

## サケ・マス採卵親魚からのせっそう病原菌 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* の検出法

野村哲一<sup>\*1</sup>・吉水 守<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup> 062-0922 北海道札幌市豊平区中の島2-2 独立行政法人さけ・ます資源管理センター 調査研究課

<sup>\*2</sup> 041-8611 北海道函館市港町3丁目1-1 北海道大学大学院水産科学研究院 海洋応用生命科学専攻

キーワード: *Aeromonas salmonicida* の検出, CBB 培地, 病原体保有状況調査

はじめに

サケ・マス類の病原体保有状況調査の必要性, 手法については吉水・野村(1989)に述べられている。著者らは従来から吉水・野村(1989)に従い長期に多くの河川に遡上したサケ, カラフトマス, サクラマス, ベニザケの病原体保有状況調査を継続してきた。長期に継続している調査において, 体腔液の採集方法や魚類病原ウイルスの検出手法には吉水・野村(1989)から変更はない。

せっそう病の原因菌である *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (以下本菌とする) の検出率調査は吉水・野村(1989)では腎臓からの検出方法が簡単に記載されているにすぎない。従来腎臓が本菌分離部位として病魚の診断や原因菌の検出に多用されているのは, 病魚では腎臓での本菌生菌数が多いことと, サケ科魚類では腎臓は開腹後も浮き袋や腹膜で覆われていることから, 体表や腹腔内の細菌により汚染されることが少ないことからである。しかし近年の調査で本菌の不顕性感染魚(本菌を保有しているが外観からはせっそう病の症状が観察されない個体; キャリアー)に関する調査では, 腎臓だけではなく鰓や体表および腸管さらに体腔液に関する調査も重要であることが示唆されている (Cipriano and Bertolini 1988)。

本菌は市販の普通寒天培地やトリプトソイ寒天培地などの標準的な培地で良好な発育を示す。20℃での培養を開始して72時

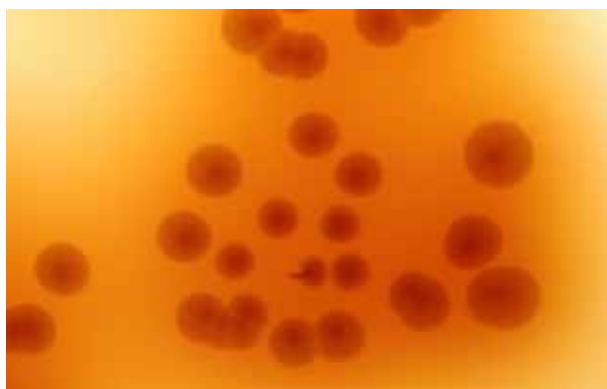


図1. 普通寒天培地に増殖したせっそう病原菌 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. 特徴的な水溶性の褐色々素が産生され, 培地を褐色に染める。

間後ごろから図 1 に示したような特徴的な褐色の水溶性色素を産生して培地をチョコレート色に染めることから検出は容易とされている。病魚ではほぼ純粋に本菌が腎臓から出現することから、コロニーを選択して純培養することは容易である。

しかし、鰓や腸管および体表などの本菌以外の細菌が多い部位からの検出では、本菌のよい指標となる褐色色素の産生が抑制され、形状や色の類似したコロニーから本菌コロニーを選択することは困難となる。また、親魚における保有状況調査では一調査時に60尾から個別に、腎臓、鰓、腸管と合計180枚もの平板培地に試料が塗抹されることから、平板培地に出現するコロニーから本菌コロニーの選択には多くの労力と時間が必要となる。より効率的な本菌コロニーの選択ができれば本菌保有状況調査の効率の向上を図ることが可能となる。

他の細菌が存在する試料から本菌のみを増殖させる、いわゆる選択培地の検討も過去には実施されたが実用となる培地はまだ見いだされていない。

この報告ではさけ・ます資源管理センター健康管理研究室と北海道大学が共同で実施している病原体保有状況調査において(野村ら 2002)、他の細菌が混在する材料からの本菌検出の効率化を目的として使用してきた CBB 培地について作成法や使用法を紹介したい。

#### CBB 培地

本菌は菌体外部に59 kDa の分子量を持つ A-layer と呼ばれるタンパク質を持っている。このタンパク質は病原性との関連やワクチン抗原としての応用などの観点から関心を集め検討がされているが、菌体同士が凝集し固まりを作る現象(自発凝集性)を起こす因子ともなっている。この A-layer はコンゴレッド (Congo Red) やクマシーブリリアントブルー (Coomassie Brilliant Blue: 以下 CBB とする) と強く結合する。CBB 培地は本菌のこの A-layer の持つ CBB に対する強い親和性を利用して平板培地上に出現する多数のコロニーから効率的に本菌コロニーを選択することを目的としてアメリカ合衆国 Leetown 研究所の Dr. Cipriano により作成された (Cipriano and Bertolini 1988)。

#### CBB 培地の作成

CBB 培地の基本となる基礎培地には、栄研化学普通寒天培地、Difco 社普通寒天培地、栄研化学トリプトソイ寒天培地、Difco 社のトリプトケース寒天培地を使用したがいずれも良好な結果を得ている。CBB としては和光純薬製の Coomassie Brilliant Blue R250 (カタログ番号 031-17922) または Sigma 社の Brilliant Blue R: C. I. Brilliant Blue R 250 (カタログ番号 B-0149) を使用している。培地、色素とも記載のものに限定されるものではないと推定されるが、著者らの使用した経験の製品を記載した。色素使用時の簡便性を図るため、CBB はあらかじめ1g/100 ml の濃度の水溶液を作成しておき冷蔵庫に保存しておく。前記基礎培地に培地1 L あたり前記した CBB 水溶液10 ml を添加した後、常法に従い121 °C で15分間高圧蒸気滅菌を行う。滅菌後培地が70 °C 前後に冷えてから滅菌シャーレに流し込み平板とする。現場での使用では輸送やインキュベーターへの収容時のスペースについても考慮し、深さ10 mm の滅菌プラスチックシャーレを使用している。培地が十分固化した後乾燥を行う。培地中の過剰の水分は現場

において結露を生じる元となり，輸送中に単離されたコロニーの混合が起こるなどの取り返しのつかない失敗となるので乾燥は過剰とならない範囲で十分行う．クリーンベンチ内で30分の乾燥を基準としているが，使用する設備であらかじめ最適な乾燥時間を検討する必要がある．現場への輸送は振動によりシャーレの蓋が開くと汚染の原因となるのでアルミ箔等でしっかり包装する．輸送中の温度の変化も結露の原因となるので保温性の高い容器に入れ振動をさけ輸送する．

#### 腎臓からの分離

木製の柄のついた滅菌綿棒を用いて行う（図2）．採卵後のメス親魚では腹膜を除去し図3のように腎臓の中央部を露出させ，綿棒を差し込んで腎臓の一部を採取する．体腔液や親魚の体表の水分が腎臓表面を汚染する可能性があるため，腹膜の除去から腎臓の穿刺までは可能な限り速やかに行う．汚染をさけるため綿棒の先端等の腎臓を採取する部分は手や他の部分には触れさせないように注意する．



図2 腎臓からの細菌の採取に使用される綿棒（下段）と腸管からの細菌の採取に使用されるプラスチック製滅菌エーゼ（上段）．綿棒は10本，滅菌エーゼは25本が滅菌され一袋となっている．



図3 親魚からの滅菌綿棒を用いての腎臓標本の採取．浮き袋と腹膜を除去後すみやかに綿棒により腎臓の一部を採取する．

#### 鰓からの分離

腎臓と同様に綿棒を用いる．鰓蓋を持ち上げ滅菌綿棒で鰓の表面を数回ぬぐい試料を採取する．

#### 腸管からの分離

腸管の表面を70%アルコール綿で拭き消毒をする．滅菌したメスや滅菌注射針の先端部分を用いてアルコール綿で消毒した部分の腸管を約1 cm 切開しプラスチック製滅菌エーゼ（旭テクノグラス；イワキ イノキュレーティング ループ；カタログ番号 INO-001）（図2）を用いて腸管内容物を採集する．

### 体腔液からの分離

滅菌チップと自動ピペットを用いて吉水・野村（1989）に従い体腔液を採取する．ウイルス検査用試料とは異なり採取後の抗生物質の添加はできないので可能な限り外部からの汚染をさける．総排泄口の周辺の水分を滅菌した紙タオルで除去し，70%アルコール綿での消毒を実施する．

### 培養期間とコロニーの選択

CBB 培地は前記したように本菌の産生する A-layer と CBB の親和性を利用しているため A-layer の産生が促進される15 で培養する．長期間培養すると本菌以外の菌のコロニーも濃紺色に着色するため，培養5日後に図4に示した濃紺色のコロニーから釣菌して純培養を行う．判定基準としては明瞭な透明感のある濃紺色のコロニーを選択するが，本菌は硬いコロニーを形成することからエーゼでの感触でも補助的に判定することができる．

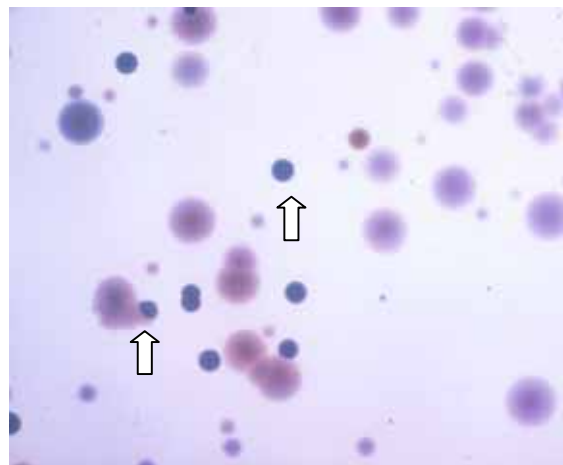


図4．CBB 培地で培養されたベニザケ鰓表面のサンプル．矢印の濃紺色のコロニーがせつそう病原菌 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ．

### 純培養

前記の選択されたコロニーについてCBB を含まない普通寒天培地もしくはトリプトソイ寒天培地を用いて純培養を行う．CBB 培地は本菌抽出の効率化を目的とした培地であり本菌のみを培養する培地ではないため，純培養の操作は必ず必要である．

### 同定

生化学的性状検査および蛍光抗体法および PCR 法等の方法が応用できる (Cipriano 2001, Byers et al. 2000) ．

### CBB 培地応用の留意点

本培地は選択培地ではないので自発凝集性を示さない *Aeromonas salmonicida* およびその亜種には応用することができない．現在までサケ親魚から検出された本菌はすべて強い自発凝集性を示していることから問題は少ないが (Nomura et al. 1994) ，茂木ら (1995) により報告されているように養殖魚からは自発凝集性を示さない株も分離されていることから注意が必要である．自発凝集性を示さない株の存在が予想されるときは Yoshimizu et al (1992) の ELISA 法等の応用が必要となる．

## まとめ

本稿では採卵親魚における病原体保有状況調査方法について吉水・野村(1989)以後に行ってきたせつそう病原菌の調査方法を記載した。ともすれば病原細菌の培養を省略し,PCR法などの応用が行われる。しかし,病原微生物に関する調査の基本は,培養が可能であれば培養により検出することであり,せつそう病にかぎらず,本稿で紹介したCBB培地のように現場での使用により調査がより効率的に精度向上をはかれる培養法の検討が他の魚類病原微生物についても今後とも必要となる。

## 引用文献

- Byers, H. K., N. Gudkovs and M. S. Crane. 2000. Diagnosis and identification of *Aeromonas salmonicida* and detection of latent infections in carrier fish. Final Report of FRDC Project Number; 95/060. ISBN 646 06622 5. 102pp.
- Cipriano, R. C. 2001. Furunculosis and other diseases caused by *Aeromonas salmonicida*. Fish Diseases Leaflet No. 66. United States Dept. of the Interior; U. S. Geological Service, National Fish Health Research laboratory, Kearneysville, W. V.
- Cipriano, R. C. and J. Bertolini. 1988. Selection virulence in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* using Coomassie brilliant blue agar. J. Wildlife Dis., 24:676-678.
- 茂木省三・野村哲一・吉水 守. 1995. *Aeromonas salmonicida* の自発凝集性に及ぼす分離培養温度の影響. 魚病研究, 30: 67-68.
- 野村哲一・本間裕美・笠井久会・吉水 守. 2002. CBB 培地による河川および沿岸で採取されたサケ (*Oncorhynchus keta*) からのせつそう病原菌 *Aeromonas salmonicida* の検出. 北大水産彙報, 53: 45-50.
- Nomura, T. M. Yoshimizu, M. Moki and Y. Ezura. 1994. Existence of non-agglutinating *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in strains isolated from salmonids in Yamagata prefecture, Japan. Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatch., 48:23-29.
- 吉水守・野村哲一. 1989. サケマス採卵親魚の病原微生物検査法. 魚と卵, 158: 49-59.
- Yoshimizu, M., S. Direkbusarakom, T. Nomura, Y. Ezura and T. Kimura. 1992. Detection of antibody against *Aeromonas salmonicida* in the serum of salmonid fish by the enzyme linked immunosorbent assay. Gyobyu Kenkyu, 27: 73-82.