



Title	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
Author(s)	木村, 喬久; 吉水, 守
Citation	日本水産学会誌, 47(9), 1173-1183 https://doi.org/10.2331/suisan.47.1173
Issue Date	1981-09
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/38612
Rights	© 1981 公益社団法人日本水産学会
Type	journal article
File Information	yoshimizu-22.pdf



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

木 村 喬 久・吉 水 守

(1981 年 4 月 27 日受理)

Rapid Method for Detection of Bacterial Kidney Disease of Salmonid (BKD) by Coagglutination of Antibody Sensitized Protein A-Containing Staphylococci^{*1}

Takahisa KIMURA^{*2} and Mamoru YOSHIMIZU^{*2}

The application of a coagglutination test using staphylococci specifically sensitized with antibody against the bacterium causing bacterial kidney disease to the diagnosis of this disease in salmonids was studied. This method proved to be a simple, rapid and reliable diagnostic test suitable for use in the laboratory or field, and requires no special apparatus. It was found to be highly specific and more sensitive than the immunodiffusion test. In a study of 758 fish from 24 farms suspected in outbreaks of bacterial kidney disease the rate of detection of the disease with the coagglutination test was as high or higher than the rates obtained by Gram staining or clinical examination.

The procedure of this method is summarized as follows:

- 1) Kidney sample from diseased fish is homogenized with four to nine volumes of PBS, and heated in a boiling water bath 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 anti-BKD antibody sensitized staphylococci suspension are mixed on a glass slide and incubated at room temperature. The slide is examined after 30, 60 and 120 min.
- 4) If positive coagglutination is observed, the infected fish should be examined microscopically to confirm the diagnostic results.

サケ科魚類の細菌性腎臓病 (BKD) は古く 1930 年代にスコットランドにおいて Dec Disease とも呼ばれ、ほぼ時を同じくして、米国においても発見された。^{1,2)}

本病は慢性的な全身感染症で、他の細菌性疾病やウイルス性疾病にみられるような劇的な養殖魚の斃死はみられないが、長期間にわたって斃死が継続し、終局的には大多数の養殖魚を失う結果となることや、一旦本病が発生すると治療がきわめて困難であり、その完全な駆逐も難しいことから、サケ科魚類の難病の一つと考えられている。³⁾ その後カナダや最近ではフランスにおいても本病の発生が報告されている。⁴⁻⁶⁾ 従来わが国には本病の発生例が全く知られていなかったが、1973 年北海道において著者らにより初めてその発生が発見され、²⁾ その後現在までに北海道において計 10 例の発生が明らかにされている。¹⁰⁾ また 1976 年頃から本州の一部にも本病

の発生が見出されるようになり、にわかに各方面の注目をあびるようになってきた。

本病の原因菌は微小な ($0.3 \sim 0.5 \mu \times 0.5 \sim 1.0 \mu$) 非運動性のグラム陽性桿菌で、多くの場合双桿状を呈し、本菌培養のため開発されたオーダルの培地¹¹⁾を用いても、 $15 \sim 18^\circ\text{C}$ で約 2~3 週間も培養を続けなければ肉眼的に発育を認めることができない。

このように本病原菌の培養がきわめて困難である現時点においては、本病診断に際し現場における原因菌の分離確認は事実上不可能に近いと考えられ、従来、原因菌の存在の確認は病魚材料の直接塗抹標本のグラム染色に頼らざるを得なかった。しかし腎臓や肝臓から塗抹標本を作成して観察すると、時にきわめて多数のメラニン色素顆粒が混在し、その大きさが本病原菌とよく似ていることから両者をグラム染色標本上で見分けるために

^{*1} 本研究の一部は昭和 54 年 10 月、日本水産学会秋季大会において発表した。

^{*2} 北海道大学水産学部微生物学講座 (Lab. Microbiol., Fac. Fish., Hokkaido Univ., Minato-3, Hakodate 041, Japan)

はかなりの熟練を要し、また他種のグラム陽性菌との鑑別も不可能である。

そのようなことから本病の迅速な診断を目的とする種々の検討がなされ、病魚患部組織ホモゲナイズ液や、病魚患部加熱抽出液を抗原とするゲル内沈降反応や蛍光抗体法などの報告がみられる。¹²⁻¹⁶⁾ 最近 *Staphylococcus aureus* のある種の株 (COWAN I 型) の細胞含有特異蛋白 protein A が抗体蛋白 IgG の Fab 部分すなわち反応特異部分を遊離のまま Fc 部分を非特異的に吸着する現象が明らかにされ、この現象を応用した一種の逆受身凝集反応である coagglutination test (共同凝集試験) が肺炎双球菌や溶血性 streptococci の血清型別、*Salmonella* および *Shigella* の鑑別、さらに *Neisseria gonorrhoeae* や *Haemophilus influenzae* 感染症の迅速診断に応用する試みが散見されるようになってきた。¹⁶⁻²⁰⁾

本報ではこの coagglutination test の魚病、特に BKD 診断への応用についての検討を行い BKD の簡易かつ迅速な診断法の一つとして充分実用に供し得る方法を確立し得たので報告する。

実験方法

供試 *Staphylococcus aureus* Protein A 含有 *Staphylococcus aureus* として、EDWARD and LARSON の報告¹⁷⁾ を参照し、ATCC 12598 (COWAN I 型) 株を供試した。

供試抗血清 自家製および EFDL (米国東部魚病研究所) から分与を受けた抗 BKD ウサギ血清 (抗 AKD-3, 抗 OKD-3, 抗 EFDL-I, 抗 EFDL-2), 自家製の抗 *A. salmonicida* ウサギ血清 (抗 Ar-3) ならびに抗 *V.*

anguillarum ウサギ血清 (抗 KAY-2) を、また対照血清としては正常ウサギ血清を供試した。

供試菌 供試菌としては自家製抗血清に対応する 4 菌株の他、魚病関連菌の中から 14 菌株を選出して Table 1 に示す 18 菌株を供試し、後述の方法により抗原を調製して実験に供した。

供試魚 Table 2 に示す BKD 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 7 種 758 尾および対照として北海道立水産孵化場森支場にて飼育中の健康なヤマメ 17 尾を実験に供した。なお一部の供試魚は実験に供するまで -20°C に保存の後供試し、また一部は著者らの指示により現地で後に述べる方法により病魚腎臓の加熱抽出抗原を調製の後送付されたものを供試した。

安定化 staphylococci の調製法 安定化 staphylococci の調製法は EDWARD and LARSON の報告¹⁷⁾ に従って行つた。すなわち *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 株をトリプティカースツイブローで 1 夜 (18~24 hr) 培養後、集菌 (4000 rpm, 20 min) した菌体を、PBS で 5 回洗浄して 0.5% ホルムアルデヒド (in PBS) に懸濁し、25°C で 3 時間静置、次いで PBS で再度 5 回洗浄後、PBS で 10% (v/v) となるように懸濁液を調製し、80°C で 1 時間加熱処理後、PBS でさらに 3 回洗浄、最後に PBS で 10% (v/v) となるよう再懸濁し安定化 staphylococci を得た。

抗血清感作 staphylococci の調製法 上記の安定化 staphylococci 懸濁液 1.0 ml に抗血清 0.1 ml を加え、よく混合した後 25°C で 3 時間反応させた。この間 30 分毎に手で静かに振盪、次いで低温遠心分離 (5°C, 4000 rpm, 60 min) を行い上澄を捨て、沈澱を PBS で 0.5% (v/v) となるよう再懸濁し、感作 staphylococci 懸濁液を得た。

供試菌抗原の調製法 供試菌抗原の調製法は Fig. 1 に示す如くで、供試菌 18 株を Table 3 に示す組成の培地に 25°C 48 時間および BKD 原因菌については Table 4

Table 1. List of the strain employed

<i>Aeromonas hydrophila</i>	IAM	1018
<i>Aeromonas punctata</i>	IAM	1646
<i>Aeromonas liquefaciens</i>	EFDL	
<i>Aeromonas salmonicida</i> (Ar-3)*	ATCC	14174
<i>Aeromonas salmonicida</i>	NCMB	833
<i>Vibrio metschnikovii</i>	IAM	1039
<i>Vibrio tyrogenes</i>	IAM	1080
<i>Vibrio piscium</i> var. <i>japonicus</i>	TUF	
<i>Vibrio anguillarum</i>	NCMB	6
<i>Vibrio anguillarum</i>	NCMB	828
<i>Vibrio anguillarum</i>	NCMB	809
<i>Vibrio anguillarum</i> (KAY-2)*		
BKD bacterium strain Otobe (O-1)*		
BKD bacterium strain Erimo		
<i>Escherichia coli</i> O-6		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	EFDL	
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>	NRRL	558

* These were used as antigens for antiserum preparation.

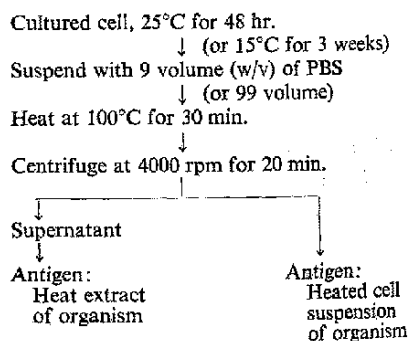


Fig. 1. Preparation of antigens.

Table 2. List of the fish employed

Sampling			Number of fish		Species of fish	
Place	Date	Employed	Fish No.			
Chitose	Hokkaido	1977	22	1- 22	kokanee	salmon* ¹
Erimo	Hokkaido	1977	7	23- 29	chinook	salmon* ²
Takamatsu	Kagawa	1977	5	30- 34	coho	salmon* ³
Furubira	Hokkaido	1977	20	35- 54	rainbow	trout**
Sarabetsu	Hokkaido	1977	9	55- 63	kokanee	salmon
Otobe	Hokkaido	1977	21	64- 84	masu	salmon* ⁵
Fujinomiya	Shizuoka	Aug. '77	20	85-104	coho	salmon
Nakagawa	Tochigi	Aug. '77	7	105-111	coho	salmon
Koide	Niigata	Dec. '77	5	112-116	coho	salmon
Maebashi	Gunma	Oct. '78	2	117-118	coho	salmon
Fuji	Shizuoka	Jan. '79	10	119-128	rainbow	trout
Fuji	Shizuoka	May '79	21	129-149	amago	* ⁶
Koide	Niigata	June '79	5	150-154	coho	salmon
Otobe	Hokkaido	June '79	22	155-176	masu	salmon
Miyako-M	Iwate	June '79	36	177-212	coho	salmon
Otuti	Iwate	July '79	5	213-217	coho	salmon
Hamanaka	Hokkaido	Aug. '79	15	218-232	choo	salmon
Otobe	Hokkaido	Sep. '79	10	233-242	masu	salmon
Koide	Niigata	Oct. '79	153	243-395	coho	salmon
Fujinomiya	Shizuoka	Oct. '79	66	396-461	coho	salmon
Otobe	Hokkaido	Dec. '79	38	462-499	masu	salmon
Kaida	Nagano	Dec. '79	3	500-502	coho	salmon
Otuti	Iwate	May '80	5	503-507	coho	salmon
Koide	Niigata	May '80	5	508-512	masu	salmon
Kukizaki	Ibaragi	June '80	20	513-532	coho	salmon
Mori	Hokkaido	June '80	22	533-554	masu	salmon
Koide	Niigata	June '80	43	555-597	masu	salmon
Urasa	Niigata	June '80	24	598-621	masu	salmon
Shikishima	Yamanashi	June '80	10	622-632	kokanee	salmon
Hamanaka	Hokkaido	July '80	26	632-657	coho	salmon
Otuti	Iwate	July '80	5	658-662	coho	salmon
Namerikawa	Toyama	July '80	2	663-664	coho	salmon
Hamanaka	Hokkaido	Aug. '80	15	665-679	coho	salmon
Otobe	Hokkaido	Sep. '80	7	680-686	masu	salmon
Miyako	Iwate	Oct. '80	5	687-691	coho	salmon
Matsumoto	Iwate	Oct. '80	47	692-738	chum	salmon* ⁷
Nikko	Tochigi	Oct. '80	3	739-741	coho	salmon
Shakotan	Hokkaido	Nov. '80	6	742-747	masu	salmon
Nikko	Tochigi	Dec. '80	11	748-758	coho	salmon
Mori	Hokkaido	1977	17	759-776	masu	salmon

*¹ *Oncorhynchus nerka*.*² *O. tshawytscha*.*³ *O. kisutch*.*⁴ *Salmo gairdneri*.*⁵ *O. masou*.*⁶ *O. rhodurus*.*⁷ *O. keta*.

Table 3. Composition of the medium used

Proteose peptone No. 3	10.0 g
Beef extract	3.0 g
NaCl	5.0 g
(NaCl for <i>Vibrio</i>)	(15.0 g)
Agar	15.0 g
Distilled water	1000 ml
Adjusted to pH	7.5

Table 4. Composition of the modified MULLER-HINTON agar used for BKD organism

Beef, Infusion from	300 g
Casamino acids	17.5 g
Starch	1.5 g
Agar	17.0 g
Cystein-HCl	1.0 g
Fetal bovine serum	200 ml
Distilled water	800 ml
Adjusted to pH	6.8- 7.0

に示した改変ミューラーヒントン培地を用いて 15°C 3 週間培養後集菌秤量し、その 9 倍量の PBS (w/v) を加えた懸濁液を調製し、100°C、30 分加熱後、遠心分離して得られた上澄を加熱抽出抗原、沈澱した菌体の 10% (w/v) PBS 懸濁液を加熱死菌懸濁抗原とした。

供試魚の腎臓抽出抗原の調製法 供試魚の腎臓抽出抗原 (病魚の場合には BKD 菌抗原を含むと推定される) の調製は加熱抽出により行った。すなわち腎臓の重量を秤量、磨砕後、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 rpm, 20 min) し得られた上澄液を腎臓抽出抗原とした。

安定化 staphylococci の抗体吸着能の測定 前述の安定化 staphylococci 懸濁液 1.0 ml に抗血清として抗 BKD bacterium strain Otobe (抗 OKD-3)、抗 *A. salmonicida* (抗 Ar-3) および抗 *V. anguillarum* (抗 KAY-2) ウサギ血清を、また対照として正常ウサギ血清を加え前記の方法で 25°C 3 時間感作させた後、遠心分離して得られたそれぞれの上澄液の残存凝集素を対応する菌株の加熱死菌懸濁抗原を用いて常法により凝集素価を測定し、感作前の凝集素価との比率から安定化 staphylococci の抗体吸着能を観察した。

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 ml と供試抗原液 0.05 ml を載せガラス上にて混合し、湿潤箱に収め室温で 30 分、60 分、120 分間反応させ、coagglutination の有無を肉眼および低倍顕微鏡 (×10) にて観察した。なおこの操作の手順は Fig. 2 に示した。

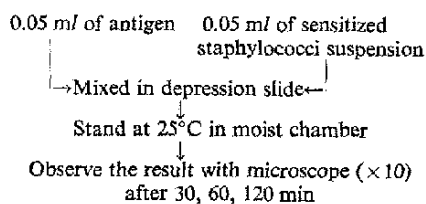


Fig. 2. Flow chart outline the coagglutination test.

ゲル内沈降反応法 ゲル内沈降反応は常法のマイクロクダロー法によった。すなわち 1.5% 寒天 PBS 溶液をスライドガラス上に約 1 mm の厚さに固め、パンチャーでパンチして開けた 7 孔のうち周囲に抗原、中央に抗血清を等量ずつ満たし、湿潤箱に収め 25°C で 1 夜反応させた後、斜め下方より光線をあて、沈降線の有無とその形を観察した。

結 果

安定化 staphylococci の抗体吸着能 前述の方法で調製した安定化 staphylococci の抗体吸着能を抗 BKD strain Otobe (抗 OKD-3)、抗 *A. salmonicida* (抗 Ar-3) および抗 *V. anguillarum* (抗 KAY-2) ウサギ血清について観察した結果は Table 5 に示す如くで、供試した抗 BKD 血清、抗 *A. salmonicida* 血清および抗 *V. anguillarum* 血清共に安定化 staphylococci 懸濁液との反応で、抗 BKD 血清および抗 *A. salmonicida* 血清では 96.9~98.4% また抗 *V. anguillarum* 血清では 75.0% 以上の凝集素価が減少し、前述の方法で安定化した staphylococci は明らかに非特異的に抗体を吸着する能力を有することが観察された。

5 種の感作 staphylococci による交叉 coagglutination test 抗血清として抗 BKD (抗 AKD-3、抗 OKD-3、抗 EFDL-2)、抗 *A. salmonicida* および抗 *V. anguillarum* ウサギ血清を、対照として正常ウサギ血清を用いて感作した staphylococci とそれぞれ対応する菌株の加熱抽出抗原および加熱死菌懸濁抗原を用いた交叉 coagglutination test の結果は Table 6 ならびに Fig. 3~Fig. 6 に示すとおりで、加熱死菌懸濁抗原の場合は生成凝集物粒子が一般に大きく、反応も速やかであり、加熱抽出抗原では粒子が小さく反応にも比較的長い時間を要する傾向がみられたが、充分確認し得る凝集物の生成が認められ、それぞれの抗血清で感作した staphylococci は対応する抗原とのみ特異的に反応した。勿論正常血清で感作した場合はすべて陰性の結果を示した。

感作 staphylococci の反応特異性 これらの感作 sta-

Table 5. Antibody binding ability of stabilized staphylococci

Antiserum	Agglutinin titer of antiserum before and after absorption with staphylococci		Percent of antibody bound
	Before	After	
Anti- <i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 14174	25,600	400	98.4
Anti-BKD bacterium* strain Otobe (O-1)	1,600	50	96.9
Anti- <i>Vibrio anguillarum</i> strain KAY-2	400	100	75.0

* Kidney disease bacterium; *Renibacterium salmoninarum*.

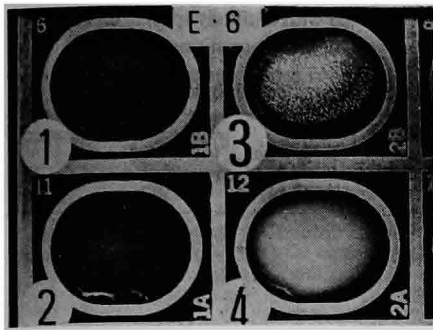


Fig. 3. Coagglutination reaction patterns obtained with heated cell suspension of BKD bacterium strain Erimo, using a staphylococcal suspension coupled with anti-BKD serum, AKD-3 (3). The same cell suspension did not agglutinate with normal rabbit serum binded staphylococci (4), and neither staphylococcal suspension agglutinated with PBS (1,2).

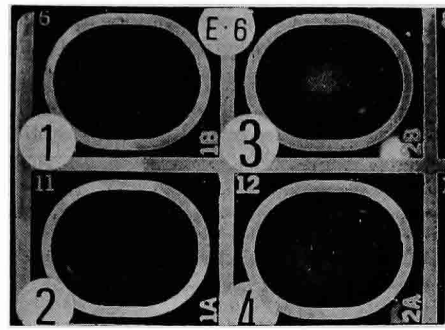


Fig. 4. Coagglutination reaction patterns obtained with heat extracted antigen of BKD bacterium strain Erimo, using a staphylococcal suspension coupled with anti-BKD serum, AKD-3 (3). The same extracted antigen did not agglutinate with normal rabbit serum binded staphylococci (4), and neither staphylococcal suspension agglutinated with PBS (1,2).

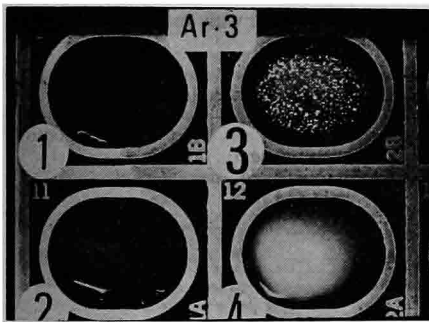


Fig. 5. Coagglutination reaction patterns obtained with heated cell suspension of *Aeromonas salmonicida* ATCC 14174 (Ar-3), using a staphylococcal suspension coupled with anti-*A. salmonicida* ATCC 14174 serum (3). The same cell suspension did not agglutinate with normal rabbit serum binded staphylococci (4), and neither staphylococcal suspension agglutinated with PBS (1, 2).

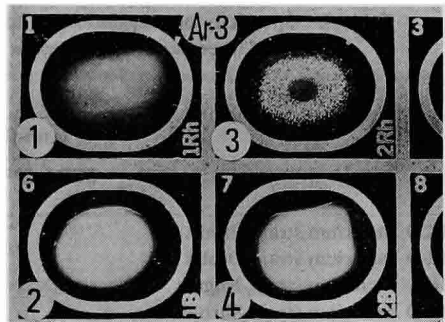


Fig. 6. Coagglutination reaction patterns obtained with heat extracted antigen of *Aeromonas salmonicida* ATCC 14174 (Ar-3), using a staphylococcal suspension coupled with anti-*A. salmonicida* ATCC 14174 serum (3). The same extracted antigen did not agglutinate with normal rabbit serum binded staphylococci (4), and neither staphylococcal suspension agglutinated with PBS (1, 2).

phylococci の反応特異性について、さらに Table 1 に示した供試菌の加熱抽出抗原を用いて coagglutination test を行つた結果は Table 7 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、coagglutination test が魚病診断に応用可能なことが推察された。

抗原濃度と反応時間の関係 Table 2 に示した供試魚の中から千歳試験池において飼育中のヒメマス BKD 病魚 (No. 19)、襟裳支場にて飼育中のマスノスケ BKD 病魚 (No. 29) および対照として森支場にて飼育中の正常ヤマベ 17 尾 (No. 756~773) について腎臓の加熱抽

出抗原を調製し、その倍々希釈試料すなわち濃度を種々に変えた抗原と抗 BKD 感作 staphylococci との反応時間の関係を観察した結果は Table 8 に示す如くで、いずれも抗原濃度が高い場合には 30 分間の反応で明瞭な coagglutination が認められた。抗原濃度が低下するにつれ、陽性結果を得るまでの時間が長びく傾向が観察されたが、供試した病魚試料の場合は反応時間を 2 時間まで延長すると病魚腎臓の $5 \times 2^8 \sim 2^8$ 倍希釈までの抗原液でも明らかに陽性の結果が認められた。また対照として全く正常と考えられた森支場のヤマベ 17 尾の腎臓加熱抽出液を供試したが、いずれの場合も陰性の結果を示

Table 6. Cross coagglutination tests using staphylococci sensitized with antibody specific for each of three bacterial pathogens and antigens prepared from cells of these organisms

Bacterial antigen used* ¹ as heat treated cell suspension	Antisera used to sensitize staphylococci					Control* ⁵
	Anti-BKD bacterium			Anti- <i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 14174	Anti- <i>Vibrio anguillarum</i> KAY-2	
	EFDL-2* ²	AKD-3* ³	OKD-3* ⁴			
BKD bacterium strain Otobe	+* ⁶	+	+	—* ⁶	—	—
BKD bacterium strain Erimo	+	+	+	—	—	—
<i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 14174	—	—	—	+	—	—
<i>Vibrio anguillarum</i> strain KAY-2	—	—	—	—	+	—

*¹ Heated in PBS at 100°C for 30 min. After centrifuging the pellet resuspended in PBS was the cell suspension antigen. Supernatant fluid was the heat extract antigen. All test were conducted with each type of antigen and results were identical in each case.

*² Antiserum provided by National Fisheries Center, Lcetown W. Va, U.S.A.

*³ Antiserum against strain Marimo.

*⁴ Antiserum against strain Otobe.

*⁵ Normal rabbit serum.

*⁶ + indicates a positive agglutination reaction; — indicates a negative reaction.

Table 7. Specificity of coagglutination tests using staphylococci sensitized with antibody specific for each of three bacterial pathogens

Bacterial antigen used* ¹	Antisera used to sensitize staphylococci					Control* ⁵
	Anti-BKD bacterium			Anti- <i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 14174	Anti- <i>Vibrio anguillarum</i> KAY-2	
	EFDL-2* ²	AKD-3* ³	OKD-3* ⁴			
BKD bacterium strain Erimo	+* ⁶	+	+	—* ⁶	—	—
BKD bacterium strain Otobe	+	+	+	—	—	—
BKD bacterium strain Niigata	+	+	+	—	—	—
BKD bacterium strain Shizuoka	+	+	+	—	—	—
BKD bacterium strain Miyako	+	+	+	—	—	—
<i>Aeromonas hydrophila</i> IAM 1018	—	—	—	—	—	—
<i>A. punctata</i> IAM 1646	—	—	—	—	—	—
<i>A. liquefaciens</i> EFDL	—	—	—	—	—	—
<i>A. salmonicida</i> NCMB 833	—	—	—	+	—	—
<i>A. salmonicida</i> NCMB 1102	—	—	—	+	—	—
<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	—	—	—	+	—	—
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> NCMB 2020	—	—	—	+	—	—
<i>Vibrio metschnikovii</i> IAM 1039	—	—	—	—	—	—
<i>V. tyrogenes</i> IAM 1080	—	—	—	—	—	—
<i>V. piscium</i> var. <i>japonicus</i> TUF	—	—	—	—	—	—
<i>V. anguillarum</i> NCMB 6	—	—	—	—	+	—
<i>V. anguillarum</i> NCMB 828	—	—	—	—	+	—
<i>V. anguillarum</i> NCMB 829	—	—	—	—	+	—
<i>V. anguillarum</i> KAY-2	—	—	—	—	+	—
<i>Escherichia coli</i> O-6	—	—	—	—	—	—
<i>Pseudomonas fluorescens</i> EFDL	—	—	—	—	—	—
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> Mi 2	—	—	—	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL 558	—	—	—	—	—	—

*¹ Heat extracted antigen by PBS at 100°C for 30 min.

*² Antiserum provided by National Fisheries Center, Lcetown W. Va, U.S.A.

*³ Antiserum against strain Marimo.

*⁴ Antiserum against strain Otobe.

*⁵ Normal rabbit serum.

*⁶ + indicates a positive agglutination reaction; — indicates a negative reaction.

し、対照の正常血清で感作した staphylococci でもすべて陰性の結果を示した。

Coagglutination test とゲル内沈降反応の反応感度の

比較 BKD 発生中の千歳試験池、襟裳支場、香川県水試および日魯養魚更別養魚場の 4 飼育群の供試魚から調製した腎臓の加熱抽出抗原を用い、既報¹⁰⁾のゲル内沈降

Table 8. Effects of concentration of antigen and the time of reaction on the coagglutination test for detection of BKD antigen in heat extract of affected salmon kidney

Fish specimens	Source of specimens (hatchery)	Concentration of antigen	Antisera used to sensitize staphylococci									
			Anti-BKD bacterium						Control* ⁵			
			EFDL-2* ¹			AKD-3* ²			Reaction time (min)			
			Reaction time (min)			Reaction time (min)			Reaction time (min)			
			30	60	120	30	60	120	30	60	120	
Kokanee* ⁴ salmon No. 19	Chitose	2 ⁻¹	+* ³	+	+	+	+	+	+	—* ⁶	—	—
		2 ⁻²	+	+	+	+	+	+	—	—	—	
		2 ⁻³	+	+	+	+	+	+	—	—	—	
		2 ⁻⁴	+	+	+	+	+	+	—	—	—	
		2 ⁻⁵	+	+	+	+	+	+	—	—	—	
		2 ⁻⁶	—	—	+	—	—	+	—	—	—	
Kokanee* ⁴ salmon No. 29	Erimo	2 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	—	—	—	
		2 ⁻²	+	+	+	+	+	+	—	—	—	
		2 ⁻³	+	+	+	+	+	+	—	—	—	
		2 ⁻⁴	+	+	+	+	+	+	—	—	—	
		2 ⁻⁵	+	+	+	—	+	+	—	—	—	
		2 ⁻⁶	+	+	+	—	+	+	—	—	—	
		2 ⁻⁷	—	+	+	—	+	+	—	—	—	
		2 ⁻⁸	—	—	+	—	—	+	—	—	—	
Yamabe* ⁵ No. 759-776 (Control)	Mori	2 ⁻⁰	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		2 ⁻¹	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		2 ⁻²	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
PBS		2 ⁻⁰	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

*1 Antiserum provided by National Fisheries Center, Leetown W. Va., U.S.A.

*2 Antiserum against strain Marimo.

*3 Normal rabbit serum.

*4 *Oncorhynchus nerka*.

*5 *Oncorhynchus masou*.

*6 + indicates a positive agglutination reaction; — indicates a negative reaction.

Table 9. Comparison of sensitivity of the coagglutination and immunodiffusion tests for detection of BKD antigen in heat extract of affected salmon kidney

Concentration ^{*1} of antigen	Fish specimens							
	Kokanee ^{*2} salmon from Chitose hatchery ^{*4}		Kokanee salmon from Erimo hatchery ^{*4}		Coho ^{*3} salmon from Kagawa ^{*4}		Kokanee salmon from Sarabetsu ^{*4}	
	Immuno-diffusion	Coagglutination	Immuno-diffusion	Coagglutination	Immuno-diffusion	Coagglutination	Immuno-diffusion	Coagglutination
Undiluted	7/22 ^{*5}	12/22 ^{*5}	7/7 ^{*5}	7/7 ^{*5}	1/5 ^{*5}	5/5 ^{*5}	3/9 ^{*5}	7/9 ^{*5}
2 ⁻¹	7/22	11/22	6/7	7/7	1/5	5/5	0/9	7/9
2 ⁻²	6/22	11/22	5/7	7/7	1/5	5/5	0/9	6/9
2 ⁻³	2/22	9/22	3/7	7/7	0/5	5/5	0/9	6/9
2 ⁻⁴	2/22	9/22	3/7	7/7	0/5	4/5	0/9	6/9
2 ⁻⁵	0/22	8/22	0/7	6/7	0/5	1/5	0/9	2/9
2 ⁻⁶	0/22	3/22	0/7	4/7	0/5	1/5	0/9	1/9

*1 Heat extracted antigen from kidney of fish randomly sampled from each population; A 1:5 suspension in PBS held at 100°C for 30 min.

*2 *Oncorhynchus nerka*.

*3 *Oncorhynchus kisutch*.

*4 Japanese salmon hatcheries or farms.

*5 Positive specimens/number of specimens tested.

反応と本報の coagglutination test による BKD 抗原検出感度についての比較を行つたが、Table 9 にみられるように、いずれの場合にも coagglutination test による BKD 抗原検出感度がゲル内沈降反応のそれに較べて高い傾向を示す結果が得られた。

BKD 診断のための従来法との比較 前述のように原因菌の分離培養が極めて困難な BKD の診断には従来病魚の肉眼的診断、病魚腎臓患部におけるグラム陽性小桿菌の存在および前記ゲル内沈降反応による抗原物質の存在の確認などの方法がとられてきた。そこで BKD 発生中の 6 養魚場における病魚試料と対照の森支場の健康ヤマベ試料について従来法による診断結果と coagglutination test を応用した診断結果との比較を行い、Table 10 に示すような結果を得た。すなわち coagglutination test による BKD の検出率は従来法のいずれよりも明らかに高い傾向を示し、本方法が従来法に比しより優れていることが示された。

Coagglutination test による BKD の診断結果 そこで 1977 年から 1980 年にかけて肉眼的診断により BKD の発生が考えられた 18 カ所の飼育魚より無作為に抽出した 5 魚種 672 尾について coagglutination test による BKD 診断を行つたが、Table 11 にみられる如くいずれの飼育池の供試魚からも BKD 病魚が検出され、その検出率は前記同様肉眼的診断法やグラム染色による診断法よりも高い検出率を示した。この結果より現在までのわ

が国における BKD 発生地は Fig. 7 にみられる如くとなり木村の総説¹⁰⁾にある北海道内の 10 カ所をはじめ、今回の試験で明らかとなった北海道、岩手、新潟、栃木、群馬、長野、茨城、山梨、静岡、香川の各道県合わせて計 28 カ所となった。

考 察

細菌性腎臓病 (BKD) 原因菌は培養が極めて困難であることから従来その診断は肉眼的所見や病魚腎臓のグラム染色による原因菌の顕微鏡的検索、さらには血清学的手法を導入しての病魚腎臓患部の加熱抽出抗原を用いたゲル内沈降反応や蛍光抗体法に頼ってきた。ところで最近 *Staphylococcus aureus* のある種の株の含有する Protein A が抗体蛋白 IgG の Fab を遊離のまま Fc 部分を吸着する現象が明らかにされ、この現象を応用した一種の逆受身凝集反応である coagglutination test が人の細菌性疾患の迅速診断に応用されるようになってきた。本報ではこの coagglutination test の BKD 診断への応用の可能性について多数の試料を用いて従来診断法との比較検討を行った。

まず安定化した staphylococci に抗血清を反応させると反応後の血清の凝集素価は抗 BKD、抗 *A. salmonicida* および抗 *V. anguillarum* ウサギ血清ともに 75~98% の減少を示し、安定化 staphylococci は明らかに非特異的な吸着能を有することが観察された (Table 5)。さら

Table 10. Comparison of coagglutination test, clinical signs, Gram stain, and immunodiffusion tests for detection of bacterial kidney disease

Fish specimens	Source of specimens; hatchery or farm	Date	Number of fish specimens examined	Number of specimens with positive diagnoses					
				Clinical signs	Gram stain	Immunodiffusion test with BKD anti-sera	Coagglutination test staphylococci sensitized with anti-sera against kidney disease bacteria		
							AKD-3*1	EFDL-2*2	
Kokanee salmon*3	Chitose	1977	22	7	9	6	7	9	12
Chinook salmon*4	Ermo	1977	7	7	7	5	7	7	7
Coho salmon*5	Kagawa	1977	5	3	—*8	1	1	5	5
Rainbow trout*6	Furubira	1977	20	0	0	0	—	3	—
Kokanee salmon	Sarabetsu	1977	9	7	6	3	—	7	—
Masu salmon*7	Otobe	1977	21	17	15	13	—	15	—
Masu salmon	Mori (control)	1977	17	0	0	0	0	0	0

*1 Anti-BKD serum against strain Marimo.

*2 Anti-BKD serum; provided by National Fisheries Center, Leetown, W. Va., U.S.A.

*3 *Oncorhynchus nerka*.

*4 *O. tshawytscha*.

*5 *O. kisutch*.

*6 *Salmo gairdneri*.

*7 *Oncorhynchus masou*.

*8 Indicates no data.

Table 11. Diagnosis of bacterial kidney disease by the coagglutination test in natural outbreaks in Japan, 1977-1980

Fish specimens	Source of specimens (name of farm)	Date	Number of specimens	Number of specimens diagnosed as positive for BKD		
				Clinical sign	Gram stain	Coagglutination test ^{*1}
Coho salmon ^{*3}	Fujinomiya	Aug. '77	20	13	18	18
Coho salmon	Nakagawa	Aug. '77	7	— ^{*2}	—	6
Coho salmon	Koide	Dec. '77	5	4	4	4
Coho salmon	Maebashi	Oct. '78	2	2	2	2
Rainbow trout ^{*4}	Fuji	Jan. '79	10	—	—	7
Amago ^{*5}	Fuji	May '79	21	2	2	2
Coho salmon	Koide	June '79	5	4	4	4
Masu salmon ^{*6}	Otobe	June '79	22	11	12	12
Coho salmon	Miyako-M	June '79	36	12	12	12
Coho salmon	Otuti	July '79	5	1	—	1
Coho salmon	Hamanaka	Aug. '79	15	4	4	6
Masu salmon	Otobe	Sep. '79	10	7	7	8
Coho salmon	Koide	Oct. '79	153	21	65	76
Coho salmon	Fujinomiya	Oct. '79	66	5	9	16
Masu salmon	Otobe	Dec. '79	38	8	18	35
Coho salmon	Kaida	Dec. '79	3	2	2	3
Coho salmon	Otuti	May '80	5	2	—	2
Masu salmon	Koide	May '80	5	4	4	5
Coho salmon	Kukizaki	June '80	20	0	0	3
Masu salmon	Mori	June '80	22	11	—	18
Masu salmon	Koide	June '80	43	35	32	43
Masu salmon	Urasa	June '80	24	10	6	8
Kokanee salmon ⁷	Shikishima	June '80	10	4	3	9
Coho salmon	Hamanaka	July '80	26	2	0	5
Coho salmon	Otuti	July '80	5	2	—	3
Coho salmon	Toyama	July '80	2	1	1	1
Coho salmon	Hamanaka	Aug. '80	15	13	13	15
Masu salmon	Otobe	Spe. '80	7	3	—	4
Coho salmon	Miyako	Oct. '80	5	2	5	5
Chum salmon ^{*9}	Matsuo	Oct. '80	47	24	26	34
Coho salmon	Nikko	Oct. '80	3	—	—	2
Masu salmon	Shakotan	Nov. '80	6	2	2	2
Coho salmon	Nikko	Dec. '80	11	2	2	5

*1 Anti-BKD sera; AKD-3, OKD-3, EFDL-1, or EFDL-2; used to sensitize staphylococci.

*2 Indicates no data.

*3 *Oncorhynchus ktsutch*.

*4 *Salmo gairdneri*.

*5 *Oncorhynchus rhodurus*.

*6 *O. masou*.

*7 *O. nerka*.

*8 *O. keta*.

に自家製および EFDL 分子の抗 BKD 血清ならびに自家製の抗 *A. salmonicida*, 抗 *V. anguillarum* 血清により感作した staphylococci とこれらに対応する加熱死菌懸濁抗原および加熱抽出抗原との交叉 coagglutination test ではそれぞれの感作 staphylococci は対応する抗原とのみ特異的な反応を示し (Table 6), さらにこれらの感作 staphylococci と他のいくつかの魚病関連菌より調製した対照の菌体加熱抽出抗原との coagglutination test で

も反応陽性を示すのは対応する種に属する菌株の抗原のみであり (Table 7), 明瞭な反応特異性が観察された。

次にこの coagglutination test の BKD 診断への応用について BKD 病魚の腎臓から加熱抽出 BKD 抗原を調製し, その濃度を稀釈により種々に変え反応陽性を示すまでの時間と抗原濃度との関係を観察したが, 抗原濃度が高い場合には 30 分以内の反応で明瞭な陽性結果が得られ, また抗原濃度が病魚腎臓重量の 160 倍から 500 倍

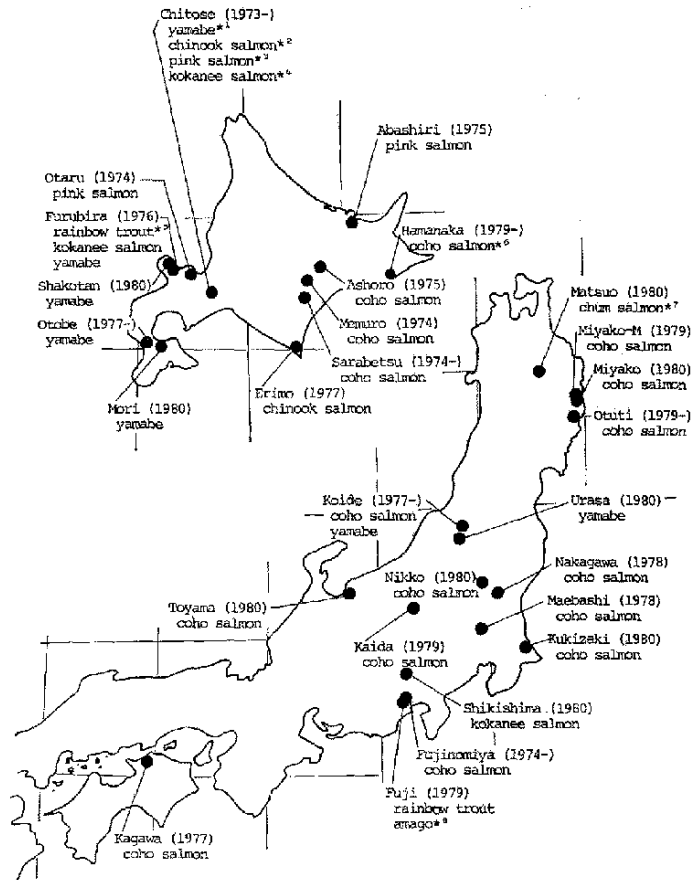


Fig. 7. Map showing the location of outbreaks of BKD in Japan from 1973 to 1980.

- | | |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| *1 <i>Oncorhynchus masou.</i> | *2 <i>Oncorhynchus tshawytscha.</i> |
| *3 <i>Oncorhynchus gorbusha.</i> | *4 <i>Oncorhynchus nerka.</i> |
| *5 <i>Salmo gairdneri.</i> | *6 <i>Oncorhynchus kisutch.</i> |
| *7 <i>Oncorhynchus keta.</i> | *8 <i>Oncorhynchus rhodurus.</i> |

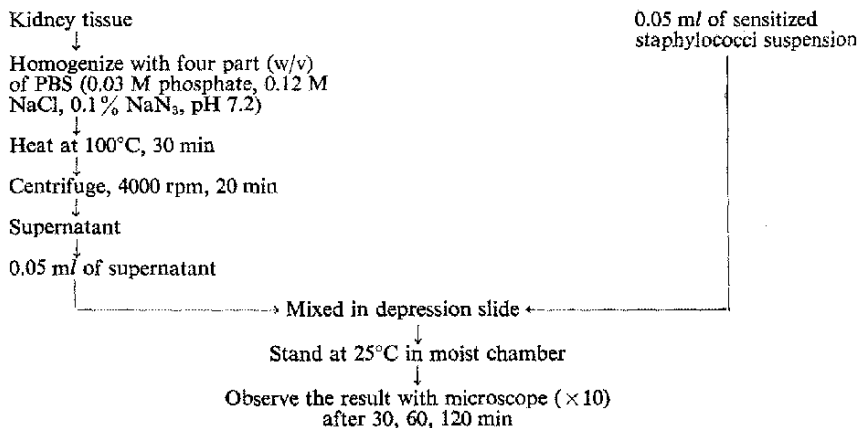


Fig. 8. Flow chart outline the coagglutination test for the detection of BKD antigen in salmonid fish.

に稀釈された場合でも、2時間の反応で明瞭な陽性結果を示した (Table 8)。さらに BKD 発生群から無作為に抽出した供試魚の腎臓より調製した加熱抽出抗原を用い、coagglutination test とゲル内沈降反応による BKD 検出率の比較を行ったが、いずれの場合も本方法の方が高い BKD 検出率を示し (Table 9)、従来法の肉眼的診断法およびグラム染色法に比べても本方法による検出率の方が高く (Table 10) BKD 診断法として極めて優れた方法であることが確認された。

そこで 1974 年から 1980 年にかけて BKD の発生が考えられた 18 カ所の飼育魚より無作為に抽出した 5 魚種 672 尾について coagglutination test による BKD 診断を行ったが、いずれの飼育地の供試魚からも BKD 病魚が検出され、しかも肉眼的診断法やグラム染色による診断よりも高い検出率を示した (Table 11)。

以上までの検討結果から、特異抗体感作 staphylococci を用いる coagglutination test による BKD 診断法を図示すると Fig. 8 の如くで、本法には特殊な実験器具は全く必要とせず、診断にわずか 2~3 時間を要するのみでしかも血清量はゲル内沈降反応などに比し 1/100~1/200 で済むことを考え合わせると、BKD の診断をより正確にかつ迅速簡易化し得たものと考えられる。また病魚材料の加熱処理試料を郵送することにより遠隔地での診断も可能である。

要 約

最近開発された新しい血清学的診断法である特異抗体感作 staphylococci を用いる coagglutination test (共同凝集試験) の魚病診断、特にサケ科魚類の細菌性腎臓病 (BKD) 診断への応用について検討を行った結果、病魚患部加熱抽出液を抗原とする coagglutination test により、本病を現場において 2~3 時間の短時間でしかも特殊な実験装置を全く必要とせず、迅速且つ簡易に診断し得ること、さらに病魚材料の加熱処理試料を郵送することにより遠隔地での診断も可能であることを明らかにし得た。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始御協力をいただいた北海道大学水産学部微生物学講座助教授、絵面良男博士ならびに田島研一助手の各位に深甚なる謝意を表する。また

本研究の一部は水産庁から委託された昭和 54 年度魚病対策技術開発研究委託費によった。ここに記して謝意を表する。

文 献

- 1) D. L. BELDING and B. MERRILL: *Trans. Ame. Fish. Soc.*, **65**, 76-84 (1935).
- 2) I. W. SMITH: *Scot. Dept. Agr. Fish., Fresh Water Salmon Fish Res.*, No. 34, 1-12 (1964).
- 3) G. L. BULLOCK, D. A. CONROY, and S. F. SNIESZKO: in "Book 2A: Bacterial Disease of Fish" (ed. by S. F. SNIESZKO and H. A. AXELROD) T. F. H. Publication Inc., Neptune N. J., 1971, pp. 94-104.
- 4) G. R. BELL: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **18**, 559-562 (1961).
- 5) J. K. PIPPY: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **26**, 2535-2537 (1969).
- 6) T. P. T. EVELYN: *J. Wildlife Disease*, **7**, 328-335 (1971).
- 7) T. YAMAMOTO: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **32**, 92-95 (1975).
- 8) P. KINKELIN: *Bull. Piscicul.*, No. **254**, 3-8 (1972).
- 9) 木村喬久・栗倉輝彦: *日水誌*, **43**, 143-150 (1977).
- 10) 木村喬久: *魚病研究*, **13**, 43-52 (1978).
- 11) E. J. ORDAL and B. J. EARP: *Exper. Biol. Med.*, **6**, 85-88 (1956).
- 12) P. K. CHEN, G. L. BULLOCK, H. M. STUCKY, and A. C. BULLOCK: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **31**, 1939-1940 (1974).
- 13) G. L. BULLOCK, H. M. STUCKY, and P. K. CHEN: *Appl. Microbiol.*, **28**, 811-814 (1974).
- 14) 木村喬久・絵面良男・田島研一・吉水 守: *魚病研究*, **13**, 103-108 (1978).
- 15) G. L. BULLOCK and H. M. STUCKY: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **32**, 2224-2227 (1975).
- 16) G. KRONVAL: *J. Med. Microbiol.*, **6**, 187-190 (1972).
- 17) E. D. EDWARD and G. L. LARSON: *Appl. Microbiol.*, **28**, 972-976 (1974).
- 18) E. A. EDWARD and R. L. HINDERBAND: *J. Clinical Microbiol.*, **3**, 339-343 (1976).
- 19) P. CHRISTENSEN, G. KALMETER, S. GONSSON, and G. KRONVAL: *Infect. Immunity*, **7**, 881-885 (1973).
- 20) M. SUKSNONG and A. S. DAJANI: *J. Clin. Microbiol.*, **5**, 81-85 (1977).