間接蛍光抗体法による細菌性鰓病の原因菌 *Flavobacterium* sp. の検出

許 康俊*¹・若林久嗣*¹

(昭和 62 年 5 月 22 日受理)

Detection of *Flavobacterium* sp., a Pathogen of Bacterial Gill Disease, Using Indirect Fluorescent Antibody Technique

Gang-Joon HUH and Hisatsugu WAKABAYASHI

Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, University of Tokyo,
Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

(Received May 22, 1987)

Flavobacterium sp. is a fastidious bacteria that it is often difficult to detect from the infected fish and its environment. The indirect fluorescent antibody technique (IFAT) was evaluated as a method for solving this problem.

Rabbit antisera of 4 strains of *Flavobacterium* sp. and protein A-FITC conjugate (Pharmacia) were used in this study. Twenty six cultures from 18 species of bacteria other than *Flavobacterium* sp. were tested for cross reaction. The gills and the skin from experimentally or naturally infected fishes were investigated using IFAT, plating method and phase contrast microscope. The water from the fish ponds was also examined.

Results revealed that the sensitivity and specificity of IFAT were capable of detecting the gill disease pathogen from the hosts and the environment.

細菌性鰓病 (BGD) 原因菌 *Flavobacterium* sp. (以下、鰓病菌とする) の分離・培養にはサイトファーガ培地であるいはこの培地に血清、ゼラチン、スターチなどを発育促進のために添加した培地が用いられているが、発育が遅く、また、試料に雑菌が多く含まれていると分離・培養の際にコロニー形成が著しく抑制されるなどの難点がある。

感染部位である鰓表面では菌交代現象が速やかであるため、症状などから明らかに細菌性鰓病と診断されても、原因菌の検出ができないことがしばしば経験される。また、池水などの養魚環境中の分布調査も選択増菌培地が未開発のために困難である。

そこで、この問題を解決する一つの方法として蛍光抗体法による鰓病菌の検出を検討した。また、生産現場における本法の実用性を検討する目的で東京都水産試験場奥多摩分場の養鰯池において野外調査を実施した。

材料および方法

供試菌株

供試した鰓病菌株は TS-1 (=BGD 7721, ATCC 35035) (木村ら, 1978), TW-1*², BV-1 (=ATCC 35036) および FDL-1 (WAKABAYASHI *et al.*, 1980), FL-15 (FARAKAS, 1985) で、それぞれ群馬県のヤマメ、徳島県のアユ養殖池の水、米国オレゴン州のマスノスケとスチールヘッド、ハンガリーのシートフィッシュから分離された菌株である。また、鰓病菌以外の 18 菌種 26 株を交差反応試験に供試した (Table 1)。

抗血清

前記鰓病菌株の中から TS-1, TW-1, BV-1, FL-15 の計 4 株の鰓病菌株を選び、それぞれに対する家兎抗血清を作製した。各菌株をサイトファーガ液体培地 (ANACKER and ORDAL, 1959) で 18°C, 約 3 日間振盪培養し、これに 0.3% になるようにホルマリンを加え、一晚放置後、遠心分離した。さらに、生理食塩水で洗浄した菌体

*¹ 東京大学農学部水産学科

*² 徳島県水試の城泰彦氏から供与。

を Freund の完全アジュバントとともにウサギに接種した。抗体価の上がったところで、全採血をして抗血清を得た。各抗血清は非動化した後、分注し、 -20°C で凍結保存した。

間接蛍光抗体法

供試菌の懸濁液あるいは感染魚の鰓組織のホモジネートを無蛍光スライドガラスに塗抹し、アセトンで 10 分間固定した。次に、PBS で 8 倍に希釈した供試抗血清を標本に滴下し、保湿箱に入れ、 30°C で 30 分間反応させたのち、PBS で 5 分間 3 回洗浄した。さらに、PBS で 1,000 倍に希釈した FITC 標識プロテイン A (Pharmacia) を同様の方法で反応させ、落射型蛍光顕微鏡 (オリンパス光学 RFK 型) で観察した。

蛍光抗体法の反応条件

抗 TW-1 血清を滅菌蒸留水で希釈し、間接蛍光抗体法を行い、蛍光抗体反応が可能な最高希釈倍率を求めた。また、アセトンで 10 分間固定したスライドガラス塗抹標本を 4, 20, 37°C でそれぞれ 3, 18 時間放置し、間接蛍光抗体反応におよぼす保存条件の影響を調べた。

寒天平板塗抹法

感染魚の鰓組織のホモジネートを滅菌蒸留水で系列希釈し、サイトファーガ培地に塗抹し、 18°C 、約 5 日間静置培養し、これに生えたコロニーを数えて、鰓 1g 当りの鰓病菌数を計算した。

実験感染魚からの鰓病菌の検出

約 5l の高圧滅菌水道水を入れた 20l 実験水槽に体重 4-6g のニジマス 20 尾と、鰓病菌株のサイトファーガ液体培地を約 10 ml (約 4×10^7 CFU/ml) 入れ、エアレーションをしながら 2 時間放置して感染させたのち、15 l の高圧滅菌水道水で換水した。この間、水温は約 20°C を維持した。なお、室内感染実験で供試した魚は山梨県魚苗センター忍野養魚場から分与を受け、東京大学農学部構内で短期間飼育したものである。

実験感染魚の鰓について感染前、感染後 1, 6, 12, 24, 48 時間の鰓病菌の有無を位相差顕微鏡による鰓表面の観察、鰓組織のホモジネートの寒天平板塗抹培養、鰓表面のスライドガラス塗抹標本の蛍光抗体反応の 3 つの方法で鰓病菌の検出を行い、それぞれの結果を比較した。また、感染 18 時間後の実験感染魚 8 尾の鰓組織のホモジネートについて、寒天平板塗抹法と蛍光抗体法で鰓病菌の菌数測定を行った。

野外調査

東京都水産試験場奥多摩分場の養鱒池で採卵・孵化・飼育されていたニジマス および ヤマメの稚魚を昭和 61

年 4 月から 9 月まで調査した。本場では両魚種間に鰓病の感染、経過、回復に大きな差がないことが経験的に知られていたため、ニジマスとヤマメを適当に混ぜて 1 回に 30 尾ずつをサンプリングした。病気が発生する前は 10~15 日おきに、また、発生した後は 3 日おきに、取り上げ、鰓を摘出し、その 1 部はそのままスライドガラスに載せて位相差顕微鏡で、1 部はスライドガラスに塗抹して蛍光抗体法で観察した。さらに、1 部は計量ののちホモジナイズして滅菌蒸留水で系列希釈し、同じ試料を寒天平板塗抹法と蛍光抗体法の 2 つの方法で定量した。なお、蛍光抗体法では、試料の系列希釈液 0.01 ml をスライドガラスの上に滴下、風乾し、処理後、蛍光顕微鏡下で菌数を測定した。また、魚の体表面の粘液を綿棒でかき取って、スライドガラスに塗抹して蛍光抗体法で観察した。さらに、養殖池の水 300 ml を孔径 0.45 μm のメンブランフィルター (ミリポア HA) によってろ過し、メンブランフィルター上の残渣を綿棒でかき取って、その 1 部をスライドガラスに塗抹して蛍光抗体法で観察し、また、1 部は寒天平板に塗抹し培養した。

感染魚の塩水浸漬処理

鰓病の発生した池の全魚に対してその防除対策として、7 月 2 日 10 時から 5% 塩水に 2 分間浸漬処理を行い、よく掃除したほかの池に移した。8 日後の 7 月 13 日に再び同処理を行った。

結 果

蛍光抗体反応

PBS (－) で 10 倍に希釈した各抗血清、および供試 4 抗血清の混合を PBS (－) で 8 倍に希釈したものの計 5 つの抗血清について、各供試菌株との間で蛍光抗体反応をさせたところ、Fig. 1 に示す例のように由来する魚種あるいは地域の異なる菌株に対してもホモの株とほぼ同程度の高い感度を示した。

鰓病菌以外の菌種との反応

Flexibacter columnaris など鰓病菌以外の 18 菌種 26 株に対する供試 4 抗血清それぞれの凝集素価、各菌株と 8 倍希釈混合抗血清とのスライド凝集反応、同じく蛍光抗体反応の結果は Table 1 のとおりである。すなわち、凝集反応では弱い交差反応の認められたもののがかなりあったが、蛍光抗体反応では *F. columnaris* と *F. maritimus* 以外には交差反応は認められなかった。

蛍光抗体法の反応条件

抗 TW-1 血清を試料として、蛍光抗体反応が可能な最高希釈倍率を求めたところ、1:256 まで明瞭な反応が認

Fig. 1. Fluorescent photomicrograph of *Flavobacterium* sp. isolated from the gill of rainbow trout. Magnification $\times 600$.

められた。なお、供試した抗 TW-1 血清の凝集素価は 4096 であった。

スライドガラス塗抹標本の保存条件の蛍光抗体反応に及ぼす影響を調べたところ、 37°C に 8 時間放置した標本でも 4°C に 3 時間放置した標本と同程度の明瞭な反応が認められた。

実験感染魚からの鰓病菌の検出

鰓病菌検出の有無を位相差顕微鏡による観察、寒天平板塗抹法、間接蛍光抗体法の 3 つの方法で比較したところ、Table 2 に示すような結果が得られた。すなわち、位相差顕微鏡による鰓表面の観察では感染 6 時間後に初めて鰓病菌の存在が認められたのに対し、蛍光抗体法では感染 1 時間後から検出された。寒天平板塗抹法では 1 時間後の鰓病菌の菌数は 1.36×10^4 CFU/g と 1.50×10^4 CFU/g、また 6 時間後の菌数は 7.86×10^4 CFU/g と 2.00×10^5 CFU/g であった。

蛍光抗体法による鰓病菌の感染菌数測定

寒天平板塗抹法と蛍光抗体法とで実験感染魚からの鰓病菌の菌数測定を行ったところ、Table 3 のような結果となった。すなわち、寒天平板塗抹法では $5.00 \times 10^5 \sim 1.00 \times 10^6$ CFU/g (平均値 7.10×10^5 CFU/g)、蛍光抗体法では $5.00 \times 10^5 \sim 3.08 \times 10^6$ cells/g (平均値 2.18×10^6 cells/g) であり、蛍光抗体法の数値のほうが多少高い傾向がみられた。

自然感染魚からの鰓病菌の検出

供試魚 30 尾の鰓と体表面について、鰓病菌の検出率 (%) を光学顕微鏡による鰓表面の観察、鰓表面のスライドガラス塗抹と体表面のスライドガラス塗抹の蛍光抗体反応標本の観察の 3 つの方法で調べたところ、Table 4 のような結果が得られた。すなわち、6 月上旬から 8 月上旬にかけて、水温が $15 \sim 16^{\circ}\text{C}$ の時に細菌性鰓病の発生・流行が確認された。しかし、塩水浸漬処理後にはほとんどの鰓病菌の形が崩れ、時間が経過すると鰓がもとに回復するのが観察された。また、養殖池の水からの鰓病菌の検出状況は Table 5 のような結果となった。すなわち、細菌性鰓病が流行している間は、養殖池の水からも鰓病菌が検出された。

自然感染魚からの鰓病菌の感染菌数測定

供試魚の鰓組織のホモジネートについて、寒天平板塗抹法と蛍光抗体法とで鰓病菌の菌数測定を行ったところ、Table 6 のような結果が得られた。すなわち、第一回 5% 塩水浸漬処理前の 7 月 1 日の感染菌数は平板培養法で 3.25×10^7 CFU/g、蛍光抗体法で 6.05×10^7 cells/g、また、第二回 5% 塩水浸漬処理前の 7 月 12 日はそれぞれ 2.94×10^8 CFU/g と 4.76×10^7 cells/g であった。一方、5% 塩水浸漬処理後の 7 月 3 日および 7 月 15 日は蛍光抗体法では菌が検出されたか、培養法では検出されなかった。ただし、処理魚の鰓標本上の鰓病菌

Table 1. Specificity of rabbit anti-*Flavobacterium* sp. sera against various bacterial species.

Organism	Strain	Agglutinin titers of antiserum				Slide agglutination*	IFAT*
		TS-1	BV-1	TW-1	FL-15		
<i>Flavobacterium</i> sp.	TS-1	4096	4096	4096	1024	+	+
	TW-1	4096	1024	4096	1024	+	+
	BV-1	128	1024	512	512	+	+
	FDL-1	64	2048	2048	2048	+	+
	FL-15	512	2048	1024	2048	+	+
<i>F. flavesces</i>	ATCC 14231	8	8	8	16	—	—
<i>F. sulfureum</i>	ATCC 14232	<4	<4	<4	<4	—	—
<i>F. fusoum</i>	ATCC 14233	8	8	8	16	±	—
<i>F. breve</i>	ATCC 14234	<4	<4	<4	<4	—	—
<i>Flexibacter columnaris</i>	EK-28	<4	<4	<4	<4	—	±
<i>Flx. maritimus</i>	NCMB 2153	<4	<4	<4	<4	—	±
	NCMB 2154	<4	<4	<4	<4	—	±
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ET-78069	4	8	64	16	±	—
<i>A. salmonicida</i>	NCMB 1102	4	16	16	4	—	—
	NCMB 2020	<4	4	4	8	—	—
<i>Vibrio anguillarum</i>	ATCC 19264	<4	8	4	4	—	—
	PT-81049	<4	8	<4	<4	—	—
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525	64	64	32	32	+	—
<i>P. putida</i>	ATCC 12633	4	32	8	8	±	—
<i>P. anguilliseptica</i>	NCMB 1449	<4	<4	<4	<4	—	—
	ET-2	<4	<4	<4	<4	—	—
	ET-7601	<4	<4	<4	<4	—	—
<i>P. aeruginosa</i>	IAM 1054	4	8	4	8	—	—
<i>Edwardsiella tarda</i>	SU-44	8	4	8	8	—	—
	SU-100	4	4	16	8	—	—
	SU-138	<4	<4	<4	<4	—	—
	E-381	8	8	8	8	—	—
<i>E. ictaluri</i>	582-575	<4	4	4	8	—	—
<i>Yersinia ruckeri</i>	2114	<4	<4	<4	<4	—	—
<i>Escherichia coli</i>	IAM 1239	32	32	64	64	±	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	IAM 1011	16	32	32	32	—	—

* Mixed antisera of TS-1, BV-1, TW-1 and FL-15 were used (final dilution: ×8).

の形は無処理魚のそれに比べ、明らかに不整であった。

考 察

魚病学の分野においても、これまでにいくつかの細菌性疾患の診断に蛍光抗体法の利用が試みられている（堀内ら, 1980, 河原・楠田, 1987）。これらの報告では、いずれも蛍光抗体法による細菌性疾患の診断精度が、細菌培養法に劣らずきわめて高く、また、その簡便性および迅速性において、細菌培養法より優れ、実用性の高い診断法であることを指摘している。

本研究では、間接蛍光抗体法の鰓病菌 *Flavobacterium* sp. の検出への応用を試みた。本法は鰓病菌のすべての供試菌株に対して高い感度を示した。一方、鰓病以外の

菌種の菌株に対しては *F. columnaris* と *F. maritimus* を除いて交差性が認められず、それらの交差反応も極めて微弱であり、吸収血清を作成しなくても実用上支障はなかった。これらのことから、間接蛍光抗体法は鰓病菌に対して高い感度と特異性を有することが明らかとなった。また、野外調査において、7月3日に検出率が下がり、7月5日には鰓病菌が全く検出できなかったが、これは7月2日に行った5%塩水浸漬処理が効いたためと思われる。しかし、7月10日には鰓病菌が再び検出され、細菌性鰓病が完全に治まらず再発した。なお、本調査年は例年に比べて細菌性鰓病の流行が軽かったとのことで、その理由として降雨量が多くて養殖池の水の流量が多かったこと、適切な時期に5%塩水浸漬処理を行

Table 2. Comparison between indirect fluorescent antibody technique (IFAT) and quantitative-plating method of *Flavobacterium* sp. strain FDL-1

Fish No.	Hour after infection	IFAT	Plating method* (CFU/g)	Phase-contrast microscope
1	0	—	not detected	—
2	0	—	not detected	—
3	1	+	1.36×10^4	—
4	1	+	1.50×10^4	—
5	6	+	7.86×10^4	±
6	6	++	2.00×10^5	+
7	12	+++	2.04×10^5	+/++
8	12	+++	3.62×10^5	+/++
9	24	+++	5.33×10^5	+
10	24	+++	3.48×10^5	++
11	48	+++	1.25×10^6	++
12	48	+++	6.25×10^5	++

* Limit of detection: 1.00×10^3 CFU/g.

Number of bacteria for experimental infection: about 1.6×10^3 CFU/ml.

Table 3. Comparison between bacterial counts using indirect fluorescent antibody technique (IFAT) and quantitative-plating method of *Flavobacterium* sp. strain FDL-1

Fish No.	Hour after infection	IFAT* ¹ (cells/g)	Plating method* ² (CFU/g)	Phase-contrast microscope
1	18	1.88×10^6	9.83×10^5	++
2	18	6.67×10^5	7.33×10^5	++
3	18	3.08×10^6	6.15×10^5	+
4	18	3.57×10^6	7.14×10^5	+
5	18	2.08×10^6	6.25×10^5	++/+++
6	18	3.75×10^6	5.00×10^5	++
7	18	1.88×10^6	5.62×10^5	+++
8	18	5.00×10^5	1.00×10^6	++
Mean		2.18×10^6	7.10×10^5	

*¹ Limit of detection: 1.00×10^4 cells/g (IFAT).

*² Limit of detection: 1.00×10^3 CFU/g (plating method).

Number of bacteria for experimental infection: about 1.6×10^3 CFU/ml.

ったことなどが考えられている。5% 塩水浸漬処理後も、蛍光抗体法では鰓病菌が検出されたが、これは 5% 塩水浸漬処理によって鰓の上の病菌が不活化（殺菌）された

Table 4. Detection of *Flavobacterium* sp. from trouts cultured in Okutama branch, Tokyo Pref. Fish. Exp. Stn.

Fish lot No.* ¹	Date* ²	IFAT (%)		Microscope observation	Water temp. (°C)
		Gill	Skin		
1	86. 4. 10	0	0	0	10.3
2	4. 24	0	0	0	11.9
3	5. 6	0	0	0	12.8
4	5. 20	0	0	0	12.6
5	6. 5	0	40	0	13.7
6	6. 19	30	40	0	16.2
7	7. 1	100	90	90	16.0
8	7. 3	50	20	30	16.0
9	7. 5	0	0	0	15.8
10	7. 10	10	0	0	15.2
11	7. 12	70	50	50	15.6
12	7. 15	20	0	10	15.8
13	8. 2	20	0	10	19.7
14	8. 18	0	0	0	18.0
15	9. 1	0	0	0	18.9

*¹ Number of fish examined was 30 per lot.

*² On July 2 and 13, immersion in 5% NaCl for 2 min was carried out as treatment.

Table 5. Detection of *Flavobacterium* sp. from pond water in Okutama branch, Tokyo Pref. Fish. Exp. Stn.

Date	IFAT	Plating method
86. 4. 10	—	—
4. 24	—	—
5. 6	—	—
5. 20	—	—
6. 5	—	—
6. 19	+	—
7. 1	+	+
7. 3	+	+
7. 5	+	—
7. 10	+	+
7. 12	+	+
7. 15	+	—
8. 2	+	—
8. 18	—	—
9. 1	—	—

ものの、なお、その時点では鰓から脱落していなかったためと考えられる。この点は培養法で鰓病菌が検出されなかったこと、処理魚の鰓の標本上に観察される鰓病菌が無処理魚のそれに比べ形が崩れていたことによって裏付けられている。

Table 6. Detection of *Flavobacterium* sp. from the gill filaments of naturally infected trouts cultured in Okutama branch, Tokyo Pref. Fish. Exp. Stn.

Fish lot. No.	Date	Incidence of detection (%)	No. of detected bacteria* (Geometric mean value)	
			IFAT	Plating method
1	86. 4. 10	0	not detected	not detected
2	4. 24	0	not detected	not detected
3	5. 6	0	not detected	not detected
4	5. 20	0	not detected	not detected
5	6. 5	0	not detected	not detected
6	6. 19	30	4.02×10^4	not detected
7	7. 1	100	6.05×10^7	3.25×10^7
8	7. 3	50	1.36×10^5	not detected
9	7. 5	0	not detected	not detected
10	7. 10	10	2.78×10^5	not detected
11	7. 12	70	4.76×10^7	2.94×10^5
12	7. 15	20	7.72×10^4	not detected
13	8. 2	20	not detected	not detected
14	8. 18	0	not detected	not detected
15	9. 1	0	not detected	not detected

* Limit of detection: 1.00×10^4 cells/g (IFAT).
 1.00×10^3 CFU/g (plating method).

以上、間接蛍光抗体法が細菌性鰓病の迅速診断に有用であることが明らかとなったので、今後、養魚場における細細菌性鰓病菌の発生調査、および鰓病菌の生態・分布調査に活用できるものと考ええる。

謝 辞

本研究遂行にあたり多方面にわたって御助言を頂いた東京大学農学部水産学科の飯田貴次助手に深謝致します。また、供試魚および実験設備を快く提供して下さい、東京都水産試験場奥多摩分場の森真朗氏、小松俊夫氏および職員各位に感謝致します。

文 献

ANACKER, R. L., and E. J. ORDAL (1959): Studies on the myxobacterium *Chondrococcus columnaris* I.

Serological typing. *J. Bacteriol.*, **78**, 25-32.

河原栄二郎・楠田理二 (1987): 直接蛍光抗体法によるウナギ主要細菌性疾病の迅速診断. 日本水産学会誌, **53** (3), 395-399.

FARKAS, F. H. (1985): Filamentous *Flavobacterium* sp. isolated from with gill disease in cold water. *Aquaculture*, **44**, 1-10.

木村紀彦・若林久嗣・工藤重治 (1978): サケ科魚類の細菌性鰓病に関する研究—I. 人為感染試験による病原菌の選択. 魚病研究, **12**, 232-242.

堀内三津幸・佐藤勉・高木博之・戸塚耕二 (1980): 養殖ウナギの主要細菌感染症の迅速診断システムに関する研究—II. 免疫蛍光直接法によるパラコロ病の野外検索試験. 魚病研究, **15**, 63-67.

WAKABAYASHI, H., S. EGUSA, and J. L. FRYER (1980): Characteristics of filamentous bacteria isolated from a gill disease of salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **37**, 1499-1504.