

BKD 原因菌 *R.salmoninarum* ATCC 33209 と共通抗原を  
有する *Pseudomonas* 属細菌の存在について

吉水 守\*<sup>1</sup>, 紀 栄興\*<sup>1</sup>, 野村 哲一\*<sup>2</sup>, 木村 喬久\*<sup>1</sup>

A Falsepositive Reaction in the Indirect Fluorescent Antibody  
Test for *Renibacterium salmoninarum* ATCC 33209  
Caused by a *Pseudomonas* sp.

Mamoru YOSHIMIZU\*<sup>1</sup>, Rongxing Ji\*<sup>1</sup>, Tetsuichi NOMURA\*<sup>2</sup>,  
and Takahisa KIMURA\*<sup>1</sup>

**Abstract**

During the routine examination of matured salmonid, the BKD (bacterial kidney disease of salmonid) positive antigens were observed on the kidney smears of matured chum (*Oncorhynchus keta*) and pink salmon (*O. gorbuscha*) returning to Shari River. Signs of BKD were not observed in these fish and their progenies appeared to be healthy. An organism was isolated when the screening was done for the BKD antigen by indirect FAT among the colonies grown on the KDM-2 which was inoculated with the kidney tissue of pink salmon. The isolate was classified as *Pseudomonas* sp. but which was found not a BKD organism, however, showed a positive reaction with antisera against *Renibacterium salmoninarum* ATCC 33209 by FAT. The shape and size of the isolate were similar to that of *R. salmoninarum*. Therefore this isolate could not be distinguished from BKD organism by FAT. The isolate did not show a positive reaction in the coagglutination test and gel-diffusion test, and also did not show a reaction with anti-serum against the different strain of *R. salmoninarum* (Otobe), and partially purified IgG of anti-*R.salmoninarum* ATCC 33209 rabbit serum by FAT. The positive reactions on the kidney smears of chum and pink salmon with FAT was judged to be a false positive reaction caused by this isolate.

**結 言**

サケ科魚類の細菌性腎臓病 (BKD) は, その原因菌 *Renibacterium salmoninarum* の培養が困難であることから, 診断は血清学的診断法に頼らざるを得ない (木村・吉水 1981)。BKD の血清学的診断法としては

北海道さけ・ますふ化場研究業績第305号

\*<sup>1</sup>: 北海道大学水産学部微生物学講座(Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minato 3-1-1, Hakodate, 041 JAPAN)

\*<sup>2</sup>: 水産庁北海道さけ・ますふ化場(Hokkaido Salmon Hatchery Fisheries, Agency of Japan, 2-2 Nakainoshima, Toyohira-ku, Sapporo, 062 JAPAN)

種々の方法が報告されているが、著者らは病魚の場合には coagglutination test が、保菌魚の場合には蛍光抗体法 (FAT) の利用が望ましいことを報告してきた (Yoshimizu and kimura 1985)。

東北北部、北海道における採卵親魚の病原体保有状況の調査にあたり1984年から BKD 保菌状況の調査を FAT 間接法により採卵親魚に実施してきたが、その過程で1984年斜里川のサケ親魚が、また翌年同河川のサケおよびカラフトマス親魚が、抗 *R. salmoninarum* ATCC33209 家兎血清を用いた FAT で陽性と判定された。しかし両魚種共に腎臓に病変はなく、その後の継続調査でも採卵孵化稚魚に BKD による斃死は観察されず飼育経過は順調であった。

ところで最近 BKD 原因菌 *Renibacterium salmoninarum* に対する抗血清を用いた FAT 間接法で交差反応陽性を示すグラム陽性細菌の存在が報告されている (Austin et al. 1985)。上記の斜里川のサケおよびカラフトマス腎臓中に見られるこれら抗 *R. salmoninarum* ATCC 33209 家兎血清と FAT 間接法で反応陽性を示した抗原が *R. salmoninarum* 由来か否かを明らかにするため、KDM-2 培地 (Evelyn 1977) を用い、本菌の分離を試みたところ *R. salmoninarum* は分離されず、抗 *R. salmoninarum* ATCC 33209 家兎血清と交差反応陽性を示すグラム陰性の運動性を有する細菌が分離された。

本報ではこの抗 *R. salmoninarum* 家兎血清と反応陽性を示した細菌の分離状況およびその性状、主として血清学的性状について報告する。

## 実験材料と方法

**供試魚の BKD 検査法：**1984年9、10、11月、翌年9および10月に、斜里川に遡上中捕獲され蓄養池に蓄養中のサクラマス、カラフトマスおよびサケ各々60尾の腎臓表面より鱗を無菌的に外し滅菌綿棒の柄にて腎臓表面に穴を開け、綿棒で腎臓組織の一部をスライドガラス表面に塗抹した。火炎固定後、FAT 間接法 (木村他 1986) により BKD 原因菌の有無を観察した。さらに、1985年11月カラフトマス60尾を対象に、腎臓の塗抹標本の作成と共に綿棒を用いて腎臓組織の一部を KDM-2 (Evelyn 1977) 培地表面に塗抹し、15°C で3週間培養し BKD 原因菌の分離を試みた。

**供試菌：**BKD 原因菌として *R. salmoninarum* ATCC 33209 株および IG 8401株を、また後述の方法によりカラフトマス腎臓から分離された SK 8501株の3株を本実験に供した。

**供試抗血清：**抗血清として自家製の *R. salmoninarum* ATCC 33209 株および Otobe 株に対する家兎抗血清ならびに上記抗 *R. salmoninarum* 家兎血清の硫酸分画 IgG を本実験に供した。

**定量凝集抗体価の測定法、共同凝集反応およびゲル内沈降反応：**定量凝集抗体価は McFarland No.3 濃度に調製した供試菌のホルマリン死菌懸濁液に倍々希釈した抗血清を等量加え、37°C で2時間反応後、さらに0°C で一晚反応させ、凝集が認められた血清の最高希釈率を求め凝集抗体価とした。共同凝集反応およびゲル内沈降反応は木村他 (1986) の方法によった。

**分離菌の性状検査：**前述の KDM-2 培地上に出現したコロニーのうち抗 *R. salmoninarum* 家兎血清による FAT 間接法により反応陽性となったコロニーを釣菌し、純分離を繰り返して供試分離菌 SK-8501を得た。分離菌については常法通り、グラム染色性、菌型、運動性、鞭毛の有無、グルコースの酸化発酵性、チトクロームオキシダーゼ活性の有無を観察した。

## 結 果

斜里川のサケおよびカラフトマスのFAT間接法によるBKD検査結果：1984年および1985年斜里川に遡上中捕獲され蓄養中のサクラマス、カラフトマス、サケの腎臓塗抹標本を対象に抗*R. salmoninarum* ATCC 33209 家兎血清を用いてFAT間接法によるBKD検査を実施した。結果は表1に示すごとくで、1984年のサクラマスおよびカラフトマスは陰性であったが、サケで60尾中7尾が反応陽性を示し、1985年のサクラマスは陰性であったが、サケで60尾中2尾、カラフトマスでも60尾中16尾が反応陽性を示した。

表1 斜里川のサクラマス・カラフトマスおよびサケのFAT間接法によるBKD検査結果

Table 1. Detection of the BKD antigens in the kidney tissues of matured salmon collected at the catching station of Shari River by indirect FAT using anti-*R. salmoninarum* ATCC 33209 rabbit serum

species of fish	sampling date	number of specimen	
		employed	BKD positive*
masu salmon* <sup>1</sup>	5. Sep. '84	60	0/60
pink salmon* <sup>2</sup>	27. "	60	0/60
chum salmon* <sup>3</sup>	29. Nov. "	60	7/60
masu salmon	3. Sep. '85	60	0/60
chum salmon	16. Oct. "	60	2/60
pink salmon	17. "	60	16/60

\*<sup>1</sup>: *Oncorhynchus masou*

\*<sup>2</sup>: *Oncorhynchus gorbuscha*

\*<sup>3</sup>: *Oncorhynchus keta*

KDM-2 培地に出現したコロニーのFAT間接法によるスクリーニング結果：1985年11月のカラフトマスについて上記同様腎臓の塗抹標本を用いたFAT間接法による*R. salmoninarum* 抗原の検索と共に、KDM-2 培地を用いたBKD原因菌の分離を試みた。*R. salmoninarum* 類似のコロニーを含め出現コロニーのFAT間接法によるスクリーニング結果を表2に示したが、腎臓の塗抹標本におけるFAT陽性13個体のKDM-2 培地平板上に出現したコロニー36個の内、*R. salmoninarum* と類似の色調、形態を示したものは5コロニーであった。抗*R. salmoninarum* ATCC 33209 家兎血清を用いたFAT間接法により反応陽性を示したコロニーは魚体No.54に見られた1コロニーのみであった。

分離菌SK-8501の性状：FAT間接法によるスクリーニングにより反応陽性を示した魚体No.54由来株SK-8501はグラム陰性の運動性を有する、大きさ0.6~0.7×1.0~1.5μmの短桿菌であり、Kovacs'のオキシダーゼ試験陽性、グルコースを酸化せず*Pseudomonas* 属に分類され、*R. salmoninarum* とは明らかに異なる細菌であった。

分離菌SK-8501株の血清学的性状：分離菌SK-8501株の血清学的性状を表3に示した。供試した抗*R. salmoninarum* ATCC 33209およびOtobe株家兎血清に対する定量凝集抗体価はホモの*R. salmoninarum* ATCC 33209株の1:640および1:1280に対しSK-8501株は共に1:8以下であった。

次にFAT間接法では*R. salmoninarum* ATCC 33209およびIG8401株は供試した両血清共に反応陽性であったが、SK-8501株は抗*R. salmoninarum* ATCC 33209血清とのみ反応陽性を示したが、抗Otobe株血清とは反応陰性であった。さらに共同凝集反応およびゲル内沈降反応では、*R. salmoninarum* ATCC 33209およびIG8401株は供試した両血清共に反応陽性であったがSK-8501株はいずれも反応陰性であった。

分離菌SK-8501株抗原の熱安定性：分離菌SK-8501株のFAT間接法における反応抗原の熱安定性を表4に示した。100℃30分の加熱により反応は陰性となり、反応抗原は易熱性であることが明らかとなったが、塗抹標本を火炎固定した場合、30秒間の固定でも反応性を消失することは出来なかった。

表2 カラフトマスの腎臓組織を培養した KDM-2 培地に出現したコロニーの FAT 間接法によるスクリーニング結果

Table 2. Screening of *R. salmoninarum* by indirect FAT among a colonies growing on KDM-2 medium inoculated with kidney tissue of pink salmon collected at the catching station of Shari River in November '85

fish No. show the BKD positive* <sup>1</sup>	number of the colonies		
	grown on the KDM-2 medium	looks similar to <i>R. salmoninarum</i>	show the positive reaction with FAT
7	≥30	0	0
8	≥30	0	0
9	≥30	0	0
10	≥30	0	0
11	≥30	0	0
14	7	1	0
16	≥30	0	0
27	4	—	0
45	3	1	0
46	6	2	0
47	6	—	0
48	4	—	0
54	6	1	1 (SK-8501) * <sup>2</sup>
total 13/60	≥36	5	1

\*<sup>1</sup>: by indirect FAT using the smear of kidney tissue\*<sup>2</sup>: isolate employed for following experiments; *Pseudomonas* sp. (SK-8501)表3 分離菌 *Pseudomonas* sp. SK-8501株の血清学的性状Table 3. Serological characteristics of isolate, *Pseudomonas* sp. SK-8501

antigen	anti- <i>R. salmoninarum</i> rabbit sera							
	ATCC 33209		Otohe 33209		ATCC 33209		ATCC 33209	
	agglutination titer	Otohe	indirect FAT	Otohe	coagglutination test	Otohe	gel-difusion test	Otohe
SK-8501	<8	<8	+	—	—	—	—	—
<i>R. salmoninarum</i> ATCC 33209	640	1280	+	+	+	+	+	+
<i>R. salmoninarum</i> IG 8401	NT* <sup>1</sup>	NT	+	+	+	+	+	+

\*<sup>1</sup>: not tested

硫酸分画抗 *R. salmoninarum* ATCC 33209 ウサギ血清と分離菌 SK-8501 との FAT 間接法における反応性：分離菌 SK-8501株の生菌，ホルマリン死菌，あるいは加熱死菌吸収抗 *R. salmoninarum* ATCC 33209 家兔血清および抗 *R. salmoninarum* ATCC 33209 ウサギ血清の硫酸分画 IgG との反応性を表5に示した。分離菌の生菌，ホルマリン死菌，加熱死菌を用いた吸収操作によっても FAT による反応性は消失しなかったが，抗 *R. salmoninarum* ATCC 33209 ウサギ血清の硫酸分画 IgG との FAT による反応は陰性となった。

表4 分離菌 *Pseudomonas* sp. SK-8501株抗原の熱安定性  
Table 4. Heat stability of *Pseudomonas* sp. SK-8501 antigen

	FAT reaction*1
untreated	+
heat fixed*2	
5 sec	+
10 sec	+
15 sec	+
20 sec	+
25 sec	+
30 sec	+
100°C 30 min.	-

\*1 : with anti-*R.salmoninarum* ATCC 33209 rabbit serum

\*2 : by flame

硫安分画抗 *R. salmoninarum* 家兎血清および抗 Otobe 株家兎血清を用いた FAT 間接法による斜里川カラフトマス腎臓塗抹標本の BKD 再検査の結果：1985年11月のカラフトマスの腎臓塗抹標本について再度硫安分画抗 *R. salmoninarum* ATCC 33209 家兎血清 IgG および抗 Otobe 株家兎血清を用いた FAT 間接法による診断を試みた結果を表6に示した。供試したカラフトマス No.1~30の腎臓塗抹標本のうち、無処理の抗血清で反応陽性を示した8検体はいずれも供試した両血清で反応は陰性となった。

## 考 察

サケマス類の増養殖を計るに際し、その障害となる病原体の分布の実態把握を目的に、1976年から東北部、北海道における採卵親魚の病原体保有状況の調査を実施しているが、1984年からはサケ科魚類の細菌性腎臓病 (BKD) 原因菌を調査対象に加え採卵親魚の腎臓塗抹標本を作成し FAT による検査を実施した。

その過程で1984年斜里川のサケ親魚が、また翌年同河川のサケおよびカラフトマス親魚が、FAT 間接法で BKD 陽性と判定された。しかし両魚種共に腎臓に病変はなく、その後の継続調査でも採卵孵化稚魚に BKD による斃死は観察されず飼育経過も順調であった。

そこで斜里川のサケおよびカラフトマス腎臓中に見られるこれら抗 BKD 家兎血清と FAT 間接法で反応陽性を示した抗原が *R. salmoninarum* 由来か否か、KDM-2 培地を用い原因菌の分離を試みたところ、*R. salmoninarum* は分離されず、抗 BKD 家兎血清と交差反応陽性を示すグラム陰性の運動性を有する細菌が分離された。

このグラム陰性で運動性を有する細菌 SK-8501は、大きさが $0.6\sim 0.7\times 1.0\sim 1.5\mu\text{m}$ で、時に対を成して存在し FAT で *R. salmoninarum* と区別することは困難であったが、その性状から *Pseudomonas* sp. に分類

表5 硫安分画抗 *R.salmoninarum* ATCC 33209 ウサギ血清と分離菌 *Pseudomonas* sp. SK-8501株との FAT 間接法における反応性

Table 5. Reaction between *Pseudomonas* sp. SK-8501 antigen and IgG of anti-*R.salmoninarum* ATCC 33209 rabbit serum by indirect FAT

antigen*	anti- <i>R.salmoninarum</i> ATCC 33209 rabbit serum	
	unpurified	IgG
<i>R.salmoninarum</i> ATCC 33209	+	+
SK-8501	+	-

\* : living cell suspension

表6 硫安分画抗 *R. salmoninarum* 家兎血清および抗 Otobe 株家兎血清を用いた FAT 間接法による斜里川カラフトマス腎臓塗抹標本の BKD 再検査の結果

Table 6. Detection of the BKD antigens in the kidney tissues of matured pink salmon collected at the catching station of Shari River in November '85 by indirect FAT using IgG from anti-*R. salmoninarum* rabbit serum

number of fish employed	anti- <i>R. salmoninarum</i> rabbit serum		
	ATCC 33209		Otobe
	unpurified	IgG	unpurified
30	8	0	0

され *R. salmoninarum* とは明らかに異なる細菌であった。

血清学的には供試した抗 *R. salmoninarum* ATCC 33209 および Otobe 株家兎血清に対して凝集抗体価を示さず、FAT でも供試した抗 BKD 家兎血清のうち抗 ATCC 33209 血清とのみ反応陽性を示し、共同凝集反応やゲル内沈降反応では両血清共に反応陰性であった。また結果には示さなかったが分離菌 SK-8501 の生菌、ホルマリン死菌、加熱死菌を用いた吸収操作によっても抗 *R. salmoninarum* ATCC 33209 家兎血清との FAT における反応性は消失しなかった。しかし抗 *R. salmoninarum* ATCC 33209 家兎血清の硫安分画 IgG では反応を示さなくなった。この理由については現在のところ不明であり、今後検討する必要があると考えられる。SK-8501 の反応抗原は易熱性であったが、通常用いる塗抹標本の火炎固定の場合30秒間の加熱によっても抗原性が残存し、本菌と *R. salmoninarum* との区別には、Otobe 株に対する抗血清を使用するか、抗 *R. salmoninarum* 家兎血清の硫安分画 IgG を用いる必要のあることが明かとなった。もちろん精製抗 *R. salmoninarum* IgG に螢光色素を標識した血清を用いる直接法でも本菌は反応陰性であった。

このように斜里川のサケおよびカラフトマスで FAT 間接法により BKD 陽性と判定された抗原は、BKD 原因菌 *R. salmoninarum* 由来でなく、FAT で交差反応を示す *Pseudomonas* 属細菌由来であることが明らかとなり、先の判定は偽陽性と結論づけられた。

なお、日常の BKD 検査では FAT で明らかに形態の異なるいくつかの細菌が反応陽性を示すことがあり、Austin (1985) も FAT で反応陽性を示すグラム陽性の細菌を分離している。今後これらの細菌と *R. salmoninarum* との血清学的関係についても検討する必要があると考える。

## 謝 辞

本研究の遂行に当たり貴重な試料の提供および試料採取に際し種々ご便宜を計って頂いた北海道さけ・ますふ化場北見支場斜里事業場長、坂口利夫氏および同場関係各位ならびに北海道さけ・ます増殖事業協会網走支所斜里捕獲採卵場長、鎌口憲治氏および同協会関係各位に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- Austin, B., D. Bucke, S. Feist and J. Raymeno (1985): A false positive reaction in the indirect fluorescent antibody test for *Renibacterium salmoninarum* with a "Coryneform" organism. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.*, 5, 8-9.
- Evelyn, T. P. T. (1977): An improved growth medium for kidney disease bacterium and some notes on using the medium. *Bull. Off. int. Epiz.*, 87, 511-513.
- 木村喬久・吉水 守・原 武史 (1987): サケ科魚類の細菌性腎臓病 (BKD) の診断技法, 水産増養殖叢書.

BKD原因菌と共通抗原を有する細菌の存在について

35, 社団法人 日本水産資源保護協会, p.61.

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**. 1173-1183.

Yoshimizu, M. and T.Kimura (1985): A coagglutination test with antibody-sensitized staphylococci for rapid and simple diagnosis of bacterial and viral disease of fish. *Fish Pathology*, **20**. 243-261.