サケ科魚類の細菌性腎臓病

木村 喬久*

Bacterial Kidney Disease of Salmonids

Takahisa KIMURA

Lab. of Microbiol., Fac. Fish., Hokkaido Univ., Hakodate, Hokkaido, Japan

The first outbreak of bacterial kidney disease of salmonid (BKD) in HOKKAIDO, Japan occurred in the autumn of 1973. Subsequently, nine outbreaks of BKD were confirmed in Hokkaido and recently occurrence of this disease in the mainland of Japan was also documented by the author.

Currently, this disease is being monitored with keen interest in Japan.

In this review, the pathology of the infected fish, causative organisms and therapeutic or preventing measures of BKD based on previous reports are discussed. The advantage of two diagnostic techniques (a precipitation reaction and a coagglutination test by specific antibodies absorbed protein A-containing staphylococci with heat extracted antigen of BKD) are presented.

サケ科魚類の細菌性腎臓病 (BKD) は Dee Disease とも呼ばれ、古く 1930 年代にほぼ時を同じくして、スコットランドならびに米国において発見された (SMITH, 1964; BELDING & MERRILL, 1935).

本病は慢性的な全身の感染症で他の細菌性疾患やウイルス性の疾患にみられる様な劇的な養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、サケ科魚類における難病の一つと考えられている (BULLOCK *et al.*, 1971). その後カナダ (BELL, 1961; PIPPY, 1969; EVELYN, *et al.*, 1971; YAMAMOTO, 1975) や最近ではフランス (KINKELIN, 1974) においても本病の発生が報告されている。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 (木村・栗倉, 1977), 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。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様になり、にわかに各方面の注目をあびる様になってきた。

ここでは本病の概要について既往の研究ならびに著者の知見をとりまげて紹介し、さらに本病の血清学的診断法の最近の知見を紹介して、わが国における本病防疫の一助としたい。

疾 病 の 概 要

本病は後に述べるように原因菌の発育温度が低いことから一般に低水温期に発生が多い。

春先や水温の 10°C 前後となる秋に多発する。流行当初の斃死率はそれ程高くないが、時間が経つにつれて次第に激しさを増す。魚種にもよるが、本病の流行が水温約 13~18°C の時期に発生すると伝播は加速的で被害も極めて大きい。Table 1 ならびに 2 に 1973 年北海道において淡水飼育中のマスノスケならびにヤマベに本病の発生した際の斃死の状況を示す。この養魚場は飼育に湧

Table 1. Mortality in the 1973 brood of chinook salmon at the Chitose Branch of the Hokkaido Fish Hatchery infected with BKD

Month	Population at beginning of month	Percent mortality during that month	Average body weight (g)
1973 August	11,000	9.1	2.53
September	10,000	8.9	3.75
October	9,113	2.5	7.3
November	8,953	5.1	6.9
December	4,423	33.1	7.2
1974 January	3,918	12.9	7.6
February	3,413	1.3	6.6

* 北海道大学水産学部微生物学講座

水を利用しており水温は年間を通じ 8°C 前後であった。マスノスケでは 12 月をピークにして約半年間で累積約 70% の斃死をみ、ヤマベでは月間斃死率が数%で、一年間に累積約 40% の斃死をみている。最近 SANDERS *et al.* (1978) はギンマスなどを供試して人為的な原因菌接種後の発病と水温との関係を観察し、Table 3 に示す様な結果を得ている。この結果にも明らかな様に水温

Table 2. Mortality in the 1972 brood of masu salmon at the Chitose Branch of the Hokkaido Salmon Hatchery infected with BKD

Month	Population at beginning of month	Percent mortality during that month	Average body weight (g.)
1973 February	142,309	1.4	6.7
March	140,298	5.0	7.6
April	133,250	6.0	8.8
May	125,272	5.7	14.7
June	118,161	4.3	20.8
July	113,045	4.2	25.6
August	108,049	4.0	29.2
September	95,307	3.1	33.0
October	92,126	3.0	34.4
November	89,440	2.5	39.5
December	87,210	2.3	41.5
1974 January	85,167	1.7	44.0
February	83,740	1.1	46.2

12°C 前後における斃死率が最も高く、また水温により菌接種から斃死に至るまでの期間がかなり相違し、18~20°C の水温で最も短く、3.9°C の様な低い水温では斃死まで 2 カ月以上を要することを明らかにしている。

病魚の外観所見ならびに解剖所見について著者の観察結果を整理すると Table 4 に示す如くである。すなわち病魚に共通して観察される所見は、腎臓、特に後腎部にみられる白色の隆起した瘤または結節様の病変で、これは通常、細胞崩壊物や白血球、菌などからなるざらざらした感じの液体を含んでいる。同様の所見は肝臓あるいは脾臓などにも時々観察される。また肝臓は一般にパール色を呈し、極度の貧血状態が推察される。一部の病魚では眼球突出症状が認められ、また腹水増量のため腹部の膨満を呈するものも多い。魚種によって相違するが、特にヒメマスの病魚では鰭基部の充出血や皮下のミミズバレなどが観察され、このミミズバレは穿孔して腎臓の病変部と連結していることが多い。なお SMITH (1964) は内臓表面に白色の偽膜の形成を認めており、その形成と水温との関係を観察し水温の低い場合にこの症状のみられることが多いと報告している。本病の病理組織学的検討については WOOD & YASUTAKE (1955) の詳細な報告がある。著者の観察では腎臓病変部のヘマトキシリン・エオジン染色標本には、明瞭な肉芽腫様病変が認められ、グラム染色標本ではその病変部の中心部にグラム陽性物質の充満がみられ、強拡大でその周辺部に

Table 3. Effect of water temperature on mortality of juvenile coho salmon experimentally infected with the causative agent of BKD (strain HR 4-67) (by SANDERS *et al.*, 1978)

Water temp (°C)	Fraction of each group that died ^a				% mortality: 2 expt combined ^{b,c}		% deaths due to bacterial kidney disease		Mean time from infection to death (days)
	Expt 1		Expt 2		Infected	Controls	Infected	Controls	
	Infected	Controls	Infected	Controls					
20.5	5/21	1/20	5/23	2/23	14	0	60	0	23
17.8	10/22	0/23	12/22	2/22	41	0	82	0	24
15.0	23/25	0/25	15/25	0/25	76	0	100	0	34
12.2	21/21	0/25	21/21	0/25	100	0	100	0	37
9.4	25/25	3/23	22/23	0/25	98	2 ^d	100	33 ^d	51
6.7	21/21	0/25	20/23	1/25	93	2 ^d	100	100 ^d	71
3.9	11/22	0/23	15/19	1/24	63	0	100	0	81

^a All groups of fish were held at the indicated temperature for 112 days.

^b Only dead fish in which the specific pathogen was demonstrated at necropsy were considered in calculating percent mortality.

^c The least significant difference between percent mortality values was determined by analysis of variance to be 20.18% at $P=0.05$.

^d These control fish were found to be infected with the causative agent of bacterial kidney disease.

多数のグラム陽性微小桿菌の存在が観察された。なお脾組織などでは細胞内にも多数のグラム陽性桿菌の存在が観察されたが、最近 YAMAMOTO (1975) は電顕観察により KD 菌の細胞内寄生を証明している。

以上のように内臓諸組織の著しい病変のため、必然的に造血作用などに激しい影響をうけ、病魚のヘマトクリット値や血清蛋白の異状が Table 5, Fig. 1 に示すごとく認められ、この事実はずでに HUNN (1964) によっても指摘されている。

また EVELYN (1971) は KD 菌によるベニマスの免疫応答について検討し、免疫開始後約 60~90 日で凝集素

価のかなりの上昇を認めているが、著者らは本病発生中のヤマベ集団から無作為に抽出した 6 尾の供試魚の血清について KD 菌に対する凝集素価を測定し、Table 6 に示すごとく、高いものでは 1:3240 の凝集素価を認めている。

ところで本病は前述のようにサケ科魚類の疾病と考え

Fig. 1. Electrophorogram of plasma proteins from normal and diseased chinook salmon infected with BKD.

Table 4. Macroscopic symptoms of the diseased fish infected with BKD

Symptom	Occurrence
Popeye	few cases
Abdominal inflation	often
Abdominal dropsy	often
Petechiae in the base of fin	in some cases
Sub-cutaneous welts	in some cases
White boil in the posterior-kidney	common
White boil in the other organs	in some cases
Pale liver	common
Hemorrhagic inflammation of body cavity and internal organs	in few cases

Table 5. Hematocrit and total serum protein value of normal and diseased chinook salmon infected with BKD

Fish	No. of fish	Hematocrit value (%)		Total serum protein (g/dl)	
		Range	Average	Range	Average
Diseased fish	5	13.8-37.0	22.6	1.6-4.3	3.4
Normal	6	35.0-46.6	44.4	6.6-8.3	7.6

Table 6. Agglutinin titer of masu salmon sera, collected from the prevailing endemic population, against isolates and reference organisms

Antigen	Serum No.					Reference anti ^{*1} KD serum
	1	2	3	4	5+6 ^{*2}	
Isolates	1:1080	1:3240	1:1080	1:1080	1:360	1:3240
<i>Aeromonas hydrophila</i>						
IAM 1018	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40
<i>A. salmonicida</i>						
ATCC 14174	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40
<i>Vibrio anguillarum</i>						
NCMB 6	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40

*1 Artificial immunized sockeye salmon serum, provided by Dr. EVELYN, FRB Canada.

*2 Pooled two fish sera.

られているが、サケ科魚類の中でも感受性は魚種によって異なり、マス類よりもサケ類(太平洋ザケ、大西洋ザケ)の方が感受性が高く、一般にニジマスは抵抗性が高いと言われている (WOLF, 1970)。わが国において著者が現在までに本病を証明し得た魚種はギンマス、マスノスケ、サケ、カラフトマス、ヤマベ、ヒメマスならびにニジマスの8魚種である。なお前述のように慢性の疾病であることから生後6カ月未満の幼稚魚では本病の発生が少い。また最近 SUZUMOTO *et al.* (1977) は比較的感受性の高いギンマスにおいても系統群により感受性が異なり Transferrin genotype CC が AA 群や AC 群に比し抵抗性の高いことを認めている。

原 因 菌

本病の原因菌は大きさ $0.3 \sim 0.5 \mu \times 0.5 \sim 1.0 \mu$ の微小な非運動性、グラム陽性の桿菌で多くの場合双桿状を呈する。この菌の培養はきわめて難しく EARP *et al.* (1953) が細断したニワトリ胚体組織を培地として最初に培養に成功したが、その後 ORDAL & EARP (1956) は塩酸システィンと高濃度のヒト血液を含む人工培地による培養に成功した。EVELYN (1971) はこの培地の血液を血清と置換した改良培地を考案し、また WOLF & DUMBAR (1959) は塩酸システィンを 0.1% の割合に添加したミュラー・ヒントン培地にも KD 菌が発育することを見出し、

これを本菌の薬剤感受性試験に利用している。なお最近 BULLOCK *et al.* (1974) はこれらの培地における KD 菌の発育を比較しミュラー・ヒントン培地のロットにより発育がかなり相違することを見出している。しかし、いずれにしろ本菌の発育が培地上に認められるようになるまでには数週間を要する。また 37°C では全く発育し得ず、適温は $15 \sim 18^{\circ}\text{C}$ と考えられている。以上のように KD 菌の培養がきわめて困難であることが災いしてこの菌の詳細な性状については不明な点が多く、一時はリケッチャではないかとも考えられていたが、現在では種未定の *Corynebacterium* 属の細菌と考えられている。以上のように原因菌の性状がほとんど明らかにされていないことが本病防疫上の最も大きな障害と考えられる。Table 7 に SMITH (1964) ならび ORDAL & EARP (1956) により記載されたわずかばかりの性状を整理して示した。なお最近 BULLOCK *et al.* (1974) は 10 株の KD 菌分離株を供試し血清学的性状を比較検討して、これら KD 菌は血清学的性状の均一であることを明らかにしている。

治 療・予 防

前述のごとく本病が慢性的な疾病である点や、原因菌が細胞内にも寄生するらしいこと、また潜伏期間がきわめて長く病魚を発見出来る時期には同一集団の魚が殆ん

Table 7. Some characteristics of the BKD organisms
(by ORDAL & EARP, 1956; SMITH, 1964)

Morphology	
Shape	short rod, $0.3-0.5 \mu \times 0.5-1.0 \mu (0.6-1.0 \times 1.5)$
Motile	—
Gram	+
Capsulate	—
Acid-fast	—
Sporing	—
Branching	—
Colonial appearance	
Color	white and shiny
Shape	round and raised
Size	varying
Growth temp.	
Growth at 5°C	+
Growth at 15°C	(very slowly)
Growth at 22°C	+
Growth at 37°C	(well)
Biochemical properties	
Gelatin liquefaction	+
Proteolysis (in litmas milk)	+
Catalase	+

Table 8. Results of using the disk method of sensitivity testing for
34 therapeutic agents on 16 strains of the BKD organisms
(by WOLF and DUNBAR, 1959)

Therapeutic agents tested	Concentration drug per disk (micrograms)	Highly sensitive	Slightly sensitive	Resistant	Data not obtained
Sulfonamides					
sulfadiazine	300	2/16	13/16	1/16	0/16
sulfamerazine	300	2/16	14/16	0/16	0/16
sulfamethlthiadiazole	300	1/16	15/16	0/16	0/16
sulfadimetine	300	1/16	14/16	1/16	0/16
sulfathiazole	300	1/16	15/16	0/16	0/16
sulfisoxazole	300	1/16	14/16	1/16	0/16
triple sulfa	300	1/16	15/16	0/16	0/16
Nitrofurans					
nitrofurantoin	300	16/16	0/16	0/16	0/16
nitrofurazone	300	16/16	0/16	0/16	0/16
Other Agents					
2-acetyl amino-5-nitrothiazole	100	4/16	12/16	0/16	0/16
isonicotinoyl hydrazide	35	0/16	9/16	6/16	0/16
para-aminosalicylic acid	100	0/16	8/16	7/16	1/16
2-phenoxyethanol	0.02	16/16	0/16	0/16	0/16
Antibiotics					
bacitracin	20*1	16/16	0/16	0/16	0/16
candicidin	*2	14/16	1/16	0/16	1/16
carbomycin	15	16/16	0/16	0/16	0/16
chloramphenicol	30	16/16	0/16	0/16	0/16
chlortetracycline	30	16/16	0/16	0/16	0/16
chlortetracycline, calcium	100	16/16	0/16	0/16	0/16
cycloserine	100	0/16	2/16	14/16	0/16
dihydrostreptomycin	100	3/16	11/16	2/16	0/16
erythromycin	15	16/16	0/16	0/16	0/16
eulicin	100	0/16	9/16	7/16	0/16
filipin	100	0/16	5/16	11/16	0/16
fungichromin	40	3/16	12/16	1/16	0/16
neomycin	30	0/16	7/16	9/16	0/16
novobiocin	15	16/16	0/16	0/16	0/16
oxytetracycline	30	16/16	0/16	0/16	0/16
penicillin	10*1	5/16	11/16	0/16	0/16
polymyxin B	30	0/16	2/16	14/16	0/16
streptomycin	100	16/16	0/16	0/16	0/16
tetracycline	30	16/16	0/16	0/16	0/16
thiocymetin	100	16/16	0/16	0/16	0/16
viomycin	100	0/16	6/16	10/16	0/16

*1 Units, *2 Granule.

ど全て感染してしまっていることなどの為に、細菌性魚病の中でも特に治療の困難な疾病と言われている。特に潜伏期間の長いことは実験的に治療法を検索することを困難にしている。

WOLF & DUNBAR (1959) は前述のように KD 菌の *in vitro* における各種化学療法剤の感受性を検討し、Table 8 に示すような結果を得ているが、この研究は

KD 菌の培養が困難なことから *in vitro* におけるこの種の研究の唯一のものである。彼らはこの結果を基礎として BKD の治療試験を実施し、結論としてエリスロマイシンの 100 mg/kg/day の割で 21 日間投与することを推奨している。

また RUCKER *et al.* (1951) はスルファダイアジンを 250 mg/kg/day の割で 15 日間以上投与することを、

ALLISON (1958) はスルファメラジンの単用またはスルファダイアジンとの併用でやはり 250 mg/kg/day, 21 日間投与することを推奨しており, SNIESZKO & GRIFFIN (1955) もサルファ剤の長期間投与を奨めている。しかし, いずれの場合にも薬剤の投与により治療が一応成功したかにみえるが, 投薬を中止すると疾病が再発することの多いことが知られている (WOLF, 1970)。従って本病の対策としては予防面に重点をおく必要がある。

本病の最も効果的な予防対策確立のためには, 先ず原因菌の性状を明らかにしなければならぬことは言うまでもないが, 本病の感染 (流行) の機序に関する知見を基礎とすべきことも当然である。しかしこの点に関しても不明な点が多くあまり明確にされていない。

一つの予想される伝播経路として卵經由が考えられる。ROSS & SMITH (1972) はこの観点から, 卵消毒剤としてのヨード剤の KD 菌に対する消毒効果を観察して効果的であることを報告している。また WARREN (1962) は硬水の用水より軟水の養魚用水の方が BKD 発生率の多いことを認めている。前述の水温と流行との関連において飼育用水の改良も一つの予防方法となり得てであろう。

また前述の SUZUMOTO *et al.* (1977) の報告にみられるように本病の感受性の低い genotype の存在が推察されることから耐病種の開発も予想される一つの予防手段と考えられる。なお, 前述のようにサケ科魚類が明らかに KD 菌抗原に対して免疫応答を示すことから予防免疫に関する検討も今後に残された一つの課題と考えられる。

しかし, いずれにしろ現時点では本病の未だ非汚染の養魚場では他から病魚を持ち込まぬようにし, もしすでに発生しているならばこれを他にまき散らさぬようにすることが最も基本的な防疫法であることは言うまでもない。

そのためには病魚や保菌魚を早期にしかも的確に診断することが要求される。

診断法に関する最近の知見

本病原菌の培養がきわめて困難であることから, 従来, 本病の診断は主として病魚材料中の原因菌の顕微鏡観察に頼ってきた。しかし本菌の大きさや形状が魚類腎臓などの塗抹標本中によくみられるメラニン顆粒とよく似ている点や, GREY & KILLINGER (1966) により報告されている *Listeria* sp. など他のグラム陽性の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

Table 9. A comparison of gram stain and indirect fluorescent antibody technique (FAT) for detection of the kidney disease *Corynebacterium* in trout kidneys (by BULLOCK & STUCKEY, 1975)

Species	Source	Sample	Gram stain	FAT ^a
Rainbow trout (<i>Salmo gairdneri</i>)	Iowa	1	—	+
		2	+	+
		3	+	+
	Arizona	1	+	+
		2	?	+
		3	—	+
	Utah	1	—	+
		2	—	+
		3	—	+
Brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	Wyoming	1	—	+
		2	+	+
	Colorado	1	+	+
		2	+	+
	Pennsylvania	1	+	+
		2	+	+
Total positive			7	13

^a Using rabbit or goat anti-KD serum and appropriate labeled immunoglobulin. The corynebacterial cells in all smears showed a +3 or +4 fluorescence.

言わざるを得ない。

最近 BULLOCK *et al.* (1974), 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血清学的手技の導入について検討し, KD 菌の懸濁液または原因菌を含む病魚患部のホモゲネートと抗 KD 菌血清がゲル内沈降反応において特異的沈降線を形成することを応用する診断法を考案し, この方法が BKD 診断にきわめて効果的であると述べている。またその後 BULLOCK & STUCKEY (1975) はさらに本病の診断に蛍光抗体法 (FAT) の導入を試み, Table 9 に示すように FAT 法と従来のグラム染色による KD 菌の検出結果を比較して, より FAT 法が優れており, また短時間内に診断を得ることの可能なことを報告している。しかし前者の方法では新鮮な検体を必要とし, また後者の場合には特殊な実験器具の使用が要求され, 多くの養魚場が僻地に位置する現状を考慮すると, 実際面ではいくつかの問題点をはらんでいる。

そこで著者らは以上の観点から BULLOCK らのゲル内沈降反応について試料 (抗原) の調製法の改良について検討を加えた (木村・坂井, 1975)。

先ず Table 10 に示すような方法でそれぞれ調製方法の異なる 5 種の KD 菌抗原を調製した。このようにして調製した KD 菌懸濁液ならび KD 菌加熱抽出抗原と抗

Table 10. Precipitin band formation in agar by various BKD antigen with anti BKD sera

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

*¹ Anti BKD strain Marimo.*² Anti BKD provided by Dr. BULLOCK of EFDL U. S. A.*³ Provided by Dr. EVELYN of FRB Canada.**Table 11.** 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 (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	+
	4	+	+	+
	5	+	+	+
	6	+	+	+
	7	+	+	+
Kokanee salmon (<i>Oncorhynchus nerka</i>)	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	+
Pink salmon (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>) reared in fresh water	1	+	+	+
	2	—	—	—
	3	—	—	—
	4	—	—	—
	5	—	—	—
	6	—	—	—
	7	—	—	—
	8	—	—	—
	9	—	—	—
	10	—	—	—
Pink salmon reared in sea water	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	±	+

KD 菌血清とはマイクロオクトローニー法により明瞭な一本の沈降線を形成し、沈降線はいずれも完全に連結した。また病魚患部摩砕物の懸濁液抗原、冷抽出液抗原ならびに加熱抽出抗原の反応の場合にも明瞭な沈降線の形

成が認められた。以上の結果を整理すると Table 10 に示すごとくである。すなわち KD 菌の本反応に関与する抗原物質は加熱に対して安定であることが明らかとなった。

次に本反応の特異性を明らかにするために6種の対照菌抗原と抗KD菌血清との反応を観察した結果、いずれの対照抗原とも反応は陰性であり、この反応の特異性が確認された。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たゲル内沈降反応による本病診断の可能性が示唆されたので、次いで北海道各地で本病の発生した種々の魚種について、肉眼的症状や従来のグラム染色標本による診断結果と本法による結果の比較検討を行ってTable 11に示すごとき結果を得た。すなわちこれらの結果はよく一致し、特に従来の診断法では不明瞭な試料でも、本法では明らかに陽性の結果を得た。以上の結果から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り、また遠隔の養魚場から加熱処理をして、ある程度の保存性を付与した試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確な診断が可能であることを明らかにし得た。ところでこのゲル内沈降反応にはある程度高濃度の抗原を必要とすることが知られている。そこで抗原濃度に関する若干の検討を行った結果、純培養の菌体湿重量に対しては1:80稀釈まで、定型的症状を呈した病魚腎臓試料では1:18稀釈までの抗原量で沈降線の形成が認められるが、それ以上に稀釈された抗原では陰性の結果を示

すことが明らかとなった。すなわち本法によるBKDの診断には可及的高濃度の加熱抽出液が必要であり、感染初期の病魚や保菌魚の検出には未だ問題のあることが推察された。

最近、*Staphylococcus aureus* のある種の菌株 (COWAN I型) の細胞含有特異蛋白質 Protein A が IgG の Fc 部分の特異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 をヒトの *Neisseria* 感染症の迅速診断に応用する試み (DANILSSON *et al.*, 1974) などが報告されている。そこで著者は次にこの方法の BKD 診断への応用について検討を行った (木村・吉水, 1977)。

本方法の原理は、IgG の Fc 部分を吸着した安定化 *staphylococci* 懸濁液が対応する抗原とのみ特異的に反応して coagglutination を示すことによる。なおこの場合の抗原は可溶性のもので、懸濁状のもでも反応可能である。*staphylococci* の安定化と抗血清感作はほぼ EDWARDS & HILDERBRAND (1976) の方法に従った。なお対照として抗KD菌血清のほか正常ウサギ血清、抗 *A. salmonicida* 血清ならびに抗 *V. anguillarum* 血清によって感作したものも供試した。

以上のようにして3種の血清によりそれぞれ感作した

Table 12. Specificity of coagglutination test of various antisera-sensitized *staphylococci*

Organisms tested*1	Anti-serum sensitized			
	EFDL-2*2	AKD-3*3	Ar-3*4	KAY-2*5
<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> ATCC 14174	—	—	+	—
<i>Vibrio metschnikovii</i> IAM 1039	—	—	—	—
<i>V. tyrogenes</i> IAM	—	—	—	—
<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	—	—	—	+
BKD bacterium E-6	+	+	—	—
<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 (1: 100) at 100°C, 30 min.

*2 Anti-BKD provided by EFDL.

*3 Anti-BKD strain Marimo.

*4 Anti-*A. salmonicida* ATCC 14174.

*5 Anti-*V. anguillarum* KAY-2.

Table 13. Comparison of coagglutination test, macroscopic sign, gram stain and precipitin test for detection of BKD in salmon kidney

Specimen	Source	Number of specimen	Positive result			
			Clinical sign	Gram stain	Precipitin test	Coagglutination test
Kokanee salmon (<i>Oncorhynchus nerka</i>)	Chitose	22	7	9	7	12
Kokanee salmon	Erimo	7	7	7	7	7
Coho salmon (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	Kagawa	5	3	—	1	5
Coho salmon	Sarabetsu	9	7	6	3	7
Rainbow trout (<i>Salmo gairdnerii</i>)	Furubira	20	0	0	0	3
Masu salmon (<i>Oncorhynchus masou</i>)	Otobe	10	6	4	4	6

staphylococci とそれに対応する各菌体懸濁液抗原ならびに加熱抽出抗原との相互の交叉反応の結果、それぞれの感作 staphylococci は対応する抗原とのみ特異的に反応を示した。

次いで感作 staphylococci の反応特異性を試験した結果は Table 12 に示すごとくで、明瞭な特異性が観察された。

そこで次に、本法の BKD 診断への応用について次のような実験を行った。先ず定型的な症状を示すヒメマス病魚の腎臓患部から加熱抽出抗原を調製し、その濃度を稀釈により種々に変えて、反応陽性を示すまでの時間との関係を観察した。抗原濃度が高い場合には 30 分間の反応で明瞭な陽性結果が得られるが、抗原濃度が最初の試料の 320 倍～1280 倍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明らかに前述のゲル内沈降反応に比し抗原検出感度の高いことが明らかとなった。なお全く正常と考えられた対照のヤマベ試料ではすべて陰性の結果を示し、また正常ウサギ血清で感作した staphylococci でもすべて陰性であった。次に従来の診断法と本法による診断の結果を比較して Table 13 に示すような結果を得た。すなわち本方法による BKD 検出率は従来の方法に比し明らかに高い結果を示した。

この方法による診断には特殊な実験器具は全く必要とせず、また最終結果を得るまでにわずか 2～3 時間より要しない点などから考えて BKD 診断をより簡易化し得たものとする。今後この方法の応用により BKD 対策がより容易となれば幸いである。

文 献

- ALLISON, L. N. (1958): Multiple sulfa therapy of kidney disease among brook trout. *Prog. Fish-Cult.*, **20**, 66-68.
- BELDING, D. L. and B. MERRILL (1935): A preliminary report upon a hatchery disease of the salmonidae. *Trans. Ame. Fish. Soc.*, **65**, 76-84.
- BELL, G. R. (1961): Two epidemics of apparent kidney disease in cultured pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **18**, 559-562.
- 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.
- DANIELSSON D. and G. KRONVALL (1974): Slide agglutination method for the serological identification of *Neisseria gonorrhoeae* with anti-gonococcal antibodies adsorbed to protein

- A-containing staphylococci. *Appl. Microbiol.*, **27**, 368-374.
- EARP, B. J., C. H. ELLIS and E. J. ORDAL (1953): Kidney disease in young salmon. State of Wash. Dept. Fish. Special Rep. series, No. 1, 1-74.
- EDWARDS E. A. and R. L. HILDERBRAND (1976): Method for identifying *Salmonella* and *Shigella* directly from the primary isolate plate by coagglutination of protein A-containing staphylococci sensitized with specific antibody. *J. Clin. Microbiol.*, **3**, 339-343.
- EVELYN, T. P. T. (1971): The agglutinin response in sockeye salmon vaccinated intraperitoneally with a heat-killed preparation of the bacterium responsible for salmonid kidney disease. *J. Wildlife Diseases*, **7**, 328-335.
- EVELYN, T. P. T., G. E. HOSKINS and G. R. BELL (1973): First record of bacterial kidney disease in an apparently wild salmonid in British Columbia. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **30**, 1578-1580.
- GRAY, M. L. and A. H. KILLINGER (1966): *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bact. Rev.*, **30**, 309-371.
- HUNN, J. B. (1964): Some patho-physiologic effects of bacterial kidney disease in brook trout. *Exper. Biol. Med.*, **117**, 383-385.
- 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.
- 木村喬久・坂井 稔 (1975): 魚病に関する研究 XVII. Bacterial Kidney Disease の血清学的診断法 (その 1). 日本水産学会. 昭和 50 年度春季大会において講演発表.
- 木村喬久・吉水 守 (1977): 魚病に関する研究 XXII. 特異抗体感作 staphylococci による coagglutination test の魚病診断への応用について. 日本水産学会. 昭和 52 年度秋季大会において講演発表.
- KINKELIN, P. (1974): *Corynebacteriose* des salmonides: Premiere observation en France. *Bull. Fran. Piscicul.*, No. 254, 3-8.
- ORDAL, E. J. and EARP (1956): Cultivation and transmission of etiological agent of kidney disease in salmonid fish. *Exper. Biol. Med.*, **92**, 85-88.
- PIPPY, J. H. C. (1969): Kidney disease in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the Margaree River. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **26**, 2535-2537.
- ROSS, A. J. and C. A. SMITH (1972): Effect of two iodophors on bacterial and fungal fish pathogens. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **29**, 1359-1361.
- RUCKER, R. R., A. F. BERNIER, W. J. WHIPPLE and R. E. BURROWS (1951): Sulfadiazine for kidney disease. *Prog. Fish-Cult.*, **13**, 135-137.
- SANDERS, J. E., K. S. PILCHER and J. L. FRYER (1978): Relation of water temperature to bacterial kidney disease in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), sockeye salmon (*O. nerka*), and steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **35**, 8-11.
- SMITH, I. W. (1964): The occurrence and pathology of Dee disease. Scot. Dep. Agr. Fish., Freshwater Salmon Fish. Res., No. 34, 1-12.
- SNIESZKO, S. F. and P. J. GRIFFIN (1955): Kidney disease in brook trout and its treatment. *Prog. Fish-Cult.*, **17**, 3-13.
- SUZUMOTO, B. K., C. B. SCHREEK and J. D. MCINTYRE (1977): Relative resistances of three transferrin genotypes of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and their hematological responses to bacterial kidney disease. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **34**, 1-8.
- WARREN, J. W. (1963): Kidney disease of salmonid fish and the analysis of hatchery waters. *Prog. Fish-Cult.*, **25**, 121-131.
- WOLF, K. (1970): Bacterial kidney disease of salmonid fish. Fish Disease Leaflet No. 8, U. S. Bureau of Sport Fish. and Wildl., Washington D. C., pp. 1-4.
- WOLF, K. and C. E. DUNBAR (1959): Test of 34 therapeutic agents for control of kidney disease in trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **88**, 117-124.
- WOOD, E. M. and W. T. YASUTAKE (1955): Histopathology of kidney disease in fish. *Am. J. Pathol.*, **32**, 845-857.
- YAMAMOTO, T. (1975): Infectious pancreatic necrosis virus and bacterial kidney disease appearing concurrently in populations of *Salmo gairdneri* and *Salvelinus fontinalis*. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **32**, 92-95.