁液とし前述の抗 Ar-3 ウサギ血清感作 staphylococci を用いた coagglutination test を実施し *A. salmonicida* の鑑別を行った。

結　果

感作 staphylococci の反応特異性: 抗血清感作 staphylococci の反応特異性について Table 1 に示した魚病関連細菌の加熱死菌懸濁抗原および加熱抽出抗原を用いて coagglutination test を行った結果は Table 3 にみられる如くで，いずれの場合も対応する同種の抗原とのみ反応し明瞭な特異性が観察された。

Coagglutination test によるセッソウ病診断結果: Table 2 に示したセッソウ病の発生が推察されたサケ科

Table 3. Specificity of coagglutination tests using staphylococci sensitized with specific antibodies for each three bacterial pathogens

Bacterial antigen used	Antisera used to sensitize staphylococci							
	Anti *Aeromonas salmonicida* Ar-3		Anti *Vibrio anguillarum* V-6		Anti BKD bacterium O-1		Control[*1]	
	a[*2]	b[*3]	a	b	a	b	a	b
Aeromonas salmonicida ATCC 14174, Ar-3	−[*4]	+	−[*4]	−	−	−		
Vibrio anguillarum NCMB 6, V-6	−		+	−			−	
BKD bacterium strain Otobe, O-1					−	−		−
Aeromonas hydrophila IAM 1018	−	−		−	−			
A. punctata IAM 1646	−	−		−			−	
A. liquefaciens EFDL	−	−	−	−	−	−	−	−
A. salmonicida NCMB 1102	−	+			−	−		−
A. salmonicida Nagano N-8	+	+	−	−			−	
A. salmonicida Nagano N-17	+	−	−		−			−
A. salmonicida Hokkaido 1M	−	+	−	−	−	−	−	
A. salmonic da Hokkaido 5M	−	+	−	−		−		−
A. salmonicida Wakayama	−	+	−	−			−	−
A. salmonicida Iwate	−	+		−	−	−		−
A. salmonicida subsp. *masoucida* NCMB 2020	+	−	−	−	−	−	−	−
A. pseudosalmonicida No. 1			−	−	−			−
Vibrio metschnikovii IAM 1039	−			−				
V. tyrogenes IAM 1080	−	−	−	−	−			−
V. piscium var. *japonics* TUF	−	−	−					−
V. anguillarum NCMB 828	−		+	−				
V. anguillarum NCMB 829		−	+	−				
V. anguillarum KAY-2	−	−	+	−	−	−		
BKD bacterium strain Erimo E-6		−	−		+	−	−	−
Escherichia coli O-6	−		−		−			
Pseudomonas fluorescens EFDL	−	−	−	−			−	
Micrococcus lysodeikticus					−			
Bacillus subtilis NRRL 558		−	−					

*1 Normal rabbit serum.
*2 Heated cell suspension antigen; heated in PBS at 100 C for 30 min, after centrifuging the pellet resuspended in PBS.
*3 Heat extracted antigen by PBS at 100 C for 30 min.
*4 + indicates a positive agglutination reaction, − indicates a negative reaction.

魚類3飼育群，3種70尾および人工感染実験に供されたニジマス10尾について症状の有無による肉眼的診断，腎臓あるいは患部よりの *A. salmonicida* の分離による診断および腎臓あるいは患部の加熱抽出液を抗原とした coagglutination test による診断を試み比較検討を行ったが，その結果は Table 4 に示す如くで，腎臓の加熱抽出液を抗原として用いた coagglutination test による陽性率は原因菌の分離による陽性率を 100 とした場合，いずれの飼育群も 55～79% に留まり，腎臓を用いた場合では原因菌の分離による診断法がより優れた成績を示した。しかし実験感染魚を用い患部加熱油出液を抗原とした場合には全く同等の成績を示した。

考　察

供試した3種の抗血清感作 staphylococci はそれぞれ対応する抗原とのみ反応陽性を示し，明瞭な特異性が認められたことからこの方法が *A. salmonicida* 抗原の検出，すなわちセッフ病診断への応用が可能である

Table 4. Comparison of coagglutination test, clinical signs, and isolation of *A. salmonicida* for diagnosis of furunculosis

Fish specimens	Source of specimens	Date	Number of fish	Number of specimens with positive diagnoses			
				Clinical sign	Isolation of *A. salmonicida*		Coagglutination test*1
					Kidney	Furuncle	Kidney*2	Furuncle*2
Coho salmon*3	Iwate	Nov. '79	28	23	19	—*7	15	—
Amago*4	Gifu	Dec. '79	12	6	11	—	6	—
Yamabe*5	Tokyo	Dec. '79	30	17	28	—	21	—
Rainbow trout*6	Laboratory*7	Mar. '80	10	10	10	10	8	10

*1 Staphylococci sensitized with antiserum against *A. salmonicida* ATCC 14174.
*2 Heat extracted antigen by PBS (1: 9) at 100 C for 30 min.
*3 *Oncorhynchus kisutch.*
*4 *Oncorhynchus rhodurus.*
*5 *Oncorhynchus masou.*
*6 *Salmo gairdneri.*
*7 Artificially infected by intramuscular injection.
*7 — indicates no data.

ことが推察された。そこでヤツウ病の発生が疑われた3飼育群の供試魚および人工感染魚を対象に腎臓あるいは患部からの原因菌の分離および両組織の加熱抽出液を抗原とした coagglutination test を行い，ヤツウ病の診断を試みその結果を比較検討したが，供試魚の腎臓を検査材料とした場合には原因菌の分離による方法がより高い陽性率を示したが，患部を検査材料とした場合は coagglutination test でも同等の成績が得られた。このように腎臓と患部では検出率に若干の差は認められるものの，腎臓の加熱抽出液を用いても群としての診断には充分応用が可能であると考えられる。しかし明らかにヤツウ病の定型的患部が認められる病魚試料では，検査用抗原として患部の加熱抽出液を調製することがより望ましく，この方法により養魚の現場においてわずか1～2時間の短時間でヤツウ病の確実な診断が可能と考えられ，本法の実用性が確認された。

要　約

特異抗感作 staphylococic を用いた coagglutination test による *A. salmonicicda* 抗原の検出，特にヤツウ病診断への応用について検討を行い，次の如き結果を得た。

Coagglutination test に用いた抗血清感作 staphylococci は明瞭な反応特異性を示し，病魚の患部あるいは腎臓の加熱抽出液を検査用抗原として用いることにより，養魚の現場においてヤツウ病の迅速かつ平易な診断が可能となり，BKD の診断同様十分実用に供しうる方法であることが明らかとなった。

謝　辞

本研究の遂行にあたり，ご協力をいただいた北海道大学水産学部微生物学講座，絵面良男博士，田島研一の両氏に深甚なる謝意を表する。また本研究は水産庁の昭和55年度魚病対策技術開発研究委託費および昭和56年度文部省科学研究費補助金の一部によって行われた。ここに記して謝意を表する。

文　献

EDWARD, E. A. and G. L. LARSON (1974): New method of grouping beta hemolytic streptococci directly on sheep blood agar plates by coagglutination of specifically sensitized protein A-containing staphylococci. *Appl. Microbiol.*, **28**, 972–976.

木村喬久・吉水　守 (1981)：特異抗体感作 staphylococci を用いた coagglutination test によるサケ科魚類の細菌性腎臓病 (BKD) の迅速診断法について，日水誌，**47**, 29–39.

野村哲一・木村喬久 (1981)：北海道内の主要河川に遡上するサケ (*Oncorhynchus keta*) カラフトマス (*Oncorhynchus gorbuscha*) サクラマス (*Oncorhynchus masou*) ヒメマス (*Oncorhynchus nerka*) 稚魚における *Aeromonas salmonicida* の保有状況，魚病研究，**16**, 69–74.