



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	病魚患部の加熱抽出液を抗原としたゲル内沈降反応によるサケ科魚類の細菌性腎臓病（BKD）診断について
Author(s)	木村, 喬久; 絵面, 良男; 田島, 研一 他
Citation	魚病研究, 13(2), 103-108
Issue Date	1978-09
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/38601
Type	journal article
File Information	Yoshimizu-8.pdf



病魚患部の加熱抽出液を抗原としたゲル内沈降反応による サケ科魚類の細菌性腎臓病 (BKD) 診断について^{*1}

木村 喬久^{*2}・絵面 良男^{*2}・田島 研一^{*2}・吉水 守^{*3}

(昭和 53 年 6 月 23 日受理)

Serological Diagnosis of Bacterial Kidney Disease of Salmonid (BKD): Immunodiffusion Test by Heat Stable Antigen Extracted from Infected Kidney

Takahisa KIMURA^{*2}, Yoshio EZURA^{*2}, Kenichi TAJIMA^{*2},
and Mamoru YOSHIMIZU^{*3}

^{*2}Laboratory of Microbiology, Fac. Fish., Hokkaido Univ.,
Hakodate, Hokkaido, Japan

^{*3}Dep. Food and Nutrition, Hakodate Junior College,
Hakodate, Hokkaido, Japan

(Received June 23, 1978)

An immunodiffusion test with heat stable antigen extracted from the kidney of infected fish is described as a method of diagnosis of BKD.

Specific precipitin bands were formed within 24 hours when the rabbit anti-serum reacted with the extract of affected parts of the kidney containing heat stable specific BKD antigen.

No precipitin bands were formed with heat extract of the kidney of healthy fish and heat extract of cells of other fish pathogenic bacteria, i. e. *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, etc. From the above findings, it was suggested that the correct diagnosis of BKD could be easily made in distant diagnostic laboratory by the sending of heat treated field specimens.

前報 (木村・粟倉, 1977) において著者らは, 1973 年秋北海道で見出されたわが国における本病の初発例について報告した。その後北海道において計 10 例の本病発生を認めており, 1976 年以降には本州の一部においても本病の発生が散見されるようになってきている (KIMURA & AWAKURA, 1977; 木村, 1978)。

本病は治療のきわめて困難な疾病で (BULLOCK *et al.*, 1971) その対策は今後のわが国におけるサケ科魚類養殖の新たな問題と考えられる。

本病原菌は *Corynebacterium* sp. (以降 KD 菌と略称する) とされているが, 培養のきわめて困難であることからその性状は殆んど明らかにされておらず (木村, 1978), 従来本病の診断は主として病魚試料中の原因菌の顕微鏡観察に頼っていた。しかし KD 菌の大きさや形状

が魚類腎臓などの塗抹標本中によく認められるメラニン顆粒と似ている点 (木村, 1978) や GREY & KILLINGER (1966) により報告されている *Listeria* sp. など他のグラム陽性魚病原菌との鑑別が困難である点などから, 不確実な診断法と言わざるを得ない。

BULLOCK *et al.* (1974) や CHEN *et al.* (1974) はこのような見地から, より確実な本病の診断法として病魚患部ホモゲネートとウサギ抗 KD 菌血清によるゲル内沈降反応について, また BULLOCK & STUCKY (1975) は蛍光抗体法の応用について報告している。

ところで, サケ科魚類のふ化場や養魚場の多くは僻地に位置し, 現場における診断検査の実施には困難を伴う場合が多く, 従って生鮮な検査材料を遠隔の実験室まで運搬しなければならない場合が多い。

著者らは以上の観点から前述の BULLOCK *et al.* (1974) や CHEN *et al.* (1974) のゲル内沈降反応による本病診断法における試料 (抗原) の調製法の改良について検討を加えた結果, 本反応に関与する抗原物質は加熱に対して安

^{*1} 魚病に関する研究—XIII. 昭和 50 年日本水産学会春季大会 (東京) において一部講演発表

^{*2} 北海道大学水産学部微生物学講座

^{*3} 函館短期大学食物栄養学科

定であり現場において簡単な加熱処理をほどこし、ある程度の保存性を付与した検査材料を郵送などにより、設備の整った実験室に送付して本病的な診断が可能であることを明らかにし得たので、ここに報告する。

材料および方法

供試菌株： 北海道・帯広市郊外の一民間養魚場で飼育中のギンマス (*Oncorhynchus kisutch*) に見出された BKD 病魚から、前報 (木村・栗倉, 1977) と同様の方法で分離した KD 菌, Marimo 株を反応抗原の調製ならびに免疫抗原として用いた。なお KD 菌対照株としてはカナダ・ナナイモ水産研究所の EVELYN 博士より 60°C 加熱菌体懸濁液として分与いただいた KD-y (カナダ) 株, KD 菌以外の対照菌株としては Table 2 に示す *Aeromonas hydrophila* IAM 1018 など 6 株の教室保存菌株を用いた。

供試魚： 1974 年 11 月 BKD 発生中の民間養魚場 (帯広市郊外) で採取した 7 尾の淡水飼育ギンマスならびに 3 尾のヒメマス病魚 (*O. nerka*), 同年 12 月北海道立水産孵化場・千歳試験池で BKD 発生中の集団から無作為に採取した 10 尾の淡水飼育カラフトマス (*O. gorbuscha*), および同年同月、小樽市立水族館で海水飼育中のカラフトマスから採取した BKD 病魚 3 尾をそれぞれ供試魚として用いた。なお健康対照魚としては北海道立水産孵化場・森支場で飼育中の 10 尾のヤマメ (*O. masou*) を供試した。

供試抗血清： アメリカ東部魚病研究所から分与を受

けた抗 KD ウサギ血清 3 種 (EFDL-1, 2, 3) ならびに自家製の抗 KD Marimo 株ウサギ血清 (AKD-4) を供試した。なお、自家製の抗血清は前報 (木村・栗倉, 1977) で供試したものと同一のものであり、その調製には 0.1% シスチン加ミューラーヒントン培地で 15°C 2 週間培養した前述の KD Marimo 株の懸濁液 (OD 550_{mμ} 1.5) を 100°C, 10 分間加熱した死菌懸濁液を 4~5 日間隔で 4 回、計 5 ml をウサギ耳静脈内に接種し、その 9 日後に同濃度の生菌懸濁液 2.5 ml を追加接種、最終接種から 7 日後に採血して KD 抗血清を得た。また、陰性対照として、抗原接種前のウサギ正常血清を供試した。

なお、これらの抗血清の KD Marimo 株生菌懸濁液抗原に対する凝集価は EFDL-2 が 1:10240, 他の 3 血清は 1:5120 であり、加熱死菌懸濁液抗原に対しては若干低く EFDL-1 で 1:640, 他の 3 血清では 1:1280 であった。なおその特異性についてはあらかじめ確認したものである。

反応抗原： ゲル内沈降反応用抗原として Fig. 1 に示すような方法で、培養 KD 菌懸濁液、その加熱抽出液、および供試魚腎臓のホモゲネート、その冷抽出液、ならびにその加熱抽出液を調製して供試した。なお陽性対照としては KD-y (カナダ) 株の加熱死菌懸濁液、陰性対照としては前述の 6 対照菌株の生菌懸濁液ならびに加熱抽出液を抗原として供試した。

ゲル内沈降反応の方法： 常法の (松橋, 1961) 微量オクテルロニイ法により実施し、25°C, 24~48 時間の反応後に結果を専用の暗視野光源上で肉眼的に観察判定し、

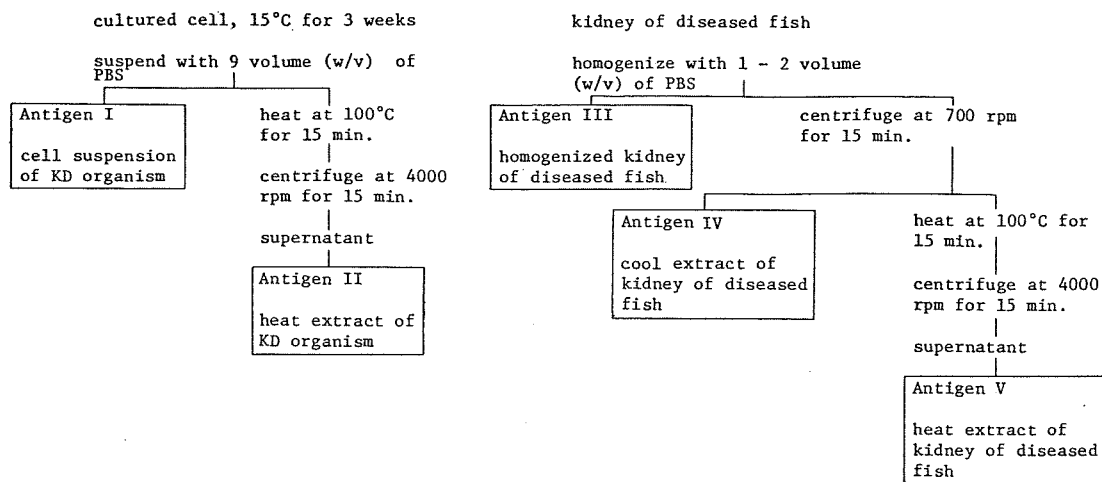


Fig. 1. Preparation of various BKD antigens for immunodiffusion test.

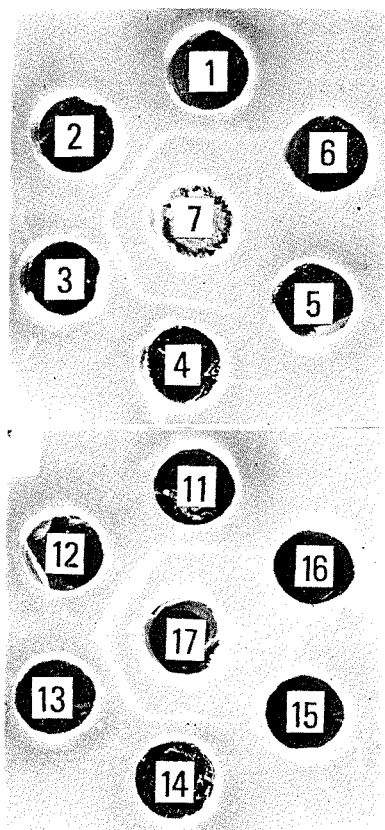


Fig. 2. Precipitin bands formed between cell suspension of BKD organism (well 7) or heat extract of BKD organism (well 17) and rabbit anti-BKD sera AKD-4 (well 1 and 11), EFDL-1 (well 2 and 12), EFDL-2 (well 3 and 13), or EFDL-3 (well 4 and 14). Normal rabbit serum (well 5 and 15) failed to react. See Table 1 and Fig. 1.

また必要に応じ写真撮影により記録した。

結果および考察

調製方法の異なる KD 菌抗原と供試抗血清とのゲル内沈降反応: 前述の方法で調製した KD 菌 Marimo 株の生菌懸濁液抗原ならびに加熱抽出液抗原と供試 4 抗血清とのゲル内沈降反応の結果は Fig. 2 に示すごとくである。両抗原はいずれも自家製の AKD-4 血清ならびに東部魚病研究所より分与の 3 抗血清に対して明瞭な 1 本の沈降線を形成し、沈降線はいずれも完全に連結した。次に Fig. 3 に病魚患部ホモゲネート、その冷抽出液、ならびにその加熱抽出液の 3 抗原と EFDL-1 抗血清と

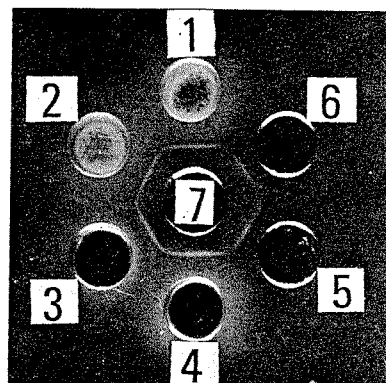


Fig. 3. Precipitin bands formed between rabbit anti-BKD serum EFDL-1 (well 7) and homogenized kidney (well 1 and 2), cool extract of kidney (well 3 and 4), or heat extract of kidney (well 5 and 6) of diseased fish. See Table 1 and Fig. 1.

の反応の結果を示す。この場合にも抗原はいずれも明瞭な 1 本の沈降線を形成した。

以上のようにして調製方法の異なる 5 抗原と 4 供試血清、ならびに対照の KD-y (カナダ) 株抗原、および対照正常ウサギ血清など相互の反応結果をまとめると Table 1 に示すごとくである。抗原接種前の正常ウサギ血清では当然のことながら、いずれの抗原とも反応は陰性であり、供試 4 抗血清ではいずれの方法で調製した抗原とも陽性の結果を示した。またこれらの抗血清はいずれも陽性対照の KD-y (カナダ) 株の 60°C、15 分間加熱菌懸濁液抗原に対しても反応陽性を示した。すなわち、BULLOCK *et al.* (1974) や CHEN *et al.* (1974) が報告した KD 菌生菌懸濁液や病魚患部ホモゲネート抗原では勿論、それらの加熱抽出液抗原でもゲル内沈降反応が可能である。換言すると、本反応に関与する KD 菌の抗原物質は加熱に対して安定であり、容易に PBS により加熱抽出が可能であることが明らかとなった。

加熱抽出 KD 菌抗原によるゲル内沈降反応の特異性: 次いで本反応の特異性を検討するために Table 2 に示す 6 株の対照菌の生菌懸濁液ならびに加熱抽出液抗原と供試抗血清 AKD-4 ならびに EFDL-1 とのゲル内沈降反応を試みた。その結果は Table 2 にみられるごとく、KD 菌抗原を除く他の 6 対照菌抗原ではいずれも反応陰性で、この反応の特異性が確認された。

病魚症状の肉眼的診断および病魚患部塗抹標本のグラム染色による診断結果と病魚患部の加熱抽出抗原による

Table 1. Precipitin band formation in immunodiffusion test by various BKD antigens (see Fig. 1) with anti-BKD sera

Antigen	Control serum	Anti-serum			
		AKD-4* ¹	EFDL-1* ²	EFDL-2* ²	EFDL-3* ²
Cell suspension of KD Marimo strain	—	+	+	+	+
Heat extract of KD Marimo strain	—	+	+	+	+
Homogenized kidney of diseased fish	—	+	+	+	+
Cool extract of kidney of diseased fish	—	+	+	+	+
Heat extract of kidney of diseased fish	—	+	+	+	+
Heated cell suspension of KD-y (Canada) strain* ³	—	+	+	+	+

*¹ Anti-BKD strain Marimo.

*² Anti-BKD provided by Dr. BULLOCK of EFDL U.S.A.

*³ Heated at 60°C for 15 min., provided by Dr. EVELYN of FRB Canada.

Table 2. Specificity of immunodiffusion test between BKD heat extracted antigen and anti-BKD sera

Antigen		Anti-serum	
Preparation	Organisms tested	AKD-4* ¹	EFDL-1* ²
Cell suspension	<i>Aeromonas hydrophila</i> IAM 1018	—	—
	<i>A. punctata</i> ATCC 11163	—	—
	<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	—	—
	<i>Vibrio anguillarum</i> NCMB 6	—	—
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> EFDL	—	—
	<i>Micrococcus lysodeikticus</i> WV	—	—
	KD Marimo strain	+	+
Heat extract of cell	<i>A. hydrophila</i> IAM 1018	—	—
	<i>A. punctata</i> ATCC 11163	—	—
	<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	—	—
	<i>V. anguillarum</i> NCMB 6	—	—
	<i>P. fluorescens</i> EFDL	—	—
	<i>M. lysodeikticus</i> WV	—	—
	KD Marimo strain	+	+

*¹ Anti-BKD Marimo strain.

*² Anti-BKD provided by Dr. BULLOCK of EFDL U.S.A.

ゲル内沈降反応の結果の比較: 以上の実験結果から病魚患部の加熱抽出抗原と抗血清を用いるゲル内沈降反応による BKD 診断の可能性が示唆されたので、次いで BKD 発生中の 4 養魚施設で採取した前述の供試魚について、肉眼的症状の有無ならびに従来の患部塗抹標本のグラム染色による診断結果と本方法による診断結果の比較検討を行い Table 3 に示すような結果を得た。すなわち、これら方法による診断結果は良く一致し、特に前 2 者の診断法では判定の不明瞭な試料についても、ゲル内

沈降反応では特異的抗原の存在を明確に認めることが出来た。一方、対照の健康なヤマベ試料はいずれも陰性の結果を示し、KD 菌抗原の存在しないこれら健康魚の腎臓加熱抽出液中には本抗血清と交叉反応を示すような非特異的抗原は存在しないことが確認された。

以上の結果から、BKD の診断には病魚患部の加熱抽出液を抗原とするゲル内沈降反応の応用が可能であり、BULLOCK *et al.* (1974) や CHEN *et al.* (1974) の報告にあるような新鮮な病魚のホモゲネートは必要とせず、従

Table 3. Comparison of immunodiffusion test by heat extracted antigen, clinical sign and gram stain for detection of BKD in salmon kidney

Specimen	Fish No.	Precipitin test	Clinical sign	Gram stain
Coho salmon* ¹ (<i>Oncorhynchus kisutchi</i>) reared in fresh water	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	+
	4	+	+	+
	5	+	+	+
	6	+	+	+
	7	+	+	+
Kokanee salmon* ¹ (<i>O. nerka</i>)	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	+
Pink salmon* ² (<i>O. gorbuscha</i>) reared in fresh water	1	+	±	+
	2	—	—	—
	3	—	—	—
	4	—	—	—
	5	—	—	—
	6	—	—	—
	7	—	—	—
	8	—	—	—
	9	—	—	—
	10	—	—	—
Pink salmon* ³ reared in sea water	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	±	+
Yamabe* ⁴ (<i>O. masou</i>) healthy population as control	1	—	—	—
	2	—	—	—
	3	—	—	—
	4	—	—	—
	5	—	—	—
	6	—	—	—
	7	—	—	—
	8	—	—	—
	9	—	—	—
	10	—	—	—

*¹ Sampled in a commercial fish farm at the suburb of Obihiro, Hokkaido, Nov. 1974.

*² Sampled in Chitose Branch of Hokkaido Fish Hatchery, Dec. 1974.

*³ Sampled in Otaru Aquarium, Hokkaido, Dec. 1974.

*⁴ Sampled in Mori Branch of Hokkaido Fish Hatchery, June 1975.

って遠隔の養魚場で BKD が発生した場合でも、現場において病魚患部を加熱処理して、ある程度の保存性を付与した試料を常温下で郵送などにより設備の整った実験室に送付し的確な診断が可能であることが明らかとなった。

抗原濃度の検討: 以上のように病魚患部加熱抽出液抗原とウサギ抗血清との間のゲル内沈降反応による BKD の診断が可能であることが明らかとなったが、ゲル内沈降反応には比較的高い濃度の抗原を必要とすることが知

られている。そこで本法による BKD 診断にどの程度の抗原濃度が必要であるかを知るために若干の検討を行い Table 4 に示すとき結果を得た。KD 菌 Marimo 株培養菌体の湿重量に対して 1:10~1:320 の割合に稀釈した加熱抽出抗原との反応では、1:80 まで明らかに沈降線の形成が認められ、それ以上の稀釈では陰性となった。また同様の実験を定型的症状を呈した病魚腎臓患部の加熱抽出液で検討した結果も同表に示すごとくで、この場合には腎臓患部の湿重量の 1:18 の割合の稀釈抗原液ま

Table 4. Minimal antigen dilution for positive reaction in immunodiffusion test of BKD

Antigen ^{*1}	Antigen dilution (w/v)	Precipitin band
Heat extract of typically affected kidney	1: 2	+
	1: 6	+
	1: 18	+
	1: 64	—
	1: 162	—
	1: 324	—
Heat extract of KD organism	1: 10	+
	1: 20	+
	1: 40	+
	1: 80	+
	1: 160	—
	1: 320	—

^{*1} See Fig. 1.

では明らかに陽性の結果が得られたが、それ以上に稀釈された抗原液では陰性となった。以上の検討結果からやはり本方法には比較的高濃度の抗原液が必要であり、この方法による病魚の診断を実施する場合には可及的高濃度の患部抽出液を調製することが必要であり病魚患部(主として腎臓)を2~3倍量のPBSで加熱抽出するのが適当と考えられる。また感染初期の病魚や保菌魚などの検出には本方法の利用が困難であることが推察された。

要 約

サケ科魚類の細菌性腎臓病(BKD)の血清学的診断法の一つとして、病魚患部の加熱抽出抗原とウサギ抗血清とのゲル内沈降反応の応用の可能性について検討して、次のような結果を得た。

1. ゲル内沈降反応に関与するKD菌抗原は加熱に対して安定であり、BKDの診断に病魚患部の加熱抽出液を抗原とするゲル内沈降反応の応用が可能である。

2. 本方法の応用により遠隔の養魚場におけるBKDの発生についても、現場で加熱処理をしてある程度の保存性を付与した病魚患部試料の郵送などにより的確な診断が可能である。

3. 本方法に供する抗原液は可及的高い濃度に調製する必要がある、従って感染初期の病魚や保菌魚の検出への利用は困難と考えられる。

謝 辞

貴重なるウサギ抗血清の分与をいただいた米国東部魚病研究所 K. WOLF 博士ならびに G. L. BULLOCK 博士、貴重なる対照菌 KD-y (カナダ) 株加熱死菌懸濁液の分与をいただいたカナダ国立水産研究所ナナイモ支所 T. P. T. EVELYN 博士、供試魚の採集に御協力をいただいた北海道立水産孵化場栗倉輝彦博士の各位に深甚なる謝意を表します。

文 献

- BULLOCK, G. L., D. A. CONROY and S. F. SNIESZKO (1971): Corynebacterial diseases. in "Book 2A; Bacterial Disease of Fish" (SNIESZKO S.F. and H. A. AXELROD ed.), 94-104, T. F. H. Publication Inc., Neptune N. J.
- BULLOCK, G. L. and H. M. STUCKEY (1975): Fluorescent antibody identification and detection of the Corynebacterium causing kidney disease of salmonids. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **32**, 2224-2227.
- BULLOCK, G. L., H. M. STUCKEY and P. K. CHEN (1974): Corynebacterial kidney disease of salmonids: Growth and serological studies on the causative bacterium. *Appl. Microbiol.*, **28**, 811-814.
- CHEN, P. K., G. L. BULLOCK, H. M. STUCKEY and A. C. BULLOCK (1974): Serological diagnosis of corynebacterial kidney disease of salmonids. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **31**, 1939-1940.
- 木村喬久 (1978): サケ科魚類の細菌性腎臓病. 魚病研究, **13**, 43-52.
- 木村喬久・栗倉輝彦 (1977): わが国で初めて見出された養殖サケ科魚類の細菌性腎臓病 (Bacterial Kidney Disease) について. 日水誌, **43**, 143-150.
- KIMURA, T. and T. AWAKURA (1977): Current status of disease of cultured salmonids in Hokkaido, Japan. *Proc. Int. Symp. on Diseases of Cultured Salmonids*, 124-160, Tavolek, Ink., Redmond, Wa.
- 松橋 直 (1961): 寒天内沈降反応. 臨床検査, **5**, 275-280.