HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Aeromonas salmonicida 自然凝集株の血清学的鑑別への特異抗体感作 staphylococci を用いた coagglutination test の応用
Author(s)	木村, 喬久; 吉水, 守
Citation	日本水産学会誌, 50(3), 439-442 https://doi.org/10.2331/suisan.50.439
Issue Date	1984-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/38615
Rights	© 1984 公益社団法人日本水産学会
Type	journal article
File Information	yoshimizu-34.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 50(3), 439–442 (1984)

Aeromonas salmonicida 自然凝集株の血清学的鑑別への特異抗体感作 staphylococci を用いた coagglutination test の応用

木村喬久・吉水守

(1983 年 6 月 27 日受理)

Coagglutination Test with Antibody-sensitized Staphylococci for Rapid Serological Identification of Rough Strains of *Aeromonas salmonicida*

Takahisa KIMURA* and Mamoru YOSHIMIZU*

The majority of isolates of *Aeromonas salmonicida*, the causative organism of fish furunculosis, from diseased fish are rough, that is auto-agglutinating. Therefore serological identification by the slide agglutination test may be difficult to perform.

The application of a coagglutination test, for the serological identification of auto-agglutinate *A. salmonicida*, was studied using staphylococci specifically sensitized with an antibody against the bacterium.

This proved to be a simple and rapid method for use in the laboratory and required no special apparatus.

The procedure for this method is summarized as follows.

1. *A. salmonicida*, cultured in nutrient broth, is heated in boiling water for 30 min.
2. The supernatant is collected after centrifugation at 4000 rpm for 20 min. This may be omitted if auto-agglutination is recognized at the bottom of the culture tube.
3. One drop of the supernatant and one drop of anti-*A. salmonicida* antibody sensitized staphylococci suspension are mixed on a glass slide and the slide is examined after 30 min.

セッソウ病原因菌 *Aeromonas salmonicida* は一般に分離当初強い自然凝集性を示し，常法の載せガラス凝集反応による血清学的鑑別に困難をきたす場合が多く，このようなことからラテックスや血球を用いた間接凝集試験[1,2]やインディアインク法[3]などの応用が検討され報告されている。

ところで著者らは *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 試薬を用いた coagglutination test が細菌性腎臓病 (BKD) やセッソウ病の迅速且つ平易な診断法として優れていることを明らかにし報告した。[4–6]

本報では自然凝集性を有する *A. salmonicida* の血清学的鑑別がこの特異抗体感作 staphylococci を用いた coagglutination test により，容易に実施でき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

供試抗血清感作 staphylococci: 抗血清感作 staphylococci としては前報[6]において調製した抗 *A. salmonicida* (ATCC 14174) ウサギ血清感作 staphylococci および正常ウサギ血清感作 staphylococci を本実験に用いた。

供試菌: 供試菌としては Table 1 に示す 9 株の *A. salmonicida* の他，*Aeromonas* 属細菌 4 株，*Vibrio anguillarum* および *Pseudomonas fluorescens* 各 1 株の計

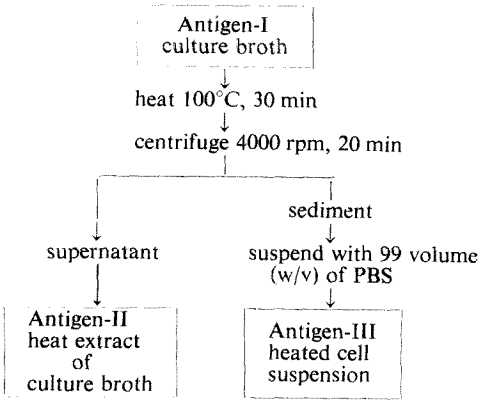

Fig. 1. Preparation of *A. salmonicida* antigens for coagglutination test.

* 北海道大学水産学部微生物学講座 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041, Japan).

15 株，ならびに Table 2 に示した 1979 年秋，野村・木村[7] により北海道内のサケ科魚類遡上主要河川において遡上中あるいは蓄養中のシロサケ *Oncorhynchus keta*，カラフトマス *O. gorbuscha* より分離され，*A. salmonicida* と同定された 215 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。

供試菌抗原の調製法：供試菌抗原の調製法は Fig. 1 に示すごとくで，まず普通ブイヨン (*Vibrio* には NaCl 濃度を 1.5% に増量) に 25°C 48 時間培養した培養液を抗原-I，次に培養液を 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，抗原-II とし，さらに沈渣に 99 倍量の PBS (w/v) を加えた懸濁液を調製し，加熱死菌懸濁液抗原，抗原-III とした。

Coagglutination test の実施法：前報[6] 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* を載せガラス上で混合し，湿潤箱に収めて室温で 30 分間反応させ，凝集の有無を肉眼で観察した。

結　　果

***A. salmonicida* の自然凝集性と調製法の異なる 3 種の抗原を用いた coagglutination test**：*A. salmonicida* 9 株，*Aeromonas* 属細菌 4 株，*V. anguillarum* および *P. fluorescens* 各 1 株についてこれらの自然凝集性を観察すると共に，加熱死菌懸濁液，培養液および培養液の加熱抽出液の 3 種の抗原と抗 *A. salmonicida* 血清感作 staphylococci との coagglutination test を行った結果は Table 1 および Fig. 2～4 に示す如くで，自然凝集性の有無にかかわらず供試菌の加熱死菌懸濁液および培養液を抗原とした場合，1～数分の反応時間で明瞭な凝集を示し，またブイヨン培養液の加熱抽出液を抗原とした場合でも凝集粒子は若干小さくなるものの数分の反応時間で明瞭な凝集を示し，本法により自然凝集株の血清学的

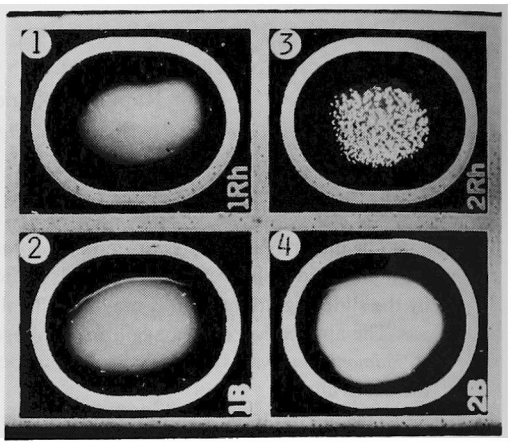

Fig. 2. Coagglutination reaction patterns obtained with heated cell suspension of *A. salmonicida* (antigen III) strain Iwate, using a staphylococcal suspension coupled with anti-*A. salmonicida* ATCC 14174 serum (3). The same antigen did not agglutinate with normal rabbit serum bound staphylococci (4),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

Table 1. Comparison of auto-agglutination of bacteria used and specificity of coagglutination tests using staphylococci sensitized with anti-*A. salmonicida* ATCC 14174 serum

Bacteria or bacterial antigens used	Auto-agglutination	Coagglutination test		
		Antigen-III*1	Antigen-I*1	Antigen-II*
Aeromonas hydrophila IAM 1018	—*2	—	—	—
A. punctata IAM 1646	—	—	—	—
A. liquefaciens EFDL	—	—	—	—
Aeromonas sp.	++*2	—	—	—
A. salmonicida ATCC 14174	—	++	++	+
A. salmonicida NCMB 1102	—	++	++	+
A. salmonicida Nagano N-8	—	++	++	+
A. salmonicida Nagano N-17	+	++	++	+
A. salmonicida Hokkaido 1 M	+	++	++	+
A. salmonicida Hokkaido 5 M	+	++	++	+
A. salmonicida Wakayama	++	++	++	+
A. salmonicida Iwate	++	++	++	+
A. salmonicida subsp. *masoucida* NCMB 2020	—	++	++	+
Vibrio anguillarum NCMB 6	—	—	—	—
Pseudomonas fluorescens EFDL	—	—	—	—

*1 See Fig. 1.
*2 + indicates a positive agglutination reaction; − indicates a negative reaction.

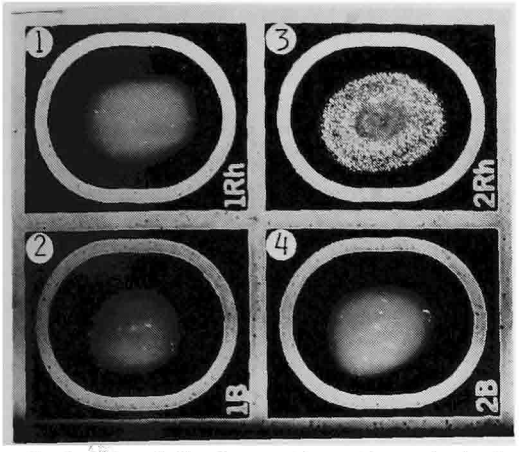

Fig. 3. Coagglutination reaction patterns obtained with culture broth of *A. salmonicida* (antigen I) strain Iwate, using a staphylococcal suspension coupled with anti-*A. salmonicida* ATCC 14174 serum (3). The same antigen did not agglutinate with normal rabbit serum bound staphylococci (4), and neither staphylococcal suspensions agglutinated with PBS (1, 2).

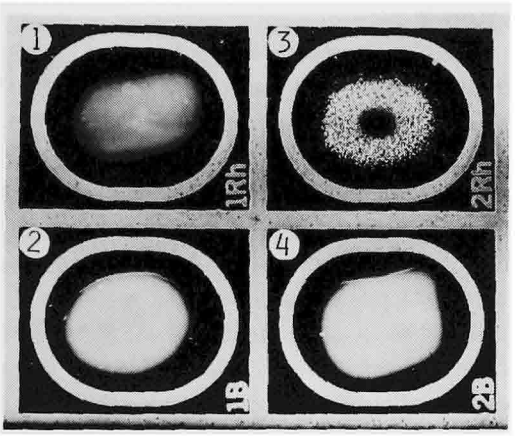

Fig. 4. Coagglutination reaction patterns obtained with heat extract of culture broth of *A. salmonicida* (antigen II) strain Iwate, using a staphylococcal suspension coupled with anti-*A. salmonicida* ATCC 14174 serum (3). The same antigen did not agglutinate with normal rabbit serum bound staphylococci (4), and neither staphyloccal suspensions agglutinated with PBS (1, 2).

Table 2. Serological identification of auto-agglutinate *A. salmonicida* isolated from the kidney of anadromous chum salmon *Oncorhynchus keta* and pink salmon *O. gorbuscha* by coagglutination test using staphylococci sensitized with anti *A. salmonicida* ATCC 14174 serum

Sampling		Species of fish	Number of strain	Positive result			
Place	Date			Auto-agglutination		Coagglutination test Antigen	
				Strong	Week	Culture broth (Antigen I)	Heat extract of culture broth (Antigen II)
Chitose R.	26. Sep. '79	chum salmon	16	16	0	16	16
〃	9. Oct. 〃	〃	26	25	1	26	26
〃	12. 〃 〃	〃	7	7	0	6	6
〃	28. 〃 〃	〃	4	4	0	4	4
〃	20. Nov. 〃	〃	1	1	0	1	1
Shibetsu R.	16. Oct. 〃	〃	24	24	0	24	24
Kushiro R.	19. 〃 〃	〃	3	2	1	3	3
Tokachi R.	20. 〃 〃	〃	11	9	2	11	11
Tokushibetsu R.	26. 〃 〃	〃	32	6	26	31	32
〃	30. Nov. 〃	〃	4	1	3	4	4
Abashiri R.	1. 〃 〃	〃	14	13	1	14	14
〃	9. 〃 〃	〃	6	6	0	6	6
〃	28. 〃 〃	〃	1	1	0	1	1
Tokushibetsu R.	6. Sep. '79	pink salmon	1	1	0	1	1
〃	26. Oct. 〃	〃	21	0	21	21	21
Shibetsu R.	17. 〃 〃	〃	22	22	0	22	22
Tokoro R.	30. 〃 〃	〃	8	0	8	8	8
Abashiri R.	9. Nov. 〃	〃	14	13	1	13	13
sum			215	151	64	213	214

鑑別が可能となった。

分離当初の *A. salmonicida* の血清学的鑑別: 前述の如く特異抗体感作 staphylococci により自然凝集性の有無にかかわらず *A. salmonicida* の血清学的鑑別が可能となったことから，遡上中あるいは蓄養中のシロサケおよびカラフトマス腎臓より分離され，*A. salmonicida* と同定された215株について自然凝集性の有無とその程度を観察し，それらのブイヨン培養液および培養液の加熱抽出液を抗原とした coagglutination test を行った結果は Table 2 にみられる如くで，供試した215株は程度の差はあれすべて自然凝集を示し，常法の載せガラスによる凝集試験は困難であった。しかしブイヨン培養液を抗原とした coagglutination test では供試菌215株のうち2株の陰性を除き，反応時間 1～数分で明瞭な凝集を示し血清学的鑑別が可能となった。培養液の加熱抽出液を抗原とした場合でも凝集粒子は若干小さくなったものの数分の反応時間で明瞭な凝集がみられ，陽性株はさらに1株増加して214株となった。

考　　察

セッソウ病原因菌 *A. salmonicida* は一般に分離当初強い自然凝集性を示し，載せガラス凝集反応による血清学的鑑別に困難をきたす場合が多い。そこで教室保存の *A. salmonicida* について自然凝集性を観察すると共に，ブイヨン培養液，培養液の加熱抽出液および加熱死菌懸濁液の3種の抗原を調製し，抗 *A. salmonicida* 血清感作 staphylococci との coagglutination test を行ったところ，供試菌は自然凝集性の有無にかかわらず明瞭な特異的 coagglutination を示し，本法により自然凝集性の強い分離当初の菌株の血清学的鑑別が可能となった。そこで分離当初の *A. salmonicida* 215株について自然凝集性の有無およびその程度を観察すると共に培養液および培養液の加熱抽出液を抗原とした coagglutination test を行い *A. salmonicida* の血清学的鑑別を試みたところ，供試菌はすべて自然凝集を示し常法の載せガラス凝集反応による血清学的鑑別は困難であった。しかし coagglutination test では数分間の反応で明瞭な凝集を示し血清学的鑑別が可能となった。特に自然凝集を示す菌株の培養液の加熱抽出液を抗原として用いる場合には，菌体は凝集して管底に凝集塊を成すことから遠心分離操作を省略したとしても抗原液中に菌体はほとんど存在せず自然凝集と混同する心配がなく，しかも無菌操作を必要としない点，実験室を含め環境を汚染する心配がなく最も実用的な方法と考えられる。

なお *A. salmonicida* は現在までのところ株間では抗原的に均一であるとされているが，抗 *A. salmonicida* (ATCC 14174) 血清感作 staphylococci と反応を示さない1株が見出され，この株は継代を重ね自然凝集性を示さなくなった培養菌を用いた載せガラス凝集試験においても前記抗 *A. salmonicida* 血清との反応が認められず，今後本菌株の抗原構造について検討を重ねる必要があると考える。

要　　約

特異抗体感作 staphylococci を用いた coagglutination test による *A. salmonicida* 自然凝集株の血清学的鑑別法について検討を行い次の如き結論を得た。

供試菌のブイヨン培養液の加熱抽出液を抗原とする coagglutination test により自然凝集株の血清学的鑑別が可能であった。

この方法は菌体を含まない加熱抽出抗原を用いるため自然凝集との混同が避けられ，しかも無菌操作を必要としないことから極めて簡便かつ有効な方法である。

謝　　辞

本研究の遂行にあたり終始ご協力を頂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助手田島研一博士に感謝の意を表する。また本研究は水産庁から委託された昭和 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た。ここに記して謝意を表する。

文　　献

1) D. H. McCarthy and C. R. Rawle: *J. Gen. Microbiol.*, **86**, 185–187 (1975).
2) D. H. McCarthy: *J. Gen. Microbiol.*, **88**, 384–386 (1975).
3) D. H. McCarthy and P. Whitehead: *J. Appl. Bacteriol.*, **42**, 429–431 (1977).
4) 木村喬久・吉水　守: 日水誌, 1173–1183 (1981).
5) T. Kimura and M. Yoshimizu: *Develop. biol. Standard*, **49**, 135–148 (1981).
6) 木村喬久・吉水　守: 魚病研究, **17**, 257–262 (1983).
7) 野村哲一・木村喬久: 魚病研究, **16**, 69–74 (1981).