

サケ科魚類の細菌性腎臓病 (BKD)

の防疫に関する研究

酒井 正 博

①

サケ科魚類の細菌性腎臓病 (BKD)
の防疫に関する研究

Detection and Prevention of
Bacterial Kidney Disease
in Salmonids

酒井 正博

目 次

緒言	1
第1章 BKDの診断法の検討—特に酵素抗体法を用いた ドットブロット法について	8
第1節 ドットブロット法を用いたBKDの診断法の検討	9
第2節 各種BKD診断法の比較	24
第3節 考察	30
第2章 ドットブロット法による <u>R. salmoninarum</u> 保菌魚の調査	33
第1節 ドットブロット法を用いた <u>R. salmoninarum</u> 保菌魚の調査	35
第2節 各魚種の <u>R. salmoninarum</u> に対する感受性	60
第3節 考察	72
第3章 海水養殖ギンザケのBKD	82
第1節 海水ギンザケ養殖場の <u>R. salmoninarum</u> の分布	83
第2節 考察	81
第4章 シロサケおよびギンザケの血中の <u>R. salmoninarum</u> 抗体	94
第1節 血中抗体の検出方法の検討	95
第2節 養殖ギンザケおよび潮上シロサケの血中の <u>R. salmoninarum</u> 抗体の調査	103
第3節 考察	107

第5章 BKDワクチンの試み	110
第1節 各種ワクチン投与魚の免疫応答	111
第2節 ワクチンの有効性	121
第3節 考察	129
第6章 総括	132
まとめ	135
謝辞	138
引用文献	139

緒 言

サケ科魚類の細菌性腎臓病 (Bacterial Kidney Disease, BKD) は、1933年に Mackieらによってスコットランドの大西洋サケの疾病として初めて報告された (Mackie *et al.*, 1933)。また、ほぼ同じ時期に米国のマサチューセッツ州のカワマス *Salvelinus fontinalis* においても報告された (Belding and Merrill, 1935)。1940年代に入って野生のサケ科魚類に発生するようになり注目されはじめた (Rucker *et al.*, 1954)。さらに本病はカナダにおいても流行が認められ (Bell, 1961)、現在では北米大陸のサケ科魚類の重要な疾病の一つとなっている。

本病の外観的な病徴は、眼球突出、脂鰭や胸鰭およびその基部、肛門等の出血、腹水の貯溜、鰓の貧血などである。また、体側の皮膚にクリーム色もしくは赤色の膿状液が溜った大きな水胞が出来ることもある。内部的には腎臓に小白点が出現し、病状が進むにつれて大きくなり巨大な腫物となることが多い (写真1)。病変の中心部の組織は壊死し、組織や細胞の崩壊物や遊走細胞そして多数の病原菌で占められている。腎臓は全体的に腫大し、さらに退色する。このような小白点は、肝臓、脾臓、心臓にも現れることがある。脾臓は腫大し、肝臓は退色する。その他に、点状出血が内臓や腹腔内壁にみられる (Fryer and Sanders, 1981)。

本病原菌は、大きさ $0.3-0.5 \times 0.5-1.0 \mu\text{m}$ の小さな非運動性、好気性、非抗酸性、グラム陽性桿菌で多くの場合双桿状を呈し、発育可能温度は $5-22^{\circ}\text{C}$ 、至適温度は $15-18^{\circ}\text{C}$ である。本菌は、初め Ordal and Earp (1956) によって *Corynebacterium* 属の細菌であると報告された。Sanders and Fryer (1980) は、本菌の細胞壁のペプチドグリカンにはアラニン、グルタミン酸およびメソジアミノピメリン酸、さらに細胞壁にはアラビノース、ガラクトースが含まれ、*Corynebacterium* 属の特徴であるムコリク酸が含まれていないことから新たに *Renibacterium salmoninarum* という学名を与えられた。



写真1 BKD感染魚の腎臓における病変

本菌の培養はきわめて困難である。Ordal and Earp(1956)はトリプトン1.0%、酵母エキス0.05%、塩酸-L-システイン0.1%、ヒト血清20%、寒天1.5%の組成の培地を用いて本菌の分離に初めて成功した。その後ミューラーヒントン培地に塩酸-L-システイン0.1%を加えた培地 (Wolf and Dumber, 1959)、Ordal and Earpの培地のヒト血清を牛血清に替えたKDM-2 (Evelyn, 1977) および血清のかわりに活性炭を加えたKDM-C (Dully *et al.*, 1985) などの培地が報告されているが、いずれの培地も菌の発育がきわめて遅く、15-18℃の発育適温で培養してもコロニーの出現が認められるまで数週間を必要とする。

本菌の生化学性状は、Bruno and Munro(1986)によると β -溶血性でゼラチンを加水分解し、カタラーゼおよびDNase陽性である。チトクローム・オキシダーゼとメチルレッド反応は陰性である。インドールを産生せず、どのような糖も分解しない。これらの性状は、アメリカ、カナダ、イギリスおよび日本で分離された菌株においても同一であると報告されている。本菌の同定にはさらにAPI-ZYM system がきわめて有効であるという報告もある(表1) (Austin *et al.*, 1983)。

Bullock *et al.* (1974)は、米国各地で分離した10菌株について血清型を調べ、それらは一つまたはそれ以上の共通抗原をもち、抗原的に均質であったことを報告している。Getchell *et al.* (1981)は、アメリカ、フランス、ノルウェー、イギリス、カナダより集めた菌株の血清型を比較し、すべての菌株が共通の抗原をもち、抗原的に均質であったことを明らかにし、さらにこの共通抗原 (antigen F) の分子量は57,000できわめて熱に対して安定であることを報告している。

本病は、肉眼的に腎臓にみられる病変、およびそのスタンプ標本のグラム染色から判断できるが、そのような病状を示さない個体も多い。病原菌の培養は前述したように時間を要することから診断法として用いられることは少ない。これらのことから本病の診断には血清学的手法が一般的に用いられている。現在までに報告されたものとして、ゲル内沈降法 (Chen *et al.*, 1974)、蛍光抗体法 (Bullock and Stuckey, 1975, Bullock *et al.*, 1980)、共同凝集反応 (Kinura

表1 *Renibacterium salmoninarum*の性状

性状	<i>R. salmoninarum</i>
染色	
グラム	+
PAS	+
アルバート	-
チール・ニールセン	-
芽胞形成	-
溶血性	β
加水分解能	
カゼイン	+
ゼラチン	+
ツイーン80	-
アルギニン	-
メチルレッド	-
V P	-
インドール	-
チトクローム・オキシダーゼ	-
カタラーゼ	+
エステラーゼ	-

and Yoshimizu, 1981)、対向免疫電気泳動法 (Cipriano *et al.*, 1985)、ELISA法 (Pascho and Mulcahy, 1987, Dixon, 1987) およびドットブロット法 (Sakai *et al.*, 1987a) などがあり、それぞれ本病の診断や保菌魚の調査に実用されている。

本病の伝染源は保菌魚と病原菌に汚染された卵であると考えられており、水平および垂直感染の両方が起こりうることが知られている。水平感染については、皮膚やその傷口が重要であるとされている (Wolf, 1966) が経口感染の可能性も否定されていない (Wood and Wallis, 1955)。一方、親から卵への垂直感染は、Allison (1958) によって最初に示唆され、実験的には Bullock *et al.* (1978) によって証明された。この卵への感染は、菌が卵黄の中に存在するためにヨード液に浸けて卵を消毒しても菌を除くことが出来ないという報告がある (Evelyn *et al.*, 1984)。

本菌の潜伏期間は、水温にもよるが一般的にきわめて長い。Sanders *et al.* (1978) によると腹腔内注射によって本菌を接種されたベニザケ *Oncorhynchus nerka* は、水温 12℃ で斃死に至るまで 1 か月間を必要とする。また水温が高くなるほどその期間が短くなるとともに斃死率が減少すると報告されている。BKD の発生は、ふつう晩秋から早春にかけて起こることが知られている。一般的に温度の上昇とともに病気が発生し、そして夏には終息することが多い (Bruno, 1987)。本病は、本来淡水において飼育されたサケ科魚類に発生する病気であるが、感染魚が海水生活期に入った後にも、発生することが知られている (Fryer and Sanders, 1981)。また、海水中で水平感染の起こる可能性も示唆されている (Banner *et al.*, 1983, 早川ら, 1989)。

R. salmoninarum は、*in vitro* においてマクロライド系の薬剤に対して強い感受性を示すことが報告されている (Wolf and Dunber, 1959, Austin, 1985)。しかしながらこれらの薬剤を用いての本病の治療は、十分な成果を上げていない。その理由として、本菌の食細胞内での生存および増殖性が考えられる (Young and

Chapman, 1978)。さらに、エリスロマイシン耐性株の存在も報告されている (Bell *et al.*, 1988)。BKDのワクチンに関する研究は、Paterson *et al.* (1981) や McCarthy *et al.* (1984) の成功例の報告があるものの、発病を免れた魚から菌が除去されずに保菌魚になるなど問題点が多い。本病の発生を飼料によって抑えるという試みも行われており、Paterson *et al.* (1981) は、ビタミンAや鉄、そして亜鉛を飼料中に強化することによって本病の発病を減少させ得ることを見いだした。しかし、その後の追試によって十分な効果が期待されないことが報告されている (Sakai *et al.*, 1987)。このように本病はきわめてコントロールがむづかしくサケ科魚類の難病の一つとされており、さらに国際獣医事務局 (OIE) によって魚貝類疾病の中でも特に伝播防止に努めなければならない病気に指定されている。

BKD は、わが国においては1973年に北海道のマスノスケ *Oncorhynchus tshawytscha*、ヒメマス *O. nerka*、カラフトマス *O. gorbuscha* およびヤマメ *O. masou* の幼魚に初めて発生が認められた (木村・粟倉, 1977)。その後本病は、北海道のみならず本州においても発生が見られるようになり、その被害が、拡大する傾向にある (Kimura and Yoshimizu, 1981)。

近年、ギンザケ養殖のシステムが確立され、1987年にはその生産量が1万5千トンに達している。このシステムは、まず北米からギンザケ *O. kisutch* の発眼卵を輸入し、淡水でふ化させ、体重が150g前後になるまで飼育する。その後この魚を海水に移し、さらに10ヵ月間養殖し、2-3Kgの大きさにしてから市場に出荷する。前述のようにBKDは卵感染をすることが知られており、アメリカ・カナダから *R. salmoninarum* に汚染された卵が輸入され、その卵から成長した魚にBKDの発生が見られるようになった。さらに海水移行時のストレスによって大発生を引き起こしやすい。そのため、現在、ギンザケ養殖における最も恐ろしい病気と考えられている。

BKDは、北米大陸から輸入された病気と考えられているが、*R. salmoninarum* は、わが国在来ヤマメ、イワナ *Salvelinus leucomaenis*、アマゴ *O. macrostomus*

などにも病原性があることが知られている。現在すでに、ヤマメ、イワナ、およびアマゴの養魚場において、BKDの被害が出始めており何らかの防疫対策を行わない限りますます拡大していくものと思われる。さらにわが国最大のサケ・マス資源であるシロサケ *O. keta* への影響も懸念される。このようにBKDは、ますます流行する可能性があるにもかかわらず、有効な薬剤やワクチンがなく、防疫的処置が本病を防ぐ上で最も重要な手段であると考えられる。

本研究はこのような状況の下に始められたもので、まず現在までに報告されたBKDの診断法を比較し、どの方法が保菌魚の検出に最適であるかについて検討を行った。そしてその方法を用いて養殖ギンザケおよびその他のサケ・マス類の *R. salmoninarum* の保菌状況を調査した。さらに、海中ギンザケ養殖場の *R. salmoninarum* 分布状態について調査を行い、シロサケへのBKDの感染の可能性を考察した。最後に、BKDのワクチン開発の試みとして種々のワクチンをニジマスに投与して免疫応答を調べ、さらに攻撃実験によって防御能の有無を検討した。

第1章 BKDの診断法の検討

一特に酵素抗体法を用いたドットブロット法について

BKDの診断方法としては、腎臓に形成された白点の有無を調べ、さらにその腎臓のグラム染色を行い原因菌の存在を確認することが一般的であるが、そのような白点を形成しない場合も多く、グラム染色においても原因菌とメラニン顆粒との判別が困難な場合が多い。それに加えて原因菌の分離は、コロニー出現まで2週間以上を必要とするため実用的ではない。そこで、現在は本病の診断に抗R. *salmoninarum* 血清を用いた血清学的手法が広く利用されている。本病の診断に用いられた最初の血清学的手法は、ゲル内沈降法である(Chen *et al.*, 1974)が、その後、Bullock *et al.*(1975)によって間接蛍光抗体法が用いられ、BKDの診断にすぐれた成果を示した。しかし本法は、高価な蛍光顕微鏡を用いるために小さな研究室では行えないことや観察に多くの時間を必要とするなどという問題点がある。そのためにKinura and Yoshimizu,(1981)は、*Staphylococcus aureus*の菌体を用いた共同凝集反応法を開発した。この方法は感染魚の腎臓の熱抽出液と抗体感作菌体を混合し菌体の凝集を観察するという非常に簡単な手法であるために広くわが国の水産試験場などで用いられている。その後、Cipriano *et al.* (1985a)は、対向免疫電気泳動法を用いてBKDの診断を行い、感度の点で他の方法に勝ることを報告している。

近年、医学の分野で酵素抗体法(EIA)が病気の診断に用いられ感度および簡易性の面からすぐれた成果を上げている。本章においては、EIAリーダーなどの特殊な装置を必要とせずしかも簡単に行える酵素抗体法として、ニトロセルロースの膜上でR. *salmoninarum*抗原に対する酵素抗体法を行うドットブロット法を開発し、これをBKDの診断に試みた。さらに前述した種々の血清学的手法と比較し、ドットブロット法の利点について考察を加えた。

第1節 ドットブロット法を用いたBKDの診断方法の検討

材料および方法

1 使用菌株

Renibacterium salmoninarum KU8504株を用いた。この菌株は1985年に岩手県
のギンザケ病魚より分離し、グラム染色および凝集反応により R. salmoninarum で
あると確認した。KDM-2培地 (Evelyn, 1977) で、15℃で14日間培養し、以下の実
験に供した。

2 抗血清の作製

KDM-2培地で培養した菌体を、白金耳で集め、滅菌生理食塩水 (PS) (0.85%
NaCl) に懸濁した。これに全体量の0.3%になるようにホルマリンを加え4℃で12時
間放置し菌を不活化した。その後菌体を生理食塩水 (PS) で3回遠心洗浄し、最後
に570nmでO.D.が1.0になるようにPSに懸濁させた。この菌液にFreundの完全アジ
ュバント (ディフコ社) を等量加え十分に混合し、これを0.2mlずつウサギ (3.5
Kg) の背部に筋肉内接種を行った。さらに2週間後にブースター (追加免疫) とし
て、ホルマリン死菌を同量接種した。1-3週間後に試採血を行い抗体価が1:4096
以上になったものについて、全採血を行った。採血した血液を、4℃に放置して凝
固させた後、遠心分離 (2,000回転, 15分間) によって血清を分離した。これらの
抗血清は、小分けして-80℃で保存した。

3 抗原の作製

R. salmoninarum KU8504 をKDM-2培地にて15℃で14日間培養し菌体をPSにて3回
遠心洗浄した後、菌濃度をPSにて 10^8 cells/ml に調製し、これを原液として10倍

系列希釈を行った。さらにこの希釈液0.5mlにニジマスの腎臓を0.5g加え十分にガラスホモジナイザーにてホモジナイズし、これを20分間水浴中で100°Cに加熱した。2,000回転で20分間遠心分離し、その上清を抗原抽出液として以後の実験に用いた。

4 ドットプロット法

4-1 直接法

抗*R. salmoninarum* ウサギ血清に、50%の飽和硫酸アンモニウムを加えてγ-グロブリンを分画した。この分画8mgに5mgの西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP) (シグマ社) を過ヨウ素酸法 (Nakane and Kawai, 1974) にて結合させた。そして未結合のHRPを除去するためにセファデックスG-100カラムクロマトグラフィーにより分画して、HRPラベルγ-グロブリンを集めた。これをタンパク質が10mg/mlになるようにローリー法 (Loury *et al.*, 1951) にて調製し、-80°Cで保存した。

ドットプロット法は、ミリボア社製のニトロセルトース・アセテート膜 (0.45 μm) を用いて行った。この膜を、TBS (20mMトリスアミノメタン、500mM NaCl pH7.5) に浸した後、抗原液10 μlをプロットし、30分間20°Cの湿潤箱内に静置した。これに3%ゼラチンTBSを加えてさらに30分間静置した後、1%ゼラチンTBSで80倍に希釈したHRPラベル*R. salmoninarum* ウサギγ-グロブリンを各抗原の上に5 μlずつプロットし、湿潤箱内で30分間20°Cで反応させた。その後TBS, 0.5% Tween 80 TBS, および TBSで5分間ずつ洗浄した後DAB (ジ-アミノベンチジン (シグマ社) 20mg, 5% H₂O₂ 0.1ml/100ml TBS) を加えて発色させた。

4-2 間接法

ニトロセルロース・アセテート膜に抗原液をプロットし、前述の方法でブロックした。これに1%ゼラチンTBSで80倍に希釈した抗-*R. salmoninarum* ウサギ血清 (1次抗体) を5 μlプロットし、湿潤箱内で20°C30分間反応させた。その後、TBS, 0.5% Tween 80 TBS, およびTBSで5分間ずつ洗浄した。次に1%ゼラチンTBSで120倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼでラベルした抗-ウサギIgG-ヤギ血

清（2次抗体）（ミルズ社）を5 μ lプロットし、湿潤箱内で反応させた後（20℃ 30分間）前述の直接法と同じ方法で洗浄した。そしてDABによって発色させた。

4-3 ペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ（PAP）法

間接法の手順に従って1次抗体を加えて湿潤箱内で抗原と反応させ、洗浄した後、2次抗体として1%ゼラチンTBSで80倍に希釈した抗ウサギIgGヤギ血清（2次抗体）を5 μ lプロットし、湿潤箱内で反応（20℃, 30分間）させた。前述の間接法の場合と同じ方法で洗浄を行い、その後、1%ゼラチンTBSで100倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ複合体（ウサギIgG）（PAP）（ミルズ社）を5 μ lプロットし、湿潤箱内で反応させ、そして洗浄を行った。発色は、前述と同様にDABで行った。

PAP法の場合、2次抗体とPAPとの反応のプロセスを繰り返し行うことによってさらに感度が高くなることが知られている。従って本実験においても2次抗体とPAPの反応のプロセスを繰り返して感度の増幅を図った。

4-4 結果の判定

これらの酵素抗体法においては、マクファアランドNo5の濃度に懸濁したR. salmoninarum KU8504株からの熱抽出抗原を陽性コントロールとし、同濃度の Aeromonas salmonicida TN-1K株からの熱抽出抗原および牛血清アルブミン（10ng）を陰性コントロールとして、陽性コントロールが十分に発色したと考えられた時点（DABを加えてから約30秒後）にサンプルの結果を判定した。判定に時間を必要とするときには、0.1NのH₂SO₄を加えて発色を停止させた（図1）。

5 ドットプロット法の特異性

本法のR. salmoninarumに対する特異性を明かにするために以下のような細菌との交差性を調べた。Aeromonas salmonicida ATCC14174, A. salmonicida KAH8501 Vibrio anguillarum PT24, Edwardsiella tarda AJC8101, Pseudomonas fluorescens KPF8401, Streptococcus sp. SG8004(β -hemolytic), Escherichia

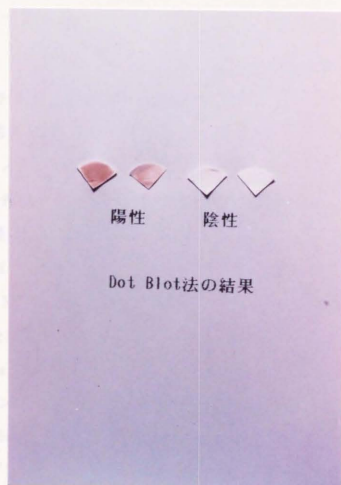


図1 ドットプロット法の結果

coli K-12。さらに *R. salmoninarum* 間の抗原の統一性を明らかにするために、各地から分離された *R. salmoninarum* とも比較した。それぞれの菌株の由来は、表2に示した。これらの菌を、マクファールランドNo5の濃度でPSに懸濁し、水浴中で10分間加熱した。これを4,000回転で20分間遠心し、その上清を抗原液とした。これらの抗原液の反応性を、ドットプロット法の間接法を用いて検定した。

6 発色剤の比較

酵素抗体法では、ペルオキシダーゼを検出するためにさまざまな発色剤が用いられている。そこでこれらの発色剤のうち下記の5種類について間接ドットプロット法における優劣を検討した。

6-1 3,3ジアミノベンチジン (DAB)

3,3ジアミノベンチジン (シグマ社) 2mgをTBS (pH7.6) 10mlに溶かし、メンブレフィルターで濾過後、5% H_2O_2 を0.01ml加えた。

6-2 4-クロロ-1-ナフトール

4-クロロ-1-ナフトール (和光純薬) 2mgにエタノール0.2mlを加えて溶かし、それにTBS (pH7.6) を加えて10mlとし、30分攪拌後、濾過し、pH7.6に調製し、さらに5% H_2O_2 を0.01ml加えた。

6-3 o-フェニレンジアミン

0.1Mクエン酸4.86mlと0.2M Na_2HPO_4 5.14mlを混合して10mlとし、これにo-フェニレンジアミン (シグマ社) 2mgを加え、さらに5% H_2O_2 を0.01ml加えた。

6-4 2,7-ジアミノフルオレン

2,7-ジアミノフルオレン (シグマ社) 2mgを10mlのエタノールに溶解し、これを1ml取り、5% H_2O_2 を2 μ l加え、さらにTBSを8.9ml加えた。

6-5 2,2'-アジノ-ビス (3'-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS) バイオラット社のキットを用いた。2,2'-アジノ-ビス (3'-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) を含んでいる溶液 Aと H_2O_2 を含んでいる溶液Bとを等量混合

表2 本研究に用いた *R. salmoninarum* 菌株の由来

菌株	年	場所	魚
KU8502	1985	岩手県	ギンザケ
KU8503	"	"	"
KU8504	"	"	"
KU8805	1988	"	"
KU8806	"	"	"
RB173	1978	オレゴン州 (米国)	マスノスケ

した。

7 ホルマリン固定サンプルからの *R. salmoninarum* 抗原の検出

北里大学水産学部水族病理学研究室に保存してあった、5年前にBKDに感染したギンザケのホルマリン固定サンプル10尾（平均体重60g）からそれぞれ0.3gの腎臓を摘出した。これに0.5mlのPBSを加え、ガラスホモジナイザーでホモジナイズし、100° Cで20分間水浴中で加熱することによって熱抽出サンプルを調製し、ドットブロット法を行った。

次にドットブロット法におけるホルマリン固定の影響について検討した。前述の方法によって作製した *R. salmoninarum* 菌体10倍希釈系列にそれぞれホルマリンを0.3%になるように加えた。これを4° Cで保存し、2週間ごとに一部を取り出し熱抽出抗原を作製し、感度の比較を行った。なお実験は、ホルマリン固定後130日目までで行いコントロールとしてホルマリンを加えていない菌体希釈系列を用いた。ドットブロット法は、すべて間接法を用い、DABで発色させた。

8 試料臓器間の比較

BKDの診断にドットブロット法を用いる場合にどの臓器が最も *R. salmoninarum* 抗原を検出しやすいかを調べた。*R. salmoninarum*に感染したと考えられる10尾の淡水養殖ギンザケ（約60g）を用い、腎臓、肝臓、心臓、腸管、筋肉（主に背鰭の部分）および脾臓を取り出し、2倍量のPBSを加えてホモジナイズし、前述の方法で熱抽出サンプルを調製した。間接ドットブロット法を用い、DABで発色させた。

結果

1 各ドットブロット法の感度の比較

直接法、間接法およびPAP法のR. salmoninarum抗原の検出感度を表3に示した。最も検出感度が高かったのは、増感処理したPAP法と間接法で 10^2 cells/gの濃度までのR. salmoninarum 抗原を検出することが出来た。しかし直接法とPAP法も、 10^3 cells/gの濃度までの抗原を検出することが可能であり、これらの方法も高い感度を示した。

2 ドットブロット法の特異性

ドットブロット法を用いた酵素抗体法の特異性を表4に示した。本研究で用いたR. salmoninarum 菌株はすべて陽性であり、その他の菌株は、すべて陰性であった。

3 発色剤の感度の比較

DAB, o-フェニレンジアシンおよびABTSは、間接法においていずれも 10^2 cells/gの濃度の抗原量を検出することが可能であった。しかし、ジアミノフロレインでは 10^4 cells/g, 4-クロロ-1-ナフトールにおいては、 10^5 cells/gの濃度までと感度が低いことが分かった(表5)。

4 ホルマリン固定サンプルからのR. salmoninarum抗原の検出

1983年のBKD感染魚からのドットブロット法による抗原の検出結果を表6に示した。10サンプルのうちすべてがドットブロット法によって陽性を示した。このことからホルマリン固定魚に対してもドットブロット法を用いてBKDの診断が出来ることが分った。

表3 各酵素抗体法の感度の比較

菌数 (cells/g)	直接法	間接法	PAP法	
			常法	増感法
10^7	+	+	+	+
10^6	+	+	+	+
10^5	+	+	+	+
10^4	+	+	+	+
10^3	+	+	+	+
10^2	—	±	—	+
10	—	—	—	—
コントロール	—	—	—	—

表4 ドットブロット法による R. salmoninarum 抗原検出の特異性

菌株	抗- <u>R. salmoninarum</u> KU8504血清
<u>R. salmoninarum</u> KU8504	+
<u>R. salmoninarum</u> KU8502	+
<u>R. salmoninarum</u> KU8503	+
<u>R. salmoninarum</u> RB173	+
<u>A. salmonicida</u> ATCC14174	-
<u>A. hydrophila</u> KAH8501	-
<u>V. anguillarum</u> PT24	-
<u>E. tarda</u> AJC8101	-
<u>P. fluorescens</u> 8401	-
<u>Streptococcus</u> sp. SG8004	-
<u>E. coli</u> K12	-

表5 ドットブロット法に用いられる発色剤の比較

発色剤	感度 (cells/nl)
DAB	10^2
0-フェニレンジアミン	10^2
ABTS	10^2
ジ-アミノフロレイン	10^4
4-クロロ-1-ナフトール	10^6

表6 1983年度のホルマリン固定ギンザケよりの

R. salmoninarum 抗原の検出

サンプル	ドットブロット法
1	+
2	+
3	+
4	+
5	+
6	+
7	+
8	+
9	+
10	+

5 ホルマリン固定サンプルにおける感度の比較

ホルマリン固定した菌液の抗原の保存性については、感度の低下が見られるものの、ホルマリン固定によって少なくとも130日後まで抗原が保持されることが示された。一方、ホルマリン未処理の菌液においては、99日目で陰性となった（表7）

6 ドットプロット法に用いられる臓器の比較

淡水で養殖されたギンザケの各臓器からのR. salmoninarum 抗原の検出結果を表8に示した。10尾中BKDの病徴が見られたのは2尾であった。それらのサンプルからは、筋肉を除くすべての臓器からR. salmoninarum抗原が検出された。腎臓が最も高い検出率を示し、10サンプル中8サンプルが陽性であった。次に心臓と脾臓の5サンプル、そして肝臓の3サンプルが陽性であった。腸管からと筋肉からは、BKDの病徴をもった魚からのみ抗原が検出された。

表7 ホルマリン固定サンプルにおける感度の変化

ホルマリン固定後 の日数	ホルマリン固定サンプル (cells/ml)	4℃保存サンプル (cells/ml)
0	10^2	10^2
15	10^3	10^2
31	10^3	10^5
44	10^3	10^5
58	10^4	10^6
99	10^5	N.D.*
130	10^5	N.D.

N.D.* : 検出されず

表8 ドットブロット法を用いての *R. salmoninarum* 抗原の各臓器からの検出

サンプル	BKDの病徴	<i>R. salmoninarum</i> 抗原の検出					
		腎臓	心臓	肝臓	脾臓	腸管	筋肉
1	+	+	+	+	+	+	+
2	-	+	+	-	+	-	-
3	-	+	-	-	+	-	-
4	-	+	-	-	-	-	-
5	-	+	+	-	+	-	-
6	+	+	+	+	-	+	+
7	-	+	-	-	-	-	-
8	-	+	+	+	+	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
合計	2	8	5	3	5	2	2

第2節 各種BKD診断法の比較

材料および方法

1 間接蛍光抗体法

無蛍光スライドガラスに抗原液を $10\mu\text{l}$ スポットし、風乾後、アセトンで5分間固定した。これにPhysiological Buffer Saline(pH7.2)(PBS)で80倍希釈した抗 *R. salmoninarum* ウサギ血清を $10\mu\text{l}$ 滴下し、 20°C 、30分間湿潤箱中でインキュベートした。これをPBSで5分間ずつ3回洗浄し、FITCでラベルした抗ウサギIgG・ヤギ血清（ペーリング社） $10\mu\text{l}$ を加え 20°C で30分間湿潤箱中で反応させた。PBSで3回洗浄後さらに蒸留水で1回洗浄し、風乾した。その後、蛍光顕微鏡（オリンパス社）にて400倍で50視野観察し、菌体が5視野以上見られたサンプルを陽性とした。

2 ゲル内沈降法

ゲル内沈降法はChen *et al.* (1974)の方法によって行った。*R. salmoninarum* 抗原希釈液と抗 *R. salmoninarum* ウサギ血清（原液）をそれぞれゲル板に設けられた穴に注いだ後、 20°C で24-48時間、湿潤箱中でインキュベートし、沈降線の形成がみられたものを陽性とした。

3 対向免疫電気泳動法

ペロナール緩衝液（バルビツール 1.84g/l 、バルビツール 10.3g/l 、pH8.4）に溶かした1%アガロースを、ガラス板上に流してゲル板を作製した。そのゲル板に7.5mm間隔に直径3mmの穴を2カ所あげ、一方に *R. salmoninarum* の抗原液、他方に

抗 *R. salmoninarum* ウサギ血清（原液）を $10\mu\text{l}$ ずつ入れ、 30mA で70分間泳動させ、沈降線の形成が見られたものを陽性とした。

4 ラテックス凝集反応

前節で述べた抗 *R. salmoninarum* γ -グロブリン分画をグリシン緩衝液（グリシン 7.3g/l , NaCl 10g/l , $\text{pH} 8.2$ ）（GBS）で80倍希釈し、これに $0.81\mu\text{m}$ のラテックス粒子（ディフコ社）（ $1 \times 10^9 / \text{ml}$ ）を等量加え 37°C で2時間、ゆつくりと攪拌しながらインキュベートした。

このラテックス粒子 0.5ml と *R. salmoninarum* の各抗原液 0.5ml をスライドガラス上で混合し、 20°C で30分から120分間、湿潤箱中でインキュベートし、ラテックス粒子が凝集しているものを陽性とした。

5 共同凝集反応

Staphylococcus aureus cowan I 型の菌株をトリプトソーイブイオン（TS）（日本）にて 37°C で2日間培養後、菌体を遠心分離し、分離菌体を3回、PBSにて5,000回転15分間洗浄した。その後、0.5%ホルマリンPBS中で24時間、 4°C で不活化し、再び遠心分離によって菌体を集めPBSで3回洗浄した後、40%になるようにPBSに懸濁させた。これを1時間、 80°C に加熱し、再度、遠心分離によって集菌洗浄し、PBSで40%の濃度の菌体浮遊液を作成した。この菌体浮遊液 1ml に、抗 *R. salmoninarum* γ -グロブリン液（20倍希釈） 3ml を混合し、 37°C で3時間ゆつくりと攪拌しながらインキュベートした。これを遠心分離後、0.5%の濃度の菌体浮遊液に調製し、共同凝集反応液とした。

共同凝集反応は、ラテックス凝集反応と同じ方法で行った。

6 各診断法の感度の比較

第1節に記述した抗原の作製方法を用いて *R. salmoninarum* 希釈液を作製した。

これを用いて、ドットブロット法（間接法）、蛍光抗体法（間接法）、ゲル内沈降法、対向免疫電気泳動法、ラテックス凝集反応および共同凝集反応の感度について比較した。

さらに淡水で養殖されていたギンザケを用い、それぞれの診断方法を比較した。BKDの発生している養殖場からギンザケ19尾を取り上げ、BKDの外部症状、内部症状を調べ、KDM-2培地とSKDM培地を用い腎臓から菌の分離を行った。次にスライドグラスと無蛍光スライドグラスに腎臓のスタンプ標本を作製した。スライドグラススタンプ標本については、5% H_2O_2 で脱メラニン処理を行った後、ハッカーの変法にてグラム染色を行った。無蛍光スライドグラススタンプ標本については、蛍光抗体法（間接法）を行なった。グラム染色も蛍光抗体法も、倍率400倍で50視野観察し、*R. salmoninarum*菌体と思われる菌体が見られる場合には、さらに倍率を1000倍にして観察した。検体の腎臓を注意深く摘出し、2-3倍量のPBSを加え、ホモジナイズをした。10分間、100℃に加熱した後、遠心分離して上清を採り、ドットブロット法（PAP法）、ゲル内沈降法、対向免疫電気泳動法、ラテックス凝集反応および共同凝集反応に供試した。

結果

1 各診断法の感度の比較

それぞれの診断法の感度を表9に示した。最も感度が良かったのは、ドットブロット法で 10^2 cells/gの菌数の抗原を検出することが出来た。次に感度が良かったのは、間接蛍光抗体法であり 10^3 cells/gであった。凝集反応においては、共同凝集反応が 10^4 cells/g、ラテックス凝集反応が 10^7 cells/gであった。沈降反応は最も感度が悪く、ゲル内沈降法が 10^9 cells/g、対向免疫電気泳動法において

表9 *R. salmoninarum* 抗原を検出するための各診断法の比較

診断法	感度 (cells/g)
ゲル内沈降法	10^9
ラテックス凝集反応	10^7
対向免疫電気泳動法	10^6
共同凝集反応	10^4
間接蛍光抗体法	10^3
間接ドットブロット法	10^2

も 10^6 cells/g であった。

2 *R. salmoninarum* 自然感染魚を用いての各診断方法の比較

19尾のギンザケのうち5尾にBKDの病徴（眼球突出、腎臓の白点など）が認められた。*R. salmoninarum*の分離は、SKDM培地で、5サンプルから菌の分離ができたが、*R. salmoninarum*が分離された魚のうちNo9以外のすべての魚で同時にKDM-2培地に*A. salmonicida*が発育した。腎臓組織のスタンプ標本のグラム染色においては、1サンプルを除いてすべてBKDの症状が見られたもののみ*R. salmoninarum*と考えられる菌体が観察された。免疫学的診断法においては19サンプル中18サンプルが陽性であったドットプロット法が最も感度が高かった。次に感度が高かったのは間接蛍光抗体法および共同凝集反応で16サンプルが陽性であった。ラテックス凝集反応と対向免疫電気泳動の陽性サンプル数は13、ゲル内沈降法においては、わずかに2サンプルだけが陽性であった（表10）。

表 10 R. salmoninarum 自然感染魚に対する各診断法の比較

魚 病徴	菌分離		グラム染色	ゲル内沈降法	ラテックス凝集反応	共同凝集反応	対向免疫電気泳動法	間接蛍光抗体法	ドットブロット法
	KDM-2	SKDM							
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	+	-	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5	-	-	-	-	-	+	-	+	+
6	-	-	-	-	±	+	+	+	+
7	-	-	-	-	±	+	+	+	+
8	-	-	-	-	±	+	+	+	+
9	+	-	+	+	+	+	+	±	+
10	+	- (+)	+	+	+	+	+	+	+
11	-	-	-	+	+	+	+	+	+
12	-	- (+)	-	-	+	+	+	+	+
13	+	- (+)	+	+	+	+	+	+	+
14	-	- (+)	-	+	+	+	+	+	+
15	-	-	-	-	±	+	+	+	+
16	-	- (+)	-	-	-	+	-	±	+
17	+	- (+)	+	-	+	+	+	±	+
18	-	- (+)	-	-	+	+	+	+	+
19	+	- (+)	+	-	+	+	+	+	+
計	5	0	5	5	2	13	13	16	18

(+) : *A. salmonicida* が分離

第3節 考察

ドットブロット法は、医学の分野においてはELISA法とともに多く用いられているが、魚病学の分野においては、わずかにCipriano *et al.* (1985b) がビブリオ病と Sakai *et al.* (1986b) がせつそう病の診断に用いたのみである。本法は、蛍光抗体法やELISA法における特殊な機器（蛍光顕微鏡やELISAリーダー）を必要とせず、さらに高い感度を示すことが知られている。BKDの診断においても本法は、 10^2 – 10^4 cells/g という高い感度を示した。特に高い感度を示したのは、間接法とPAP法であった。しかしPAP法は、操作が複雑なために時間がかかるなどの欠点がある。そこで以後の実験は、すべて間接法を用いることとした。

次に、ドットブロット法における抗原の特異性について検討を加えたが、今回用いた魚病細菌や一般細菌の間には、まったく交差性が認められなかった。このことは本法が十分に野外においても使用が出来ることを示している。しかし、*R. salmoninarum* 抗原と抗原的に交差性をもつ細菌 (Austin, *et al.*, 1983, 吉水ら, 1987) も報告されており、実際に本法によるBKDの診断を行なう場合にはやはり注意しなければいけないであろう。

今回用いた抗*R. salmoninarum* KU8501株ウサギ血清に対して我が国またはアメリカ合衆国で分離された*R. salmoninarum* 株は、ドットブロット法において、すべて陽性を示した。Getchell *et al.* (1985) は、各国から分離された*R. salmoninarum* の血清型について検討を行い、すべての株が、熱安定性の分子量57Kdの共通抗原を持つことを報告している。今回用いたドットブロット法では、熱抽出抗原を用いており、この*R. salmoninarum* 共通抗原を見逃すことはないと考えられる。

発色剤の選択は、ドットブロット法においてきわめて重要である。表5に示したように発色剤によって感度に大きな差が認められた。そのうち4-クロロ-1-ナフトールは、本法において頻繁に用いられているが感度がきわめて劣ること

が示された。すぐれた感度を示したのは、DAB、0-フェニレンジアミンおよび ABTSであった。これらは安定性においては、4-クロロ-1-ナフトールに劣るものの、すぐれた感度を示し、さらに H_2SO_4 で反応を停止することが出来る。そこで以後の実験にはDABまたはABTSを用いることとした。

野外においてBKDの診断が不可能な場合、サンプルをホルマリン等で固定する必要がある。従ってホルマリン固定サンプルからもBKDの診断が出来ることが望ましい。ホルマリン固定サンプルからのR. salmoninarum抗原の検出はすでにBullock et al.(1975)が蛍光抗体法を用いて行っている。本研究において、ドットブロット法によって5年前のR. salmoninarum感染魚からR. salmoninarum 抗原を検出することが可能であった。さらに今回、サンプルをホルマリン固定した場合としない場合を比較し、ホルマリン固定の方がはるかにR. salmoninarum 抗原の保持にすぐれていることが示された。

一般にBKDは、腎臓に生じる白点状病変の存在によって明らかになることが多く、従って、腎臓が数々の診断に用いられてきた。今回ドットブロット法によってどの組織からR. salmoninarum 抗原を検出しやすいかを検討した結果においても、腎臓からのR. salmoninarum の検出率が高く、次に脾臓と心臓であった。一方、筋肉と腸管から検出された例はきわめて少なく、BKDの病徴が見られた魚のみであった。ゲル内沈降法は、BKDの血清学的診断法として最初に用いられた方法であるが、感度が低く、さらに時間が長くなるために、実用性において劣ると考えられる。Cipriano et al.(1985a)は、その変法である対向免疫電気泳動法が間接蛍光抗体法よりも優れた感度を示すと報告しているが、本実験においてはその感度が、 10^6 cells/gであり、その他の診断法に比べて高くはなかった。同様な結果は、Pascho et al.(1987)によっても報告されている。次に凝集反応による診断法であるが、今回、ラテックス凝集反応と共同凝集反応を用いたが、これらの方法の特長はきわめて短時間に行うことが出来るもので、特に共同凝集反応は広く我が国で用いられている。ラテックス凝集反応と共同凝集反応の感度は、今回の

実験では、それぞれ 10^7 cells/gと 10^4 cells/gであった。共同凝集反応の感度がラテックス凝集反応のそれよりも高かったのは、それぞれの支持体の抗体の吸着性（*Staphylococcus aureus*の菌体は、ウサギの抗体（IgG）を特異的に吸着するがラテックス粒子は非特異的に γ -グロブリン分画を吸着する）の差によると考えられる。

蛍光抗体法は、BKDの診断に最も広く用いられている方法である。本法は、きわめて高い感度（ 10^3 cells/g）を示すためにBKDの診断のみならず保菌魚を検査するほとんど唯一の方法であるとされている（Evelyn *et al.*, 1981）。しかし蛍光顕微鏡を必要とすることや観察に長い時間を必要とするという欠点も指摘されている。

今回用いた方法で、最もすぐれた感度を示したのは、ドットブロット法（ 10^2 cells/g）であった。さらに養殖ギンザケからのBKDの検査においても最も高い検出率（18サンプル中17サンプル陽性）を示した。これらの結果よりドットブロット法は、病魚の診断のみならず保菌魚の検出にも適用出来ることが明かとなった。

このようにドットブロット法は、特殊な装置を必要とせずしかも優れた感度を示すことからBKDの診断にはきわめて有用な方法と考えられる。しかしながら実際に菌体を確認することがないために偽陽性反応が存在した場合、これを見分けることが出来ない。従って本法は、BKD病魚の診断や保菌魚の検査において一次スクリーニングとして使い、陽性になったサンプルについては、さらにその他の方法によって再確認することが必要である。

第2章 ドットプロット法による *R. salmoninarum* 保菌魚の調査

わが国におけるBKDの存在は、1973年に木村・栗倉(1977)によって最初に報告されるまで知られておらず、本病は、アメリカまたはカナダからの輸入卵によって持ち込まれたものと考えられている。しかし1973年の本病の発見以後、BKDは日本各地において発生がみられるようになってきた。

近年、ギンザケ養殖は、三陸沿岸を中心としますます生産高を上げており、1989年度には、1万6千トンに達している。ギンザケ養殖は、まず、発眼卵をアメリカ・カナダより輸入し、それを淡水でふ化させ、そのまま約10カ月間飼育する。そして体重が150-200gに達したときに、これを海水に馴致し、さらに10カ月間、海水で飼育する。そして体重が2-3Kgになったものを市場に出荷する。このギンザケ養殖において最も頻繁にBKDの発生が見られるのは、淡水から海水に魚を馴致した直後と、その後、水温が上昇して12-13℃に達したときである。しかしながらギンザケ養殖において、現在BKDがどのくらい流行しているかは調べられていない。そこでギンザケ養殖におけるBKDの実態を把握するために、ドットプロット法を用いてBKD病魚の診断と保菌魚の調査を行った。

BKDは、病原菌に汚染された卵などによって輸入された伝染病と考えられているが、わが国の在来魚に対しても被害を与えている。しかし、どれくらい本病が在来魚に広がっているかは不明である。そこでヤマメ、イワナなどの在来魚についても保菌魚の調査を行った。

*R. salmoninarum*の病原性に関する実験的研究は、Sanders *et al.*(1978)によって、ギンザケ、スチールヘッド *O. mykiss*、ベニザケについて行われ、また、Snieszko and Griffin(1955)によってカワマス、Ordal and Earp(1956)によってマスノスケについて行われている。しかし、我が国在来魚種に対する病原性に関する知見は乏しい。そこで、特に重要と考えられるニジマス、ヤマメ、ギンザ

ケ、イワナ、アユ Plecoglossus altivelis、シロサケおよびコイ Cyprinus carpio に対する R. salmoninarum の病原性について検討を加えた。

第1節 ドットプロット法を用いた *R. salmoninarum* 保菌魚の調査

材料および方法

1 サンプルング

各養魚場から異常魚（斃死魚、排水口付近で漂っている魚、体色が黒化した魚等）を中心にサンプルングを行った。しかしそのような魚が見当たらない場合には、正常魚からサンプルングを行った。サンプルはできる限り1養殖場から20尾以上を取るようにした。

2 BKDの診断および保菌魚の調査法

サンプルを研究室に持ち帰った後に、外部および内部の異常について調べた。次に、腎臓を取り出し、2-3倍量のPBSを加えて前章で述べた方法により、熱抽出抗原を作製した。この熱抽出抗原を用いて間接ドットプロット法により *R. salmoninarum* 抗原の検出を試した。また、一部のサンプルについては間接蛍光抗体法も合わせて実施した。

3 ギンザケ

ギンザケのサンプルングは、淡水飼育、淡水から海水への馴致および海水飼育の3つの時期に分けて行った。

淡水飼育ギンザケのサンプルング法は、前述のとおりであるが、淡水から海水への馴致時のサンプルングおよび海水飼育ギンザケのサンプルングは、魚体が大きく正常魚の入手が困難なために主に異常魚に対して行った。

淡水飼育ギンザケは、1985年から1989年にかけて岩手県、宮城県、栃木県の52カ所から集めた計 1532尾を検査対象とした。

淡水から海水馴致時に集めたギンザケは、1986年から1989年までで計 635尾で

あった。

海水飼育ギンザケのサンプル尾数は、へい死魚しかサンプリング出来なかったために、1986年から1989年までで計 383尾と少なかった。(表 11)

4 ヤマメ

ヤマメのサンプルは、すべて淡水養殖中のもので1986年から1988年にかけて、岩手県、宮城県、栃木県下の16カ所から計241尾を集めた。

5 サクラマス

サクラマスに対する検査は、岩手県沿岸の3カ所より採捕された計73尾を用いて行なった。これらの魚は、すべて天然魚(平均体重2,2Kg)であり、すべて外観上異常が認められなかった。

6 イワナ

イワナは1986年と1987年に岩手県と福島県下の5カ所の養殖場より計77尾を集めた。

7 ニジマス

1987年と1988年に5カ所の養魚場より集められた計46尾のニジマスについての *R. salmoninarum* 検査を行った。これらのニジマスには外観上、まったくBKDの病徴がみられなかった。

8 シロサケ

シロサケについては、放流前の稚魚と川を溯上してきた親魚を用いて検査を行った。稚魚については、魚体が小さいために、全体をホモジナイズし、これから熱抽出抗原を作製した。サンプリングは、1988年にはギンザケ養殖が行われてい

表 1 1 養殖ギンザケのサンプリング

飼育環境	年度	養殖場数	尾数
淡水	1985	1	19
	1986	25	360
	1987	28	852
	1988	7	65
	1989	3	17
淡水→海水	1986	6	321
	1987	6	102
	1988	3	63
	1989	6	149
海水	1986	8	54
	1987	3	18
	1988	5	156
	1989	5	155

表12 その他のサケ科魚類のサンプリング

魚種	飼育環境	年度	養殖場数	尾数
ヤマメ	淡水	1985	1	35
	"	1986	3	75
	"	1987	10	126
	"	1988	2	13
サクラマス	海水	1987	2	51
		1988	1	22
イワナ	淡水	1986	2	38
	"	1987	4	39
ニジマス	淡水	1987	2	20
		1988	3	26
シロサケ	淡水	1988	1	10
		1989	1	60
	海水	1988	1	20
		1989	3	212
マスノスケ	海水	1987	1	2
ヒメマス	淡水	1988	1	5

る湾口の河川で行った。さらに1989年においては、ギンザケ養殖が行われていない湾口の河川でもサンプリングを行った。

9 マスノスケおよびヒメマス

マスノスケに対する検査は、1987年に淡水養殖されていた2尾について行った。一方、ヒメマスについては、1988年に福島県下で淡水で養殖されていた5尾を対象とした。これらの魚はいずれも外観上、まったく異常が認められなかった。

結果

1 淡水養殖ギンザケ

淡水で養殖中のギンザケ（体重20g-100g）の1985年から1989年までのR. salmoninarum BKD感染率を表13-16に示した。47カ所から集めた1532尾のうちBKDの病徴が見られた個体は、わずか8尾であった。しかし、ドットブロット法によってR. salmoninarum 抗原陽性と判断された個体は、264尾に及び、これは全体の17.2%を示した。年次ごとのR. salmoninarum 抗原陽性率の比較は、各年によってサンプル個体数が大きく違うために行わなかった。14カ所の養殖場については、2年にわたり調査を実施することができたが、そのうち2年連続でBKDが検出されたのは、A1, A15, A22, A23, A25, CB, NS, GK, SS, KS, EK, TK の12カ所であった。

2年目にBKDが検出されなかったTI, YG, SK の3カ所では、いずれも2年目に3週間エリスロコイシンの経口投与が行われていた。逆に初年度にR. salmoninarum 抗原陽性魚が検出されず2年目に初めて検出された養殖場も存在した（表32）。

表 1 3 1985および1986年度にサンプリングされた淡水養殖ギンザケの
BKDの出現と *R. salmoninarum* 抗原の保有状況

養魚場	年、月	サンプル数	BKD感染魚数	
			病徴	ドットプロット法
A1	1985, 10	19	4	18
A2	1986, 5	30	0	17
A3	" 5	50	0	12
A1	" 5	30	0	0
A4	" 5	50	0	13
A5	" 6	48	0	23
A6	" 6	15	0	6
A7	" 9	27	0	14
A8	" 9	21	0	7
A9	" 9	18	0	7
A1	" 10	50	0	6
A10	" 7	15	2	2
A11	" 7	20	0	0
CB	" 11	7	0	2
NS	" 10	23	0	10
TI	" 11	25	0	2
GK	" 10	19	0	8
YG	" 11	25	0	9
SK	" 11	10	0	6

表 1 3 (続き)

養魚場	年、月	サンプル数	BKD感染魚数	
			病徴	ドットプロット法
SS	" 10	25	0	12
KS	" 10	15	0	1
SW	" 11	1	0	0
CH	" 10	1	0	0
TK	" 10	1	0	0
I	" 7	9	0	3
EK	" 10	25	0	5
合計		579	6	183 (31.6%)

表14 1987年度にサンプリングされた淡水養殖ギンザケの

BKDの出現と *R. salmoninarum* 抗原の保有状況

養魚場	月	サンプル数	病徴	ドットプロット法
SK	10	20	0	0
KG	10	21	0	0
TG	10	21	0	2
NH	9	30	0	1
SS	9	30	0	5
OY	9	30	0	0
NSB	10	24	0	0
CH	10	30	0	1
EK	9	30	0	3
CS	9	34	0	2
YGK	10	7	0	1
SW	10	27	0	0
ED	9	25	0	0
EKS	9	30	0	1
NS	10	32	0	4
CK	9	29	0	0
MK	9	30	0	3
SKP	10	21	0	1
SSC	10	30	0	3
CB	10	31	0	1
YG	10	20	0	0

表 1 4 (続 き)

養 魚 場	月	サ ン プ ル 数	病 徴	ドットプロット法
KS	10	31	0	1
GK	10	31	0	1
TI	10	30	0	0
SE	9	30	0	1
A12	10	158	0	28
A13	11	4	0	0
A14	11	10	0	0
合 計		852	0	59(6.9%)

表 15 1988年にサンプリングされた淡水養殖ギンザケの

BKDの出現と *R. salmoninarum* 抗原の保有状況

養魚場	月	サンプル数	病徴	ドットプロット法
A15	4	26	2	9
A16	10	5	0	2
A14	11	5	0	0
A17	11	5	0	0
A18	11	9	0	0
A19	11	5	0	0
A20	11	10	0	0
合計		65	2	11(16.9%)

表 1 6 1989年度に淡水において飼育されたギンザケのBKDの検査

養魚場	月	サンプル数	病徴	ドットプロット法
A15	8	5	0	4
A21	8	10	0	6
A22	8	2	0	1
合計		17	0	11 (64.7%)

2 海水馴致ギンザケ

1986年から1989年までの4年間で、635尾の魚が検査され、そのうち160尾（25.1%）がBKD陽性と判断された。さらにBKDの病徴を示すサンプルも38尾（5.9%）存在した。そのうち1986年および1987年度のサンプルからそれぞれ2カ所ずつR. salmoninarum抗原が検出されなかった養魚場があったが、いずれもサンプル数（5尾以下）が少なかった。これらの魚はいずれも馴致時の異常魚をサンプリングしたのであるが、その他の病原細菌は、1%NaClを加えたトリプトソーヤ寒天培地（日水）およびブレイン・ハート・インヒュージョン寒天培地（日水）による検査では分離されなかった（表17-20）。

3 海水飼育ギンザケ

主に、へい死魚または異常魚を中心に集められた海水養殖ギンザケ383尾のうち、129尾がBKD陽性を示した（33.6%）、そのうち病徴を示した魚が、34尾（9.3%）に及んだ（表21-24）。

11カ所のうち10カ所のサンプルにR. salmoninarum抗原陽性の魚が見られた。また、抗原陽性率は、3-6月にサンプリングした魚に高くなる傾向がみられた。2カ所の養魚場で3カ年にわたってサンプリングを行ったが、いずれの年にもかなりの割合で抗原陽性魚が検出された。

4 ヤマメ

養殖ヤマメからのR. salmoninarum抗原陽性率を表25に示した。16カ所から集められた241尾のうちBKDの病徴から見られたものは10尾、ドットプロット法でR. salmoninarum抗原陽性と判断されたものは52尾（21.5%）であった。しかしBKDに感染していた養殖場は、16カ所のうちの7カ所であり、ギンザケに比べて少なかった。

表 1 7 1986年に馴致時にサンプリングしたギンザケにおけるBKDの
出現と*R. salmoninarum*抗原の保有状況

養魚場	月	サンプル数	病徴	蛍光抗体法	ドットプロット法
A1	10	215	7	29	46
A6	10	3	0	0	0
A23	10	30	2	11	15
A24	10	27	0	6	5
A25	10	1	0	0	0
A26	10	45	0	7	14
合計		321	9	53	80(24.9%)

表18 1987年に馴致時にサンプリングしたギンザケにおけるBKDの
出現と*R. salmoninarum*抗原の保有状況

養魚場	月	サンプル数	病徴	蛍光抗体法	ドットプロット法
A15	10	5	0	-	0
A25	10-11	44	0	1	5
A6	11	5	0	0	0
A22	11	22	5	7	10
A23	11	17	0	0	6
A26	11	9	1	1	1
合計		102	6	9	22(21.5%)

表19 1988年度に馴致されたギンザケにおけるBKDの出現と

*R. salmoninarum*抗原の保有状況

養魚場	月	サンプル数	病徴	ドットブロット法
A25	10	9	1	5
A22	10-11	38	1	14
A15	11	16	0	7
合計		63	2	26(41.2%)

表 20 1989年度に馴致されたギンザケにおけるBKDの出現と

*R. salmoninarum*抗原の保有状況

養殖場	月	サンプル数	病徴	ドットプロット法
A22	10	39	8	10
A27	10	20	0	1
A1	10-11	32	2	6
A15	10-11	20	0	7
A6	11	18	5	4
A25	11	20	6	4
合計		149	21	32(21.4%)

表 2 1 1986年に海水で養殖されたギンザケからのBKDの出現と

*R. salmoninarum*抗原の保有状況

養殖場	月	サンプル数	病徴	ドットプロット法
C1	2	1	0	0
	4	16	2	16
B1	2	3	1	3
	5	2	0	2
B2	2	1	1	1
	3	4	0	0
	5	1	0	1
	7	2	0	0
B3	3	2	0	0
	5	1	0	1
B4	3	2	0	0
	5	3	1	3
B5	3	6	3	3
B6	4	2	1	2
C2	4	8	2	8
合計		54	11	40(74.0%)

表 2 2 1987年に海水で養殖されたギンザケからのBKDの出現と
R. salmoninarum抗原の保有状況

養殖場	月	サンプル数	病徴	ドットプロット法
B1	4	5	1	2
B7	4	4	2	3
B6	5	9	1	1
合計		18	4	6(33.3%)

表 2 3 1988年に海水で養殖されたギンザケからのBKDの出現と

R. salmoninarum抗原の保有状況

養殖場	月	サンプル数	病徴	ドットプロット法
C1	4	70	0	21
C2	4	30	0	12
	6	15	5	10
B1	4	21	6	9
B6	4	5	0	4
	6	9	3	4
B7	4	6	0	4
合計		156	14	64(41.0%)

表24 1989年に海水で養殖されたギンザケからのBKDの出現と

R. salmoninarum抗原の保有状況

養殖場	月	サンプル数	病徴	ドットプロット法
C3	1	37	0	0
B8	3	23	1	4
	4	16	1	6
B6	4	19	2	9
	5	20	0	0
B2	5	20	1	0
B5	5	20	0	0
合計		155	5	19(12.2%)

表25 養殖ヤマメからのBKDの出現と*R. salmoninarum* 抗原の保有状況

養魚場	年、月	サンプル数	病徴	蛍光抗体法	ドットブロット法
A60	1985, 5	35	6	20	22
A50	1986, 6	30	0	4	12
A51	1986, 7	21	0	0	0
	1988, 4	3	0	-	0
A52	1986, 7	16	0	0	2
A56	1987, 4	9	1	-	3
A57	1987, 4	10	0	-	1
A12	1987, 4	10	0	-	0
A53	1987, 10	18	0	0	0
A54	1987, 10	15	0	0	0
A55	1987, 10	18	0	0	0
A14	1987, 10	10	0	0	0
A61	1987, 10	20	0	0	0
A62	1987, 10	9	2	5	5
A63	1987, 10	7	0	0	0
A58	1988, 10	10	1	-	7
合計		241	10	29	52(21.5%)

5 イワナ

6カ所から集められた計77尾の養殖イワナのうち4尾がドットプロット法でR. salmoninarum抗原が陽性と判断され(5.1%)、そのうち1尾がBKDの病徴を示した。しかし、R. salmoninarum抗原が検出された養魚場は、1カ所のみであった(表26)。

6 ニジマス・マスノスケおよびヒメマス

ニジマスは、5カ所から計46尾が集められたが、BKDの抗原陽性魚は、2尾のみであった。これらの魚は、いずれもBKDの病徴を示していなかった。

今回用いたマスノスケおよびヒメマスからはBKDの抗原は検出されなかった(表26)。

7 放流用のシロサケ

1988年と1989年にわたり計70尾の放流用のシロサケのBKD感染を調べたところ、R. salmoninarum抗原はまったく検出されなかった(表27)。

8 天然水域において採捕されたシロサケおよびサクラマス

シロサケは、ギンザケ養殖を行っている湾から潮上してきたものを川の下流でサンプリングした。1988年度に20尾中4尾に、1989年度に100尾中3尾にBKD抗原陽性が見られた(表27)。またギンザケ養殖が行われていない2つの湾で採捕されたシロサケにおいて112尾中1尾がBKD抗原陽性であった。

サクラマスにおいては、1987年度に2カ所からの51尾中2尾、1988年度に1カ所からの22尾中9尾にR. salmoninarum抗原が検出された。しかしこれらの魚はBKDの病徴を示していなかった(表28)。

表26 養殖イワナ、ニジマス、マスノスケおよびヒメマスからの
BKDの出現と *R. salmoninarum* 抗原の保有状況

魚種	養魚場	年、月	サンプル数	病徴	蛍光抗体法	ドットブロット法
イワナ	A12	1986, 6	18	0	0	0
	A50	1986, 6	20	0	0	0
	A56	1987, 4	4	1	-	4
	A59	1987, 6	10	0	-	0
	A14	1987, 11	10	0	-	0
	A60	1987, 11	15	0	-	0
ニジマス	A12	1987, 6	10	0	-	0
	A59	1987, 6	10	0	-	0
	A16	1987, 10	12	0	-	2
	A14	1988, 11	5	0	-	0
	A17	1988, 11	9	0	-	0
マスノスケ	A13	1987, 11	2	0	-	0
ヒメマス	A59	1987, 6	5	0	-	0
<hr/>						
合計	イワナ		77	1		4(5.1%)
	ニジマス		46	0		2(4.3%)
	マスノスケ		2	0		0
	ヒメマス		5	0		0

表 2 7 放流および潮上シロザケにおけるBKDの検査

場所	年、月	サンプル数	病徴	ドットプロット法
ユズチ (稚魚)	1988, 4	10	0	0
クラハヤカマ (稚魚)	1989, 5	60	0	0
(潮上魚)	1988, 11	20	0	4
(")	1989, 11	100	0	3
サカリ (")	1988, 12	12	0	1
ツカマルイシ (")	1989, 12	104	0	0
稚魚		70	0	0
潮上魚		232	0	8

表 2 8 岩手県沿岸より採捕されたサクラマスにおけるBKDの検査

場所	年、月	サンプル数	病徴	ドットプロット法
宮古定置網	1987, 4	48	0	2
三陸定置網	1987, 5	3	0	0
"	1988, 10	3	0	2
"	1988, 11	19	0	7
合計		73	0	11(15.0%)

第2節 各魚種の R. salmoninarum に対する感受性

材料および方法

1 使用菌株および攻撃菌の調製

感染実験には、すべて R. salmoninarum KU8504株を用いた。KDM-2培地にて15°Cで14-18日間培養し、可視大のコロニー形成後、3日目の菌を実験に使用した。白金耳で集めた菌をPSに懸濁した後、菌液の一部を採ってメチレンブルー染色を行い、血球算定盤で菌の濃度を測定し、原液にPSを加え菌濃度を 10^9 cells/mlに調製した。

2 実験魚

2-1 ギンザケ

ギンザケは、実験時までBKDの発生していない養魚場から入手した。さらにその中の10尾についてドットプロット法によってBKDが陰性であることを確認した。実験魚の平均体重は6gであった。実験魚は、北里大学内の水槽に収容し12°Cで10日間飼育した後、感染実験に供した。感染実験区は、2区設け、1実験区あたりの尾数を22-25尾とした。1尾当りの接種菌量は、 2.0×10^7 あるいは 2.0×10^8 cellsであった。

2-2 シロサケ

シロサケは、岩手県下のふ化場より入手した。北里大学内の水槽にて平均体重5gになるまで飼育後、感染実験区は2区設け、1区当たり40尾ずつとした。1尾当たり接種量は、 5.7×10^7 および 5.7×10^8 cellsであった。

2-3 ニジマス

ニジマス（平均体重20g）は、岩手県内水面指導所より入手し、10日間、12℃で北里大学内の水槽にて飼育した。感染実験区は2区設け1区当り18-20尾とし、1尾につき 4.8×10^7 および 4.8×10^8 cells/fish の接種量で感染実験を行った。

2-4 ヤマメ

岩手県下のBKDが発生していない養殖場から平均体重4.2gのヤマメを入手した。ギンザケの場合と同じように同じ群のヤマメ10尾をドットブロット法を用いてBKD抗原陰性であることを認めた。この魚を15日間12℃で飼育した。感染実験区を2区設け1区当り60-65尾とし、1尾につき 1.2×10^7 および 1.2×10^8 cells/fish の接種量で感染実験を行った。

2-5 イワナ

イワナ（平均体重15g）も岩手県下の養殖場から入手後、ギンザケ、ヤマメと同様にBKDの検査を行い抗原陰性であることを確認した。感染実験区を、2区（1区当り25尾）設け、 1.2×10^7 と 1.2×10^8 cells/fishの接種量で感染実験を行った。

2-6 アユ

アユ（平均体重20g）は、岩手県下の養殖場から入手し、20日間12℃で飼育後、 1.2×10^7 cells/fish の接種量で21尾を用いて、感染実験を行った。

2-7 コイ

岩手県内水面試験場より入手した平均体重15gのコイを用いた。12℃で10日間飼育した後、 4.8×10^7 および 4.8×10^8 cells/fish（1区当り19尾）の接種量で感染実験を行った。

3 感染実験

感染実験は、すべて腹腔内注射法で行った。それぞれの濃度に調製した菌液を予めMS-222で麻酔し、魚に1尾当り0.1mlずつ（ギンザケ、ヤマメおよびシロサケについては0.05ml）注射した。対照として各魚種10-20尾からなるPS注射区を設けた。魚は感染後水温12℃で飼育し、50日間観察した。

斃死魚については、BKDの病徴を調べた後、腎臓のスタンプ標本を作製し、前述の方法でグラム染色を行った。さらに、腎臓の熱抽出液を作製し、ドットブロット法によりR. salmoninarum抗原を検査し、実験終了後、生存魚については、BKDの病徴の有無を調べ、さらに腎臓のスタンプ標本を作製し、グラム染色と間接蛍光抗体法を行った。また、腎臓熱抽出液を作製しドットブロット法を行った。

結果

1 ギンザケ

2.0×10^8 cells/fishのR. salmoninarumを腹腔内注射したギンザケは、試験開始後11日目から斃死が始まり、16-18日目に斃死のピークを迎えた。そして35日目までに24尾中21尾の斃死が観察された。一方、 2.0×10^7 cells/fishの攻撃区においても35日目までに25尾中18尾の斃死が見られた。これらすべての斃死魚の腎臓塗抹スタンプ標本からグラム染色によってR. salmoninarum菌体が確認された。また、すべての生存魚の腎臓塗抹スタンプ標本から蛍光抗体法によってR. salmoninarum菌体が認められた。

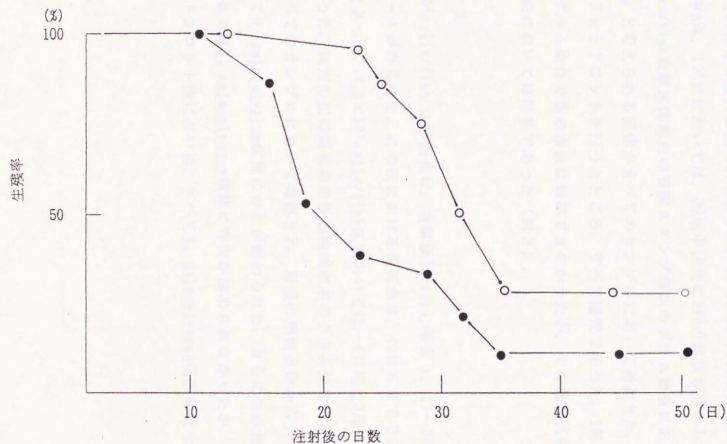


図2 *R. salmoninarum* を 2.0×10^6 cells/fish (●) および 2.0×10^7 cells/fish (○) 腹腔内注射したギンザケの生存率

2 シロサケ

5.7×10^8 cells/fish 区においてシロサケは、実験感染後、7日目から斃死が始まり、11-12日目にピークを迎えた。そして18日後にはすべての魚が斃死した。一方、 5.7×10^7 cells/fish 区においても、11日目から斃死が始まり、15日目にピークを示した。そして20日目には、40尾中39尾が斃死した。しかし、それ以降50日目の実験終了まで斃死は見られなかった。 10^8 cells/fish 攻撃区においては40尾の斃死魚中5尾、 10^7 区においては、39尾中10尾にBKDの症状が見られた。 10^7 および 10^8 cells/fish 攻撃区斃死魚の腎臓スタンプ標本のグラム染色において R. salmoninarum と考えられる菌体がすべてのサンプルにおいて確認され、さらに腎臓を用いてドットプロットを行ったところ、すべて陽性であった。1尾の生存魚においては、グラム染色で菌の存在は確認できなかったが、その蛍光抗体法とドットプロット法においては陽性であった (図3)。

3 ニジマス

4.8×10^8 cells/fish 区の斃死は、攻撃後18日目に始まり、27-30日目にかけて斃死のピークがみられた。この区における斃死魚は、40日目までで18尾中17尾 (94.4%) であった。 4.8×10^7 cells/fish 区においては、4日間に3尾の斃死しか認められなかった。両方の区の斃死魚の腎臓塗抹標本のグラム染色においてグラム陽性菌がすべてのサンプルにおいて確認され、腎臓の熱抽出物からドットプロット法において R. salmoninarum 抗原の存在が認められた。さらに生存魚においても、グラム染色では R. salmoninarum 菌体の存在が認められなかったが、蛍光抗体法およびドットプロット法においは、すべて R. salmoninarum 抗原陽性を示した (図4)。

4 ヤマメ

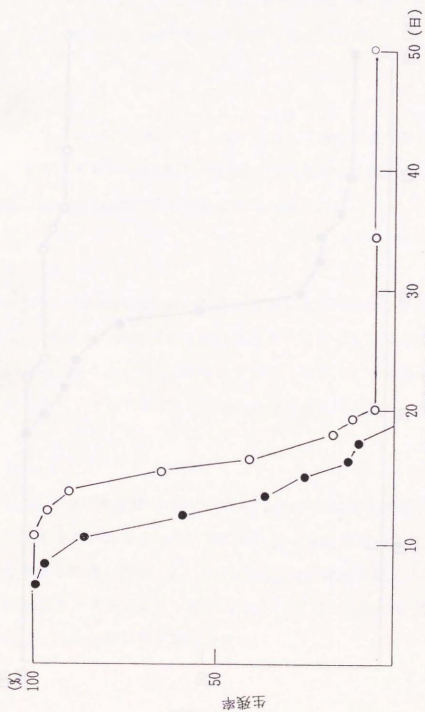


図3 *E. salmoninarum* を 5.7×10^6 cells/fish (●) および 5.7×10^7 cells/fish (○) 腹腔内注射したシロザケの生存率

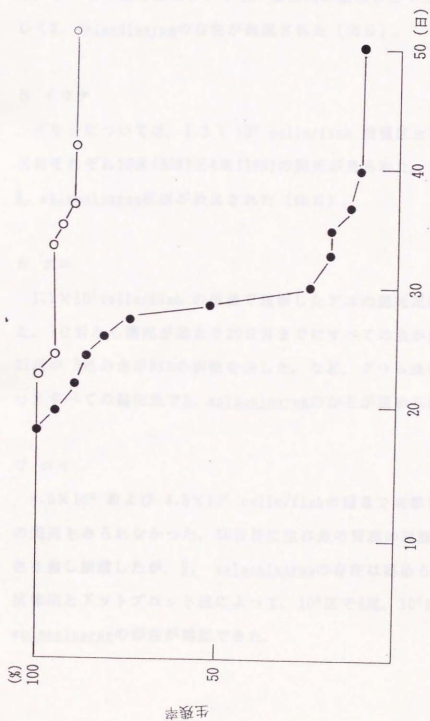


図4 *R. salmoninarum* を 4.8×10^8 cells/fish (●) および 4.8×10^7 cells/fish (○) 腹腔内に注射したニジマスの生存率

ヤマメについては、それぞれ 1.2×10^8 と 1.2×10^7 cells/fish の濃度で感染実験を行った。 1.2×10^8 cells/fish 注射区においては35日目までに65尾中59尾の魚が斃死した(91%)。斃死のピークは、15-18日目にかけて見られた。一方、 1.2×10^6 cells/fish区においては、60尾中32尾の斃死(53%)が見られたが、斃死のピークは認められず、だらだらと斃死が続いた。グラム染色およびドットブロット法によって両区のすべての斃死魚に R. salmoninarum の存在が確認された。また、すべての生存魚についても、蛍光抗体法およびドットブロット法によって同じく R. salmoninarum の存在が確認された(図5)。

5 イワナ

イワナについては、 1.2×10^8 cells/fish 接種区と 1.2×10^7 cells/fish 接種区にそれぞれ20尾(80%)と4尾(16%)の斃死が見られた。そしてすべての生存魚から R. salmoninarum 抗原が検出された(図6)。

6 アユ

1.2×10^7 cells/fish の菌量で攻撃したアユの斃死尾数の日変化を図7に示した。7日目から斃死が始まり20日目までにすべての魚が斃死した。これら斃死魚21尾中5尾の魚がBKDの病徴を示した。なお、グラム染色、ドットブロット法によってすべての斃死魚で R. salmoninarum の存在が認められた(図7)。

7 コイ

4.8×10^8 および 4.8×10^7 cells/fish の菌量で攻撃したコイには、50日間1尾の斃死もみられなかった。50日目に生存魚の腎臓の組織塗抹標本を作りグラム染色を施し検鏡したが、R. salmoninarum の存在は認められなかった。しかし蛍光抗体法とドットブロット法によって、 10^8 区で8尾、 10^7 区で9尾の魚について R. salmoninarum の存在が確認できた。

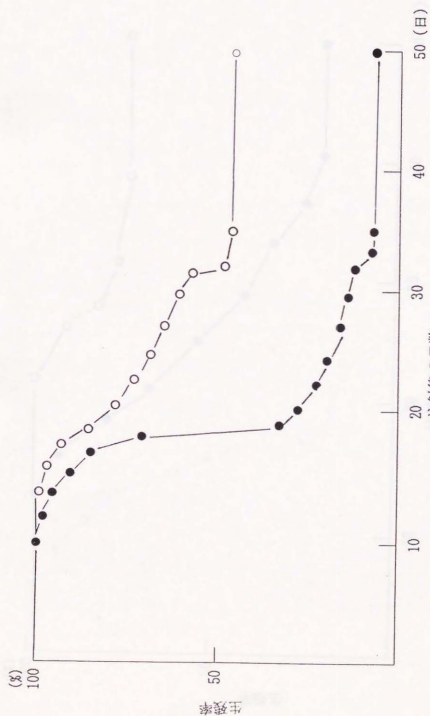


図5 *R. salmoninarum* を 1.2×10^8 cells/fish (●) および 1.2×10^7 cells/fish (○) 腹腔内注射したヤマメの生存率

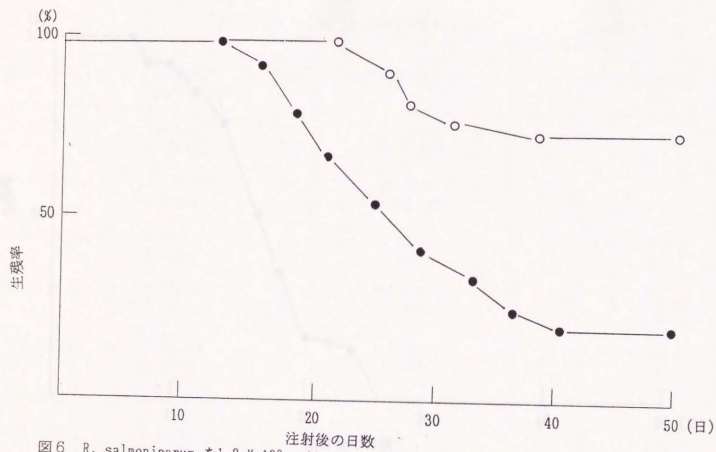


図6 *R. salmoninarum* を 1.2×10^8 cells/fish (●) および 1.2×10^7 cells/fish (○) 腹腔内注射したイワナの生残率

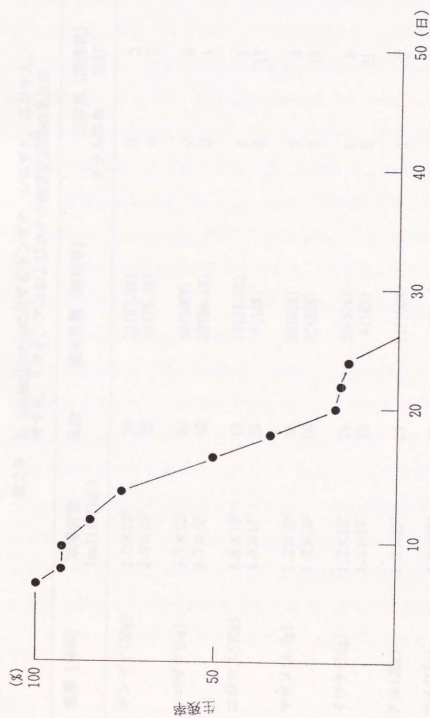


図7 *R. salmoninarum* を 1.2×10^7 cells/fish (●) 腹腔内注射したアユの生存率

表29 *R. salmoninarum*に対するギンザケ、シロザケ、ニジマス、ヤマメ、イワナ、アユおよびコイの感受性試験のまとめ

魚種 (体重)	攻撃菌数 (cells/fish)	尾数	斃死尾数 (斃死率)	生存魚 (陽性数)		
				グラム染色	IFAT ¹⁾	DBA ²⁾
ギンザケ (30g)	2.0×10^8	24	21 (87.5%)	0	3	3
	2.0×10^7	25	18 (72.0%)	0	7	7
シロザケ (5g)	5.7×10^8	40	40 (100%)	0	0	0
	5.7×10^7	40	39 (98.1%)	0	1	1
ニジマス (20g)	4.8×10^8	18	17 (94.4%)	0	1	1
	4.8×10^7	20	3 (15%)	0	17	17
ヤマメ (4.2g)	1.2×10^8	65	59 (91%)	0	6	6
	1.2×10^7	60	32 (53%)	0	18	18
イワナ (15g)	1.2×10^8	25	20 (80%)	0	5	5
	1.2×10^7	25	4 (16%)	0	21	21
アユ (20g)	1.2×10^7	21	21 (100%)	0	0	0
コイ (15g)	4.8×10^8	19	0 (0%)	0	8	8
	4.8×10^7	19	0 (0%)	0	9	9

IFAT¹⁾: 間接蛍光抗体法

DBA²⁾: ドットプロット法

第3節 考察

本章に述べた調査では総計2550尾の養殖ギンザケに対してBKDの検査を行った。その結果、淡水養殖期のギンザケのR. salmoninarum抗原陽性率は17.2%、淡水から海水への馴致時のギンザケの陽性率は25.1%、また海水養殖期のそれは、33.6%と成長にともなうてR. salmoninarumの感染率が增大していることが示唆された（表30）。養殖ギンザケのR. salmoninarum感染を調べるには、淡水養殖期から海水養殖期まで同じグループについて追跡調査するのが望ましい。しかし、これは海水養殖業者が、複数の淡水養殖業者から購入したギンザケ稚魚を1つのいけすの中に混ぜ合わせるため、実施出来なかった。しかし、いくつかのグループについては、淡水養殖期から馴致時にかけてのBKDの出現率の変化が調べることができた。その結果は表31のとおりであった。1986年度、A1養魚場においては、5月のサンプリング時にはまったくR. salmoninarum陽性魚が検出されなかったが、8月は50尾中6尾のR. salmoninarum陽性魚が見られ、そして馴致時には、215尾中46尾と増加し、さらに7尾の魚に病徴が見られた。同様なことが、他の養魚場においても認められた。これらのことは、淡水養殖期にR. salmoninarumの水平感染が進行していることを示していると思われる。

淡水養殖場における2年間のR. salmoninarumの疫学調査の結果をまとめると表32の通りであった。毎年11月頃にはすべての魚を出荷するので、前年度のR. salmoninarum感染魚が残ってないにもかかわらず、2年連続でR. salmoninarum陽性魚が検出される養殖場が多かった。現在、ギンザケ卵の輸入に際してはR. salmoninarumによる汚染の有無がチェックされ汚染卵は輸入されない防疫システムが確立し、以前に比べてR. salmoninarumによる汚染卵の輸入は少なくなってきたと言われている。しかしこのようにBKD感染魚の減少する傾向が見られず、新しい卵を入手してもBKDが発生することから、ギンザケ卵のR. salmoninarumのチェックが不十分であるか、あるいはすでにそれらの養魚場がR. salmoninarumによつ

表30 養殖ギンザケにおけるBKDの出現率

飼育環境	年度	養殖場数	尾数	病徴	陽性数と陽性率(%)
淡水	1985	1	19	4	18(98.7)
	1986	25	579	2	165(28.4)
	1987	28	852	0	59(6.9)
	1988	7	65	2	11(16.9)
	1989	3	17	0	11(64.7)
	小計		1532	8	264(17.2)
馴致	1986	6	321	9	80(24.9)
	1987	6	102	6	22(21.5)
	1988	3	63	2	26(41.2)
	1989	6	149	21	32(21.4)
	小計		635	38	160(25.1)
海水	1986	8	54	11	40(74.0)
	1987	3	18	4	6(33.3)
	1988	5	156	14	64(41.0)
	1989	5	155	5	19(12.2)
	小計		383	34	129(33.6)
合計			2550	80	553(21.6)

表 3 1 淡水養殖期から馴致時におけるBKDの出現と陽性数の変化

年度	養魚場	月	サンプル数	病徴	陽性数
1986	A1 (淡)	5	30	0	0
	" (淡)	8	50	0	6
	" (馴)	10	215	7	46
1988	A15 (淡)	4	26	2	9
	" (馴)	11	16	0	7
1989	A15 (淡)	8	5	0	4
	" (馴)	11	20	0	7

表32 淡水ギンザケ養殖場におけるBKDの変遷（馴致時も含む）

養魚場	年、月	サンプル数	BKDの病徴	陽性数
A1	1985,10	19	4	18
	1986, 5	30	0	0
	1986, 8	50	0	6
A6	1986,10	3	0	0
	1987,11	5	0	0
A23	1986,10	30	2	15
	1987,11	17	0	6
A25	1986,10	1	0	0
	1987,10-11	44	0	5
	1988,10	9	1	5
	1989,11	20	6	4
CB	1986,11	7	0	2
	1987,10	31	0	1
NS	1986,10	23	0	10
	1987,10	32	0	4
GK	1986,10	19	0	8
	1987,10	31	0	1
SS	1986,10	25	0	12
	1987, 9	30	0	5
KS	1986,10	15	0	1
	1987,10	31	0	1

表 3 2 続 き

養 魚 場	年、月	サンプル数	BKDの病徴	陽性数
EK	1986,10	25	0	5
	1987,10	30	0	3
TI	1986,11	25	0	16
	1987,10	30	0	0
YG	1986,11	25	0	9
	1987,10	26	0	0
SK	1986,11	10	0	6
	1987,10	20	0	0
SW	1986,11	1	0	0
	1987,10	27	0	0
CH	1986,10	1	0	0
	1987,10	30	0	1
TK	1986,10	1	0	1
	1987,10	30	0	1
A22	1987,11	22	5	10
	1988,10-11	38	1	14
	1989,10	39	8	10
A15	1988, 4	26	2	9
	1989, 8	5	0	4
A15 (馴致時)	1987,10	5	0	0
	1988,11	11	0	7
	1989,10	20	0	7

て汚染されていたと考えられる。今回、調査を行った養魚場のうち2年目にR. salmoninarum BKD抗原陽性魚が検出されなかったものが3カ所あった。これらの養魚場の2年目の魚にもR. salmoninarum感染魚はいたと思われるが、調査以前に水産試験場の指導により3週間エリスロマイシン投与が行なわれたためR. salmoninarum感染魚の把握ができなかった。BKDに対するエリスロマイシンの治療効果はGroman and Klontz (1983)がマスノスケ、Austin (1985)がニジマス、Sakai *et al.* (1986)がサクラマスでそれぞれ発病率が減少した報告している。しかし、エリスロマイシン投与を行った養魚場においても、R. salmoninarum抗原陽性魚が見られる所もあり、エリスロマイシンの本病における防疫効果は、十分ではないようである。

Fryer and Sanders (1981)は、マスノスケを淡水環境から海水環境に移動させたときにBKDによって大量斃死を招くことを報告している。今回の調査において、海水養殖ギンザケで最も高いR. salmoninarumの出現率を示した。R. salmoninarumは海水中で水平感染はせず(Bruno, 1989)海水に魚を移したときのストレスによって発病が促進され则认为られているが、今回の調査結果では、淡水時にくらべてR. salmoninarum抗原陽性率が著しく高いことから水平感染の可能性も否定することができないと思われる。

ギンザケ以外の養殖魚においては、ヤマメおよびイwanaにBKDの病徴を示す魚がみられた。ヤマメにおいては、16カ所中7カ所からR. salmoninarum抗原陽性魚が見いだされたが、うち4カ所の魚から病徴が見られた。これらのR. salmoninarum陽性魚の見いだされた7つの養魚場のうち、6カ所ではその周囲や上流でギンザケ養殖が行われていた。このことからそれら6カ所のヤマメのBKDは、ギンザケが感染源となっていたと考えられる。R. salmoninarum抗原陽性のイwanaが検出されたのは、6カ所中1カ所のみであった。この1カ所は、同じ場所でヤマメも養殖しておりそのヤマメからもR. salmoninarum抗原が見いだされた。ニジマスについても1カ所でR. salmoninarum陽性魚が検出されたが、その養殖場は、ギンザケも同

表 3 3 その他のサケ科魚類におけるBKDの出現率

魚種	年度	養殖場数	サンプル数	病徴	陽性数と陽性率
ヤマメ	1985	1	35	6	22
	1986	3	67	0	14
	1987	10	126	3	7
	1988	2	13	1	7
	小計	16	241	10	52(24.5%)
イワナ	1986	2	38	0	0
	1987	4	39	1	4
	小計	6	77	1	4(5.1%)
ニシマス	1987	2	20	0	0
	1988	3	26	0	2
	小計	5	46	0	2(4.3%)
マスノスケ	1987	1	2	0	0
ヒメマス	1987	1	5	0	0

時に養殖しておりギンザケからの感染が考えられた。Mitchan *et al.* (1979)は、アメリカのワイオミング州のふか場で飼育されているカワマス、ブラウントラウトおよびニジマスが野生のカワマスが保菌魚となって *R. salmoninarum* に感染することを報告している。しかし今回調べたヤマメ、イワナ、ニジマスの *R. salmoninarum* 陽性魚は、いずれも養殖ギンザケからと考えられ、今のところ淡水において野生魚からこれらの魚種へのBKDの伝染の可能性はないようである。

岩手県沿岸で捕獲された73尾のサクラマスのうち、*R. salmoninarum* 抗原陽性魚が15%にも及んだ。近年、岩手県下でサクラマス資源の拡大のためにその稚魚の放流が盛んに行われている。これらのサクラマスの *R. salmoninarum* 感染の経路は詳かではないが、淡水養殖期にギンザケ稚魚から感染したか、あるいは海中で海水養殖ギンザケから感染したかのいずれかと考えられるであろう。次にシロサケであるが、放流前の稚魚には *R. salmoninarum* 感染魚は見れなかった。しかし海水ギンザケ養殖が行われている湾に潮上してきたシロサケではその 5.8 % が *R. salmoninarum* 抗原陽性であった。ギンザケ養殖が行われていない場所からの潮上シロサケにも *R. salmoninarum* 感染魚が見られたが、その割合は、比較的少なかった (0.8%)。Banner *et al.* (1986) は太平洋で採捕されたマスノスケ、シロサケ、ベニザケおよびスチールヘッドが、2.4%—11.0% の割合で *R. salmoninarum* 抗原を保持していたことを報告している。今回採捕したサクラマス、シロサケにおいても同じような割合で *R. salmoninarum* 抗原が検出された。これらの魚のBKDの感染経路は定かではないが、シロサケの場合淡水生活期がきわめて短く *R. salmoninarum* 感染魚と接触する可能性が少ないことから海中での感染の可能性が高いと推測される。

本研究において実施したギンザケ、シロサケ、ヤマメ、イワナ、ニジマス、アユおよびコイのBKDに対する感受性に関する実験は、それぞれの魚の成長段階に多少の違いがあるために (5g—20g)、単純には感受性の比較が出来ないが、 10^8 cells の *R. salmoninarum* を注射したコイは1尾の斃死も見られなかったことから

表34 自然界より採捕されたシロサケ、サクラマスの子体陽性率

魚種	年度	場所	サンプル数	病徴	陽性
サクラマス	1987	2	51	0	2
	1988	1	22	0	9
	小計		73	0	11(15.0%)
シロサケ	1988	1	20	0	4
	1989	3	212	0	4
	小計		232	0	8(3.4%)

感受性が殆どないと考えられる。ニジマスは、サケ科魚類において最も死亡率が低かった。このことは、わが国においてニジマスのBKDの発生がみられないこととも関係しているかもしれない。ヤマメ、イワナおよびギンザケは、ほとんど同じような死亡率を示した。これらの魚にはニジマスの場合と異なり R. salmoninarum 感染魚の存在が養魚場で確認されている。今回の実験ではシロサケが、最も高い死亡率を示し、さらにへい死にいたる時間も一番短かった。シロサケの R. salmoninarum に対する感受性について吉水ら（未発表）もサクラマスより著しく感受性が高いことを報告している。サケ科魚類の R. salmoninarum の感受性について Sanders et al. (1978) はベニザケが最も感受性が高く、つぎにギンザケそしてスチールヘッドが最も感受性が低いと報告している。本実験においてベニザケを用いることが出来なかったが、その他の魚種については Sanders et al. (1978) の結果と一致している。しかし、コイを除いてその他の魚の生存魚のほとんどから R. salmoninarum 抗原が検出された。従ってこれらの魚は保菌魚となる可能性が高いと思われる。

アユは、西日本において広く養殖されておりきわめて水産上重要な魚種であるが、R. salmoninarum に対し高い感受性を示した。これまでアユのBKDについては報告されていない。きわめて高い感受性がありながらアユにBKDの流行が認められない理由として、アユの生息水温がBKDの発生する水温度より高いこと、ギンザケと同じ場所で養殖されることが少ないなどが考えられる。しかし今後、ギンザケ養殖が拡大するにつれ、アユにもBKDの流行の可能性が考えられ十分に注意する必要があるだろう。

第3章 海水養殖ギンザケのBKD

前章において養殖ギンザケを中心としてBKDの疫学的調査を行い、BKDの感染率が淡水養殖期(17.2%)から海水馴致期(23.9%)、そして海水養殖期(33.6%)へと拡大する傾向を認めた。また天然のシロザケおよびサクラマスにもR. salmoninarum陽性魚の存在することを確認した。本病は淡水飼育されているサケ科魚類の間で水平感染することが知られているが、海水中においては十分に調べられていない。海水養殖ギンザケに発生したBKDの病理組織学的研究(早川ら、1989)や海水のサケ・マス類のBKD感染を調べた研究(Banner *et al.*, 1983)からR. salmoninarumBKDの水平感染が、海水でも起こりうることが示唆されているのみである。

そこで本章において海水中でのR. salmoninarumの水平感染が起こりうるかどうかを調べるために、まずR. salmoninarumの海水中での生存性を検討した。次に養殖場周囲に集まってくる海産魚を採捕してR. salmoninarum抗原の有無を調べた。最後に、実際に海中ギンザケ養殖場からR. salmoninarumが放出されているかを調べるために、ホタテガイ Patinospecten yessoensisを入れたカゴを海中ギンザケ養殖網生簀の周囲につるし、R. salmoninarumのホタテガイへの感染を調べた。

第1節 海水ギンザケ養殖場における *R. salmoninarum* の分布

材料および方法

1 海水中における *R. salmoninarum* の生存性

北里大学水産学部内の飼育水槽より採取した海水および淡水（河川水）を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のフィルターでろ過滅菌をした。これに *R. salmoninarum* KU8504株を加え、前述の方法で 10^8cells/ml の濃度に調製し、 15°C で保存した。保存後、1, 3, 5, 10, 15, 20, 30および40日目に各試水中における *R. salmoninarum* の生存性を調べた。菌液を滅菌PSにて 10^{-1} から 10^{-6} まで段階希釈し、それぞれ $5\mu\text{l}$ ずつSKDM寒天平板培地上に滴下した。 15°C で14日から18日間培養しコロニーを形成したものを生存性ありと判定した。

2 海水ギンザケ養殖場周囲の海産魚からの *R. salmoninarum* 抗原の検出

ギンザケ養魚場の網生簀の周囲に集まる魚を釣りによって採捕しBKDの病徴を調べ、さらに腎臓組織のスタンプ標本について抗 *R. salmoninarum* KU8504 ウサギ血清を用いて蛍光抗体法により *R. salmoninarum* 抗原を検査した。また腎臓の熱抽出試料を作製し、ドットブロット法（間接法）で *R. salmoninarum* 抗原の有無を調べた。

1986年に、3, 5, 7月の3回、B1ギンザケ養魚場の網生簀付近からチカ *Hypomesus pretiosus*（平均5g）61尾およびスケトウダラ *Tberagra charcogramma*（平均3g）10尾を採捕した。また、1989年は、6月にB6ギンザケ養魚場の網生簀付近からアイナメ *Hexagrammos otobii*（平均15g）12尾、ニジカジカ *Alcichthys alcicornis*（平均12g）11尾およびマガレイ *Limanda yokohamae*（平均40g）7尾を採捕した。1989年のサンプルは、前述した *R. salmoninarum* KU8504株のウサギポリクローナ

ル抗体に加えて R. salmoninarum のマウスモノクローナル抗体4D3 (Wins and Kaatari, 1989) を用いて蛍光抗体法とドットプロット法を行った。

サンプリングした魚はいずれもほぼ同時期にBKDの発生が見られた場所 (1986年のB1養魚場では5尾中5尾陽性、1989年のB6養魚場では39尾中9尾陽性) であった。

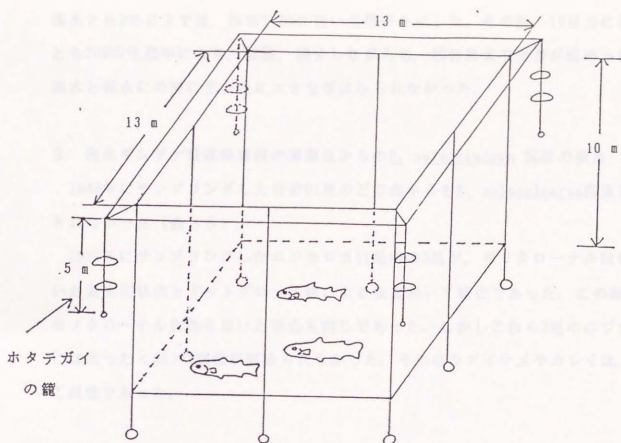
3 ホタテガイからの R. salmoninarum 抗原の検出

平均体重15gのホタテガイを直径約30cmの円垂形の籠の中に10-15個体入れ、図8のように海水ギンザケ養殖場の生簀の外側の海中に吊した。そして4, 10, 24, 31, 40, 52および63日後にそれぞれ8個体を取り上げた。次にホタテガイの中腸腺組織を無蛍光スライドガラスに塗抹し、前述のポリクローナルおよびモノクローナル抗体を用いて蛍光抗体法により R. salmoninarum 抗原を検査した。また中腸腺をホモジナイズし、熱処理 (100℃、20分間) した上、遠心分離 (3,000回転、20分間) した。その上清を用いて R. salmoninarum 抗原の存在をドットプロット法により調べた。この調査は、前述のB6ギンザケ養魚場で5月から7月にかけて行った。

コントロールとしてホタテガイ10個体を海水で 10^5 cells/ml の濃度に調製した R. salmoninarum 菌液に24時間浸漬し、その後流水で30日間飼育した。これらのサンプルの中腸腺について、前述の方法で蛍光抗体法とドットプロット法を用い R. salmoninarum 抗原を検査した。なお飼育水温は10-13℃であった。

結果

1 海水中における R. salmoninarum の生存



海面養殖ギンザケの生簀

図8 ホタテガイに対する *R. salmoninarum* の感染実験の模式図

海水および淡水中における R. salmoninarum の生存性を図 9 に示した。海水・淡水とも3日目までは、ほぼ100%に近い生残率を示した。その後、10日目には両区とも20%の生残率になり、以後、減少しながらも、40日目まで生存が認められた。海水と淡水との間に生存性に大きな差はみられなかった。

2 海水ギンザケ養殖場周囲の海産魚からの R. salmoninarum 抗原の検出

1986年にサンプリングした合計61尾のどの魚からも R. salmoninarum 抗原は検出されなかった(表35)。

1989年にサンプリングしたニジカジカ11尾中の3尾が、ポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法とドットブロット法による検査において陽性であった。この結果は、モノクローナル抗体を用いた場合も同じであった。しかしこれら3尾のニジカジカにはまったくBKDの病徴が認められなかった。そのほかアイナメやカレイは、すべて陰性であった。

3 ホタテガイからの R. salmoninarum 抗原の検出

BKDが発生している海水ギンザケ養殖生簀のギンザケからその生簀の中に吊したホタテガイへの R. salmoninarum の感染実験の結果を表35に示した。実験開始前のホタテガイからは、いずれの検査方法によっても R. salmoninarum 抗原は検出されなかった。しかし5日目に、ポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法によって2個体から R. salmoninarum 抗原が検出された。しかしその他の方法では検出されなかった。それ以降ポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法で陽性を示す個体が多く見い出された。そのうちモノクローナル抗体でも陽性を示したサンプルが16個体あった。ドットブロット法においては、13サンプルが陽性を示した。ドットブロット法で陽性を示した13サンプルのうち、モノクローナル抗体法でも陽性を示したものは、7個体であった。これらの結果を総合するとすべての方法で陽性を示したサンプルは52個体中7個体であった。10⁶ cells/mlの濃度の R. salmoni-

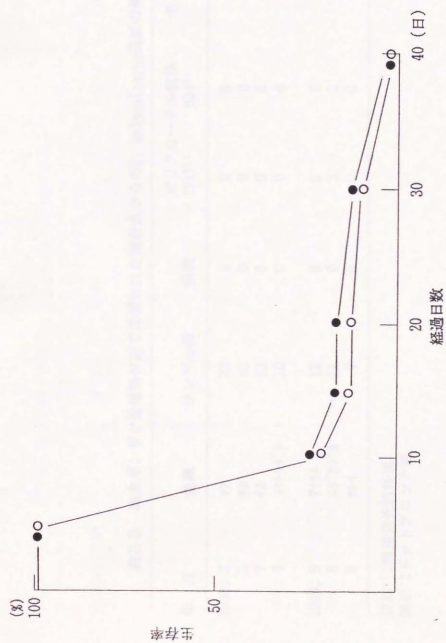


図9 *R. salmoninarum* の淡水および海水中での生存性
淡水 (○), 海水 (●)

表35 海水ギンザケ養殖場付近で採捕された海産魚からの*R. salmoninarum*抗原の検出

年、月	魚種	サンプル数	病徴	ポリクローナル抗体		モノクローナル抗体	
				IFAT ¹⁾	DBA ²⁾	IFAT ¹⁾	DBA ²⁾
1986, 3	チカ	33	0	0	0	-	-
5	チカ	15	0	0	0	-	-
7	チカ	13	0	0	0	-	-
7	スケトウダマ	10	0	0	0	-	-
1989, 6	アイナメ	12	0	0	0	0	0
6	ニシカシマ	11	0	3	3	3	3
6	カレイ	7	0	0	0	0	0

IFAT¹⁾: 間接蛍光抗体法DBA²⁾: ドットプロット法

表36 ホタテガイからのR. salmoninarum抗原の検出

実験後の日数	サンプル数	ポリクローナル抗体		モノクローナル抗体	
		IFAT ¹⁾	DBA ²⁾	IFAT ¹⁾	DBA ²⁾
4	8	2	0	2	0
10	8	7	2	4	1
24	8	3	2	2	0
31	8	4	3	3	1
40	8	3	2	2	2
52	6	4	2	1	1
63	6	3	2	2	2
コントロール	5	0	0	0	0

IFAT¹⁾:間接蛍光抗体法

DBA²⁾:ドットプロット法

narum 菌液に浸漬したホタテガイは、浸漬後30日目にすべての個体の中腸腺に蛍光抗体法でもドットブロット法でも *R. salmoninarum* 抗原の存在が認められた。コントロールとして菌液に浸漬せず同一条件で飼育したホタテガイ5個体からは、*R. salmoninarum* 抗原がまったく検出されなかった。

第2節 考察

*R. salmoninarum*の魚体外での動態については、ほとんど調べられていない。Austin and Rayment(1985)は、56カ所のBKDの発生している養魚場の底泥から*R. salmoninarum*の分離を試みたが成功しなかった。しかし彼らは、実験室において本菌が水槽内の沈澱物中に21日以上生存することを報告している。今回の実験で本菌は、海水中で少なくとも40日間生存することが分かった。これは、淡水における場合とほとんど同じ生存期間であった。同じ実験を行ったEvelyn(1988)は、本菌は海水中で12日間以上生存することを報告している。淡水環境において、Austin and Rayment(1985)は、 10^4 cells/mlの菌量の *R. salmoninarum*が28日間河川水中で生存したそのあと急速に死滅することを報告している。これらの結果は、*R. salmoninarum*が通常の水中の細菌相になることができないけれども、限られた期間魚体外で生存する能力があることを示している。Austin and Rayment(1985)は、さらに水中で*R. salmoninarum*が長期間生存するためには、水中の有機体と結合して存在する可能性を示している。BKDの発生と水質との関連については十分に解明されていない。Warren(1963)は、経験的に Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cl^- 、 SiO_2^- そして SO_4^{2-} の水中濃度の低い池で発生が多いことを報告している。しかしFryer and Sanders(1981)は、これらのイオンの濃度とBKDの発生は関係なく、海水中でも本病の発生が多いことを指摘している。今回の実験結果から考察すると、海水中に多く含まれるこれらのイオンは、本菌の生存に影響してないと思われる。

養殖場付近の海産魚がBKDの保菌魚となるかどうかを調べた結果、ニジカジカのサンプルの一部に*R. salmoninarum*抗原が検出された。ニジカジカに対する感染実験を実施することはできなかったが、少なくとも保菌魚となりうることは示された。ニジカジカへの感染経路は不明であるが、本種がギンザケのエサであるモイストペレットを食べるために集まってきていることから、BKDで斃死したギンザケ

を食べたか、あるいは海水中に放出された R. salmoninarum が魚体の損傷部、口、または鰓から侵入したと考えられる。さらに R. salmoninarum 感染魚の糞から本菌が分離される (Bullock et al., 1980, Austin and Rayment, 1985) ことからこれら感染魚の糞を摂取した可能性もある。Evelyn(1988)は、グラム染色と培養法で R. salmoninarum に感染していないと考えられたベニザケを、以前BKD感染魚を飼育していたことのある生簀で、数カ月間海水中で飼育したところ、BKDの発生が見られたことを報告している。Evelyn(1988)の結果および今回ニジガジカより R. salmoninarum 抗原が検出されたことから、海水中でのBKDの水平感染が起こり得る可能性が十分にあると考えられる。従って、前章で述べたBKD感染率の海水における増大について、保菌ギンザケ体内の検出限界以下の R. salmoninarum が海水移行のストレスによって増菌した場合と、海水中での水平感染による場合があると考えられる。

今回、BKDが多発している海面ギンザケ養殖生簀の周囲にホタテガイを吊して、水中に放出された R. salmoninarum がホタテガイに取り込まれるかを蛍光抗体法とドットブロット法で調べた。その結果、蛍光抗体法で検出される R. salmoninarum 抗原を持つ細菌が多数のホタテガイの中腸腺に多数検出された。しかし R. salmoninarum と共通抗原をもつ細菌が Austin et al.(1985)や吉水ら(1987)により報告されており、ホタテガイに検出された細菌が R. salmoninarum との共通抗原を持つ他の細菌である可能性も考えられる。事実これらのサンプルを熱抽出してドットブロット法で検査した場合には陽性サンプル数が13個体に減少した。さらに、Wins and Kattari(1989)が作製した R. salmoninarum の菌体表面上の57kdのタンパク質を認識するモノクローナル抗体によって抗原の検出を試みたところ、これら13個の陽性のサンプルのうち7サンプルのみが陽性であった。従って、今回調べた52個体のうち少なくともこれら7個体が R. salmoninarum に感染していたと思われるが、分離培養を行っていないので他の細菌である可能性を完全に否定することは出来ない。現在の培養法で、このようなサンプルから R. salmonina-

runを分離する技術は開発されていないので、今回免疫学的手法を用いたが本実験の結果をさらに確認するためには、より優れた培養法の確立が望まれる。

注射によって人為的にR. salmoninarumを取り込ませたホタテガイから30日後にもR. salmoninarum 抗原が検出されたことから、1度取り込まれたR. salmoninarumは、非常に排出されにくいことが分かった。このことは、海水中において、貝がR. salmoninarumを取り込むと長期間にわたりそれを保持し、その結果長期間その環境中にR. salmoninarumが存在する可能性を示唆している。

本章において述べた調査によってBKDに感染したギンザケを飼育している海面養殖場は、周囲の海にR. salmoninarumを放出し、他の魚貝類への感染源になっていることが明かとなった。特にホタテガイが、きわめて長時間R. salmoninarumを保持しうることから貝類が魚（サケ科）への二次的感染源となることも考えられる。いずれにしても海水ギンザケ養殖場におけるBKDの多発は、同じ湾内で行われているシロサケの放流事業に影響を与える恐れがあると思われる。

第4章 シロサケおよびギンザケの血中の *R. salmoninarum* 抗体

感染症の診断を行う上で最も確実な方法は病原体を検出することであるが、前章までこのことについて述べた。その他に病原体が侵入してきた形跡を調べることも広く行なわれている。この目的のために現在広く用いられている方法は、病原体に対する血清中の抗体を測定することである。もし血清中にその病原体に対する抗体が存在すれば、少なくとも1度はその病原体に侵された証明となる。病原体が細菌の場合、菌体と血清とを混ぜ合わせて凝集反応を調べる（ウイダル反応）が古典的な方法として知られている。しかし最近では、感度の高い方法として酵素抗体法が種々の感染症の診断に利用されるようになった。魚病の分野においても、せつそう病 (Kodama *et al.*, 1985)、ビブリオ病 (Thuvander *et al.*, 1987, Hamilton *et al.*, 1987) およびレッドマウス病 (Cossarini-Dunier, 1985) の診断に用いられて、いずれも凝集反応よりも高い感度を示すことが報告されている。本研究においては、シロサケおよびギンザケの *R. salmoninarum* に対する血中抗体を検出するために、凝集反応とELISA法の比較を行った。そしてそれらの方法を用いて溯上シロサケおよび出荷前の養殖ギンザケの *R. salmoninarum* の血中抗体価を調べ、*R. salmoninarum* の感染率を推定した。

第1節 血中抗体の検出方法の検討

材料と方法

1 シロサケおよびギンザケのIgMの分離

潮上時のシロサケ (3-4Kg) 10尾の尾部血管より採血した。4℃、12時間静置し凝固させ、そのまま2000回転で20分間遠心して血清を分離した。10尾分をプールしてIgMの分画に用いた。ギンザケ (2-3Kg) については、出荷前の魚15尾を用いシロサケの場合と同様に血清を集めた。

それぞれの血清に、0.02% EDTAを加えて3倍に希釈し、これを透析膜に入れ、低温室 (4℃) 内で0.02% EDTAに対して4日間透析しその後凍結乾燥した。次に20mMのTris-HCl (pH8.0) 0.5M NaClの緩衝液で溶かし、Sephacryl S-300を用いてゲル濾過した。各分画の吸光度を波長280nmで測定し、最初のピークをIgM分画とした。

2 シロサケおよびギンザケのIgMに対するウサギ抗血清の作製

シロサケおよびギンザケのIgM分画を0.1D_{280nm}にて吸光度1.0に合わせ、これに等量のフロイント完全アジュバント (FCA) を混合し、第1章に記述した方法でウサギを免疫した。

3 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識法

ギンザケもしくはシロサケのIgMに対するウサギ抗血清に、50%飽和硫酸アンモニウムを同量加えてγ-グロブリンを分画した。このγ-グロブリン分画を0.01MのPBS (pH7.8) の中に溶解し、PBS (pH7.8) 中で48時間、4℃で透析した。γ-グロブリンと西洋ワサビペルオキシダーゼとの結合は、第1章で述べた方法によった。それぞれの標識抗体を10 ng/mlの濃度に調製したのち、使用するまで-80℃で保存し

た。

4 ELISA法

96穴ELISA用のマイクロプレート（コーニング社）にマクファアランド No 3の濃度に調製した R. salmoninarum KU8504株熱抽出抗原を50 μ l入れ、4℃で一晩静置した。その後、プレートに付着していない熱抽出抗原を捨て、さら洗浄のため0.5% Tween80-PBSを300 μ l入れ5分間マイクロミキサーで攪拌し、これを3回繰り返した。次にブロック溶液（1%牛血清アルブミン(BSA)-PBS）を300 μ l入れ、室温で30分間インキュベートした。その後、ブロック溶液を捨て、0.5% Tween80-PBSで5分間3回洗浄した。次に、シロサケもしくはギンザケの血清を50 μ l入れ4℃で16時間反応させ、血清を捨てた後0.5% Tween 80-PBSで同じように3回洗浄した。これに西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗シロサケもしくはギンザケIgM-ウサギγ-グロブリンを50 μ l入れ4℃で16時間反応させた。そして3回同じように洗浄した。0.1Mクエン酸-0.2Mリン酸緩衝液（pH5.0）50 μ lに0-フェニレンジアミン20mgを溶かし、さらに5% H_2O_2 を33ml加えたものを発色液として用意し、マイクロプレートの各穴にそれぞれ200 μ l入れ、遮光し室温で30分反応させた。その後6N H_2SO_4 を50 μ lずつ加えて反応を停止させた。ELISAリーダー（パイオーラッド社）を用いて450nmで吸光度を測定した。

5 マイクロタイター法による凝集抗体価の測定

96穴のV字型マイクロプレートにシロサケまたはギンザケの血清を50 μ lずつ入れ、PBSにて2倍希釈で2048倍まで系列希釈した。マクファアランドNo3の濃度に合わせた R. salmoninarum ホルマリン死菌浮遊液を各希釈血清に25 μ l加え、5分間振とうした後、20℃で2時間インキュベートし、4℃で12時間静置した後、凝集抗体価を測定した。

6 ELISA法とマイクロタイター法の感度の比較

平均体重100gのギンザケ7尾に、マクフアーランドNo 5の濃度に合わせた R. salmoninarum KU8504株のホルマリン死菌とフロイント完全ジュバントの混合物0.1mlを腹腔内に注射し、50日間水温15℃で飼育した。その後、尾部血管より採血し血清を分離し、これらの血清のR. salmoninarumに対する凝集抗体価を測定した。さらにPBSで4, 32, 128, 256および512倍に希釈し、ELISA法に供した。これとは別に潮上シロサケをサンプリングし、その血清のR. salmoninarumに対する凝集抗体価をマイクロタイター法で測定した。そのうち2から8の凝集抗体価を示した血清について、ギンザケの血清と同じように希釈し、ELISA法を試みた。

7 ELISA法とマイクロタイター法の特異性

A. salmonicida ATCC14174, V. anguillarum PT24, E. tarda AJC8101, Streptococcus sp.SG8004, P.fluorescens KPF8401, E.coli K12,およびR. salmoninarum を用いてELISA法とマイクロタイター法の特異性を比較検討した。

ELISA法においては、これらの細菌の熱抽出抗原を作製し、マイクロプレートに付着させた後、抗-R. salmoninarumギンザケ血清(抗体価 32倍)を反応させた。

マイクロタイター法においては、これらの菌を0.3%のホルマリンで不活化した。PBSで菌体を3回洗浄した後マクフアーランドNo3の濃度に合わせ、抗-R. salmoninarumギンザケ血清(抗体価 32倍)の2倍希釈系列と混合して凝集反応を観察した。

結果

1 ELISA法とマイクロタイター法の感度の比較

アジュバントワクチンを注射したギンザケの *R. salmoninarum* に対する凝集抗体価は、2から32であった。これらの血清をさらに2倍系列希釈してELISA法により抗原抗体反応を測定した。これらの反応後のO.D.は、いずれも凝集抗体価の希釈度よりさらに5倍から10倍に希釈したときほぼ一定の値（O.D.1.20付近）となった（図10-1）。従ってELISA法の感度は、マイクロタイター法による定量凝集反応の5倍から10倍であると考えられた。*R. salmoninarum*に対する2から8の凝集抗体価を持つシロザケ血清を用いたELISA法を行った場合も凝集抗体価の希釈度よりさらに5倍から10倍に希釈したときにほぼ一定の吸光度を示した（図10-2）。

2 ELISA法とマイクロタイター法の特異性

マイクロタイター法においては、供試したすべての *R. salmoninarum* 株が、8-32の凝集素価を示したのに対して、その他の細菌は2以下であった（表37）。ELISA法においては、*R. salmoninarum*の各菌株がO.D. 0.134から0.143の高い値を示したのに対してその他の菌のO.D.は低く、最高でも0.111であった（表38）。

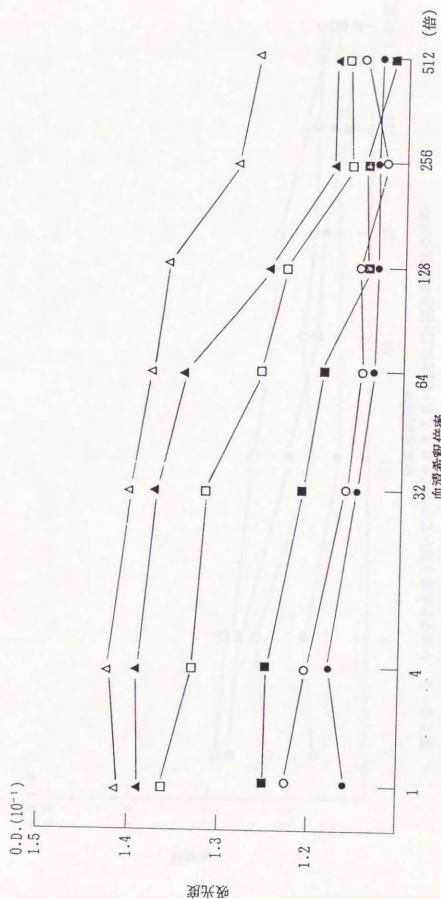


図10-1 ギンザケ血清を用いてのマイクロタイター法とELISA法との感度の比較
 <2(●), 2(○), 4(■), 8(□), 16(▲), 32(Δ).

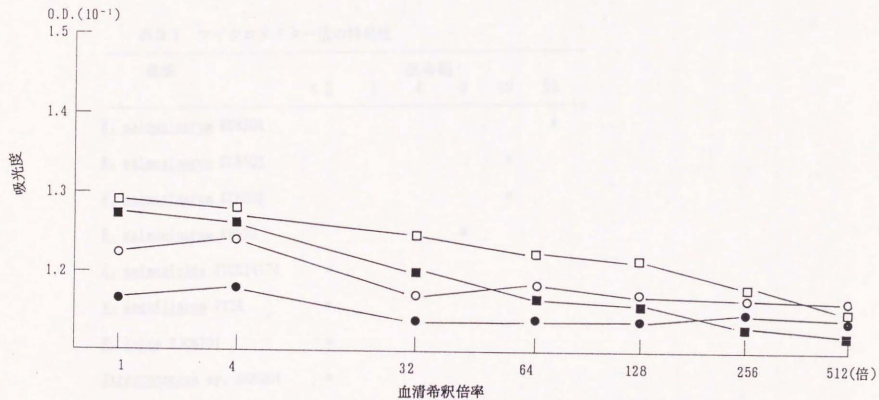


図10-2 シロザケ血清を用いてのマイクロタイター法とELISA法との感度の比較
 2(●), 2(○), 4(■), 8(□).

表37 マイクロタイター法の特異性

菌株	抗体価					
	< 2	2	4	8	16	32
<u>R. salmoninarum</u> KU8504						*
<u>R. salmoninarum</u> KU8502					*	
<u>R. salmoninarum</u> KU8503					*	
<u>R. salmoninarum</u> RB173				*		
<u>A. salmonicida</u> ATCC14174	*					
<u>V. anguillarum</u> PT24	*					
<u>E. tarda</u> AJC8101	*					
<u>Streptococcus</u> sp. SG8004	*					
<u>P. fluorescens</u> KPF8401	*					
<u>E. coli</u> K12	*					

表 3 8 ELISA法の特異性

菌株	O.D.
<u>R. salmoninarum</u> KU8504	0.143
<u>R. salmoninarum</u> KU8502	0.140
<u>R. salmoninarum</u> KU8503	0.139
<u>R. salmoninarum</u> RB173	0.134
<u>A. salmonicida</u> ATCC1474	0.096
<u>V. anguillarum</u> PT24	0.102
<u>E. tarda</u> AJC8004	0.087
<u>Streptococcus</u> sp. SG8004	0.111
<u>P. fluorescens</u> KPF8401	0.106
<u>E. coli</u> K12	0.098

第2節 養殖ギンザケおよび潮上シロサケの血中の

R. salmoninarum抗体の調査

材料と方法

1 養殖ギンザケ

出荷のための取り上げが行われた時にサンプリングした。尾部血管から採血し、前述の方法で血清を分離した。サンプリングは、1986年から1989年まで毎年7月に行い、88-300尾から血清を採集した。ただし、ELISA法による検査は、1987年から1989年のサンプルに対して行った。

2 潮上シロザケ

ギンザケ養殖が行われている湾内に潮上してきたシロザケについて検査した。1986年から1989年にかけて毎年11月にサンプリングを行い、104-200尾の魚から血清を採集した。

3 R. salmoninarumに対する血中抗体の検出法

ギンザケおよびシロサケの、尾部より採血し、常法に従い血清を分離し、R. salmoninarumに対する血中抗体を、マイクロタイター法を用いて検出した。抗原としてR. salmoninarum KU8504株のホルマリン死菌浮遊液を用いた。

結果

1 ギンザケ

養殖ギンザケにおけるマイクロタイター法による血中抗体価検査の結果を表 39 に示した。1986年においては、48.2%の魚の血清が抗体反応陽性を示した。そのうちタイター 4の魚が最も多かったが、タイター 16の魚もみられた。1987年においては18.2%、1988年においては23.7%、1989年においては29.6%の魚が陽性であった。これらの結果をまとめるとギンザケ829尾中256尾(31.1%)の魚から抗体が検出された。

2 シロサケ

シロサケは、ギンザケにくらべて血中抗体陽性率が低く、1986年においては、104尾中9尾、1987年においては189尾中14尾、1988年においては168尾中18尾、1989年においては227尾中33尾であった(表39)。これらの結果を合わせると計706尾のシロサケの中で70尾(9.9%)が陽性であった。

3 抗体反応陽性魚と抗原反応陽性魚の比較

第2章において1989年度のシロサケサンプル100尾を用いて *R. salmoninarum* 抗原陽性をドットプロット法で調べたが、これら同一サンプルからの *R. salmoninarum* 抗体陽性をマイクロタイター法で調べることが可能であったのでそれらの関係を表 40 に示した。ドットプロット法陽性のサンプルは3検体で、これらはいずれもマイクロタイター法において抗体価の上昇が見られた。

表39 マイクロタイター法による*R. salmoninarum*抗体の検出

魚種	年度	サンプル数	抗体価						陽性数(%)
			<2	2	4	8	16	32	
ギンザケ	1986	197	102	30	53	11	1	0	95(48.2)
	1987	88	72	3	10	3	0	0	16(18.1)
	1988	244	186	5	33	20	0	0	58(23.7)
	1989	300	211	21	21	27	14	6	89(29.6)
	合計	829	571	59	117	61	15	6	258(31.1)
ソコ	1986	104	63	4	4	1	0	0	5(4.8)
	1987	189	175	0	3	10	1	0	14(7.4)
	1988	186	168	3	9	4	2	0	18(9.6)
	1989	227	195	16	6	0	0	0	33(14.5)
	合計	706	601	23	22	15	3	0	70(9.9)

表40 遡上シロサケ100尾中におけるR. salmoninarum抗体陽性魚と抗原陽性魚の関係

	陽性数		
	全サンプル数	トフトフト法	マイクロタイター法
供試尾数	100	3	13
トフトフト 陽性サンプル	3	3	3
マイクロタイター 陽性サンプル	13	3	13

*: R. salmoninarum抗体陽性魚はマイクロタイター法で、抗原陽性は、トフトフト法により確かめた。

第3節 考察

マイクロタイター法は、病原細菌に感染した動物の抗体を定量的に検出する方法として広く用いられてきた。本実験においても、ギンザケおよびシロザケの *R. salmoninarum* 感染を調べるために本法を用いた。多くの *R. salmoninarum* 菌株は、菌体自身が生理食塩水中で自己凝集を起こすことが知られている (Daly and Stevenson, 1987, Bruno, 1988)。今回マイクロタイター法で用いた菌株はほとんど自己凝集が見られなかったが、抗原抗体反応による凝集と菌体自身の自己凝集の区別をより分かりやすくするためにV字型のマイクロプレートを用いた。

最近このマイクロタイター法よりもさらに感度が高いとされるELISA法が開発され多くの研究に用いられている。本研究においてさらに *R. salmoninarum* の血清中の抗体を検出する方法としてELISA法の検討を行った。ELISA法の場合、一般にどこまでを陽性とするかの判断が非常にむづかしい。Kodama *et al.* (1985) は、ニジマス血清中の *A. salmonicida* 抗体をELISA法を用いて検討した。この研究において彼らは、マイクロタイター法で抗体価の見られた血清を、さまざまな濃度に希釈し、これをサンプルとしてELISA法を行い、その吸光度の値がほぼ一定になったO.D.をベースラインとした。今回のELISA法においてもKodama *et al.* (1985)の方法に準じた。ギンザケの場合は、ギンザケに *R. salmoninarum* 死菌を接種し、マイクロタイター法でさまざまな抗体価を示した血清を用いてベースラインを決定した。シロサケの場合は、抗原を接種し、その後採血して血清を分離できるほどの大きさの魚が入手できなかったため、マイクロタイター法で2、4、8、16倍の抗体価を示した血清をさまざまな濃度に希釈し、これらの希釈血清によってベースラインを決定した。その結果、ELISA法は、マイクロタイター法の5-10倍の感度を持つことが明かとなった。同じ様な結果として、Kodama *et al.* (1985) は、ビブリオ病細菌 (*Vibrio anguillarum*) に対する血中抗体の検出においてELISA法が、

マイクロタイター法の約5-40倍の感度を示すことを報告している。従って、ギンザケおよびシロザケの血清中のR. salmoninarum抗体の検出法として、ELISA法は、マイクロタイター法より優れた感度を持つことが示された。しかし本研究においてELISA法の陽性のO.D.値がKodama *et al.* (1985)に比べて極端に低いために抗体価の調査には用いなかった。

今回、サンプリングしたギンザケは、すべて商品として出荷されたために、十分なBKDの病徴を確認することができず、さらにこれらについては抗原保有率を調査することができなかった。BKDの発病と抗体価との関係調べることができなかった。しかし出荷されたものと同一群の斃死魚(B養魚場群)のR. salmoninarum抗原保有率は、1986年度から1989年度までの平均で30.0%であり、これらの中には明確な病徴の確認された個体も存在した。Bruno(1987)は、ニジマスと大西洋ザケにおけるR. salmoninarum抗体の保有状況をマイクロタイター法で調べている。その結果、BKDの病徴を示すニジマスほど高い抗体価を示したが、BKDの感染の前歴のない場所からサンプリングした魚も低いながら抗体価を持っていた。一方、太平洋ザケにおいては、BKD感染の前歴と抗体価との間に相関が認められなかった。これについてBruno(1987)は、自然界にはAustin *et al.* (1985)や吉水ら(1987)によって報告されているような共通抗原を持つ菌が存在し、それらの菌に太平洋ザケが感染した結果であろうと考察している。今回マイクロタイター法とELISA法を用いてさまざまな魚病細菌との交差性を検討したが、いずれも交差性は見られなかった。しかし野外で飼育されている魚の場合には、Bruno(1987)によって指摘されるような共通抗原を持つ菌に感染している可能性もあり、それによってR. salmoninarumに感染していないにもかかわらず、陽性抗体が検出される危険性がある。しかし、今回サンプリングしたギンザケは、いずれもBKDの発生が見られた養魚場の魚であり、Bruno(1987)の結果と比べると、BKD感染と抗体の保有状況とがきわめてよく一致しており、これらの群においてはマイクロタイター法での偽陽性反応の可能性は少ないと思われる。

シロサケにおいては、ギンザケの場合に比べて *R. salmoninarum* 抗体の保有率が低く9.9%であった。さらに抗体価もギンザケの場合より低くマイクロタイター法で16倍以上の抗体価を示した個体は、708尾中わずかに3尾であった。これは、ギンザケが病気に感染しやすい状態で集約的に養殖されているのに対して、シロサケは、自然の状況におかれているためにBKDがこの群で蔓延しなかったためであろうと思われる。

シロサケの場合、1989年度に一部サンプルの腎臓を採取し *R. salmoninarum* 抗原保有率を調査した。抗原保有率は、抗体保有率に比べて低かったけれども抗原を保有している個体は、抗体も保有していることが確認できた。そしてこれらの *R. salmoninarum* 抗原を保有している魚はいずれもBKDの病徴が見られず保菌魚であった。これらの在来のシロサケがどのようにしてBKDに感染したかについて十分な証拠は得られていないものの、ギンザケ養殖生簀の周囲に群がっている魚から *R. salmoninarum* 抗原が検出されたという事実より、放流以後に湾内でギンザケと接触し、一部の魚が感染したものと考えることができる。また、在来のシロサケがすでに *R. salmoninarum* に感染しており、さらに1986年から1989年にかけて感染が拡大している傾向が認められ、なんらかの対策を施さなければ将来シロサケ資源に大きな影響を及ぼす可能性がある。

第5章 BKDワクチンの試み

前章までに、わが国におけるサケ科魚類の *R. almoninarum* 感染の実態について検討してきた。現在、BKDは薬剤による治療がほとんど期待できず、感染魚を養魚場に入れないことが最も良いBKD対策である。しかし、一旦BKDが発生してしまうとその場所から本病を除くことはきわめて難しいことは、第2章で示した通りである。

BKDのワクチンに関する研究は、Paterson *et al.* (1980) および McCarthy *et al.* (1984) によってすでに行われている。Paterson *et al.* (1980) は、フロイント完全アジュバントを混合したホルマリン死菌を大西洋サケに注射して抗体価の上昇を確認している。そして、その後の *R. almoninarum* の自然感染においてワクチン区にBKDの病徴を示す魚が少なかったと報告している。しかし、抗体価の上昇が遅いことやワクチン区において *R. almoninarum* 感染率がコントロール区と比べてほとんど差がなかったという問題点も指摘している。McCarthy *et al.* (1989) は、*R. almoninarum* 菌体をpH9.6で溶解させたバクテリン（菌体溶解ワクチン）が、BKDに対するきわめて高い防御能をニジマスに与えることを報告している。しかし、彼らはワクチン魚の抗体価を測定しておらず、さらに生存魚からの *R. salmoninarum* 抗原の検出も感度の低い腎臓塗末のグラム染色でのみ行っただけであり生存魚が保菌魚になるかどうかの検査を充分に行っていない。このように過去のBKDワクチンに関する研究には、問題点が多く、さらに十分に検討を加える必要がある。そこで本研究においては、さまざまな抗原処理をしたワクチンに対する免疫応答について、液性免疫および細胞性免疫の両方の観点から検討を加えた。またその中で比較的すぐれた効果を示したワクチンで免疫した魚群に対し、人為的に感染実験を行って、防御能の有無を調べた。

第1節 各種ワクチン投与魚の免疫応答

材料および方法

1 供試魚

岩手県内水面水産指導所より分与された平均体重50gのニジマスを用いた。これらの魚は、いずれも蛍光抗体法およびドットブロット法でBKDの病歴のないことを確認した後、北里大学内の水槽に収容し15℃で飼育した。

2 ワクチンの調製法

R. salmoninarum KU8504 株をKDM-2培地にて15℃で12-17日間培養し、これをもとに7種のワクチンを作製した。

○ ホルマリン死菌洗浄菌体ワクチン (ホルマリン死菌ワクチンA)

菌液の濃度を波長 540nmの吸光度で0.D. 1.0 になるように生理食塩水を加えて調製した後、0.3%になるようにホルマリンを加えて不活化し、そして、4℃で12時間静置したのち4,000回転で20分間遠心分離して菌体を沈澱させ、上清を捨て、ふたたび生理食塩水を加えて懸濁させた。この操作を3回繰り返して最終的に濃度を0.D.で1.0 に合わせた。

○ ホルマリン死菌非洗浄ワクチン (ホルマリン死菌ワクチンB)

菌液に生理食塩水を加えて濃度を0.D.で1.0に合わせ、これをミキサーにて十分に攪拌した。そして、4,000回転で菌体を沈澱させ、その上清を採取し保存した。また、菌体は0.3%ホルマリン生理食塩水に再懸濁させ、4℃で12時間静置して不活化し、その後3回菌体を生理食塩水で洗浄した。さきほどの上清に洗浄した菌体を、

加えよく懸濁させ、これをワクチンとした。

○ アジュバント混合ホルマリン死菌ワクチン

ホルマリン死菌ワクチンAを4,000回転で沈澱させ、これに最初の半分の量の生理食塩水を加え元のワクチンの2倍量とし、これにフロイント完全アジュバント（ディフコ社）を等量加えてよく混合し、アジュバント混合ワクチンとした。

○ 熱死菌ワクチン

菌液を0.D.で1.0の濃度に生理食塩水で調製した後、水槽中で100℃30分間熱処理を行した。これを熱死菌ワクチンとした。

○ 紫外線殺菌ワクチン

菌のコロニーがKDM-2培地上に出現してから3日目（培養開始から15-17日目）に、シャーレのふたをあげ、紫外線ランプの下50cmの位置で2時間照射した。その後、菌濃度を0.D.で1.0になるように生理食塩水で調製し、これを紫外線殺菌ワクチンとした。

○ 菌体溶解ワクチン

菌液に前述の方法でホルマリンを加えて不活化した。そして菌体を生理食塩水にて洗浄した後、菌濃度を0.D.で1.0になるように生理食塩水で調製し、これに10NのNaOHを加えてpHを9.5に合わせた。1時間室温で静置した後、10NのHClを用いてpH 7.2に合わせた。これを菌体溶解ワクチンとした。

○ 連鎖球菌ホルマリン死菌混合ワクチン

β-溶血性の *Streptococcus* sp. SG8004株をBHI培地（ニッスイ）にて30℃、48時間培養した。4,000回転で菌体を3回遠心洗浄し、菌液を波長 540nmの吸光度で

0.D.で1.0 になるように生理食塩水で合わせた後、これに0.3%になるようにホルマリンを加え、3回遠心洗浄して最終的に濃度を0.D.で1.0に生理食塩水にて合わせた。これに同量のR. salmoninarum ホルマリン死菌ワクチンAを加え、混合ワクチンとした。

3 ワクチンの投与

ニジマスはMS-222で麻酔し、それぞれのワクチンを0.1mlずつ腹腔内に注射した。アジュバント混合ホルマリン死菌ワクチン区のコントロールとしてフロイント完全アジュバントのみの注射区を設け、その他のワクチン区のコントロールとして生理食塩水注射区をもうけた。各区30尾ずつとし、35日後に血中凝集抗体価、白血球の貪食能および化学発光の測定に用いた。

4 血中凝集抗体の測定

ワクチン投与後、35日目に各区より10尾取り上げ、麻酔後、尾部血管より採血し、前述の方法で血清を分離した。そして、血中凝集抗体価をマイクロタイター法で測定した。

5 白血球の貪食能

ニジマスから前述の方法で採血した後、腎臓(約0.5g)を摘出した。ヘパリン250 unitを含むRPMI1640培地(pH7.2) (ニッスイ)の中で腎臓組織をピンセットでほぐすことにより細胞を遊離させた。ガーゼで濾過して細胞浮遊液から、大きな組織片を取り除いた。この腎臓の細胞を1200回転で10分間遠心分離し、RPMI 1640培地に再浮遊した。この操作を繰り返すことによって洗浄した。細胞液の一部を採りトリパンブルー染色にて生細胞数を測定し、最終的に 1×10^7 cells/mlの濃度に合わせた。この細胞懸濁液にそれぞれのワクチン投与魚の血清を5%になるように加え、カバーガラス上に2mlずつ滴下した。20℃で2時間静置後、カバーグ

ラスに付着していない細胞を取り除くために、カバーグラスをRPMI1640培地で軽く洗浄した。次に 1×10^7 cells/ml の *R. salmoninarum* KU8504 ホルマリン死菌を含むRPMI1640 培地（それぞれのワクチン投与魚の血清10%を含む）をカバーグラス上に2ml滴下し、再び20℃で2時間静置した。カバーグラスをRPMI1640培地にて軽く洗浄した後、メタノールで固定し、ギムザ染色を行った。微分干渉顕微鏡（オリンパス社）にて *R. salmoninarum* を貪食している白血球を観察、計数し、次の式に用いて貪食率を求めた。

$$\text{貪食率(\%)} = \frac{\text{貪食している白血球}}{\text{全白血球 (300細胞)}} \times 100$$

本実験は、各区4尾づつを用いて行った。

6 白血球の化学発光

○ 白血球浮遊液の調製

前述の方法で腎臓の細胞を分離し、フェノールレッドを含まないRPMI1640 (pH7.2) で 1×10^6 cells/ml の濃度の細胞浮遊液を調製し、これを白血球とみなした。

○ 刺激物の調製

マクファアーランドNo5の濃度に合わせた *R. salmoninarum* KU8504 のホルマリン死菌液3mlを遠心分離し、上清を捨て、代わりにそれぞれのワクチン投与魚の血清を1ml加え、よく混合した。そして20℃で2時間静置することによって *R. salmoninarum* 菌体をオプソナイズした。その後、遠心分離して血清を取り除き、代わりにRPMI1640を加え再びマクファアーランドNo5の濃度に合わせた。

○ ルミノールの調製

ルミノール（片山化学）100mgを50mlの水に入れ、さらにトリチルアミン50μlを加え、50℃の温浴中で超音波処理を行い溶解させた。

○ 化学発光の測定

白血球の化学発光の測定はワリック社のルミノメーターを用いた。0.3mlの白血球溶液に0.1mlのルミノール溶液を加え、これをルミノメーター内のセルの中に入れ、バックグラウンドが一定になってから0.1mlのオプソニン化したR. salmoninarumを加えた。測定は20℃で30分間行い、10秒ごとに光の強度をmVで示した。予備実験において同じ群内の個体のばらつきが大きかったので3尾分の細胞をブールして測定した。各ワクチン区とも9尾ずつ取り上げ、測定に供した。

結果

1 ワクチン投与魚の血中凝集抗体価

各ワクチン魚の血中凝集抗体価を表4-1に示した。各ワクチン投与魚とも、抗体価は低く、アジュバント混合ワクチン区の16が最高であった。次に比較的抗体価の高かったのは、紫外線殺菌ワクチン区と菌体溶解ワクチン区であった。しかし、すべてのワクチン区において血中に凝集抗体の認められない魚が数尾ずつ存在した。

2 ワクチン投与魚の白血球の貪食能

白血球がR. salmoninarum菌体を最も多く貪食した区は、アジュバント混合ワクチン区で58.4%であった。次に貪食率が高かったのは、菌体溶解殺菌ワクチン区で27.9%であった。ホルマリン死菌ワクチン区においては、菌体を洗浄することによる貪食能の差は見られなかった。連鎖球菌混合ワクチン区においてはホルマ

表4 1 各種BKDワクチンを投与したニジマスにおける血中凝集抗体価

ワクチン	凝集抗体価							
	<2	2	4	8	16	32	64	128
ホルマリン死菌A	2	4	1	1	2			
ホルマリン死菌B	2	2	3	3				
アジュバント混合	1	0	1	3	2	3		
熱死菌	4	3	3					
紫外線殺菌	2	2	5	1				
菌体溶解	1	2	5	2				
連鎖球菌混合	2	4	4					
対照 (PS)	10							
対照 (アジュバント)	10							

リン死菌ワクチン区より貪食能が低く、連鎖球菌の混合による増強効果は認められなかった（表4 2）。

3 ワクチン投与魚の腎臓細胞の *R. salmoninarum* に対する化学発光

ワクチン投与魚の腎臓細胞の *R. salmoninarum* に対する化学発光を図1 1から図1 2に示した。最も高いレベルを示したのは、アジュバント混合ワクチン区で最高 90 mV のレベルまで達した（図1 1）。次に高いレベルを示したのは、菌体溶解殺菌ワクチン区で、最高 45 mV のレベルを示した。そのほかのワクチン区においては、コントロール（PSのみ）より少し高いレベルを示しただけであった（図1 2）。なお、図1 2はそれぞれ3回の実験の平均値を示した。

表4 2 各種BKDワクチンを投与されたニジマスの白血球の貪食能

ワクチン	(%) 貪食能	有意差
ホルマリン死菌A	16.1 ± 3.1	P< 0.005
ホルマリン死菌B	15.2 ± 2.1	P< 0.005
アジュバント混合	58.4 ± 3.3	P< 0.005
熱死菌	11.2 ± 2.2	P< 0.05
菌体溶解	27.9 ± 3.0	P< 0.005
紫外線殺菌	13.4 ± 1.1	P< 0.01
連鎖球菌混合	10.2 ± 3.1	N.S.
対照 (PS)	9.2 ± 1.9	
対照 (アジュバント)	11.0 ± 0.7	

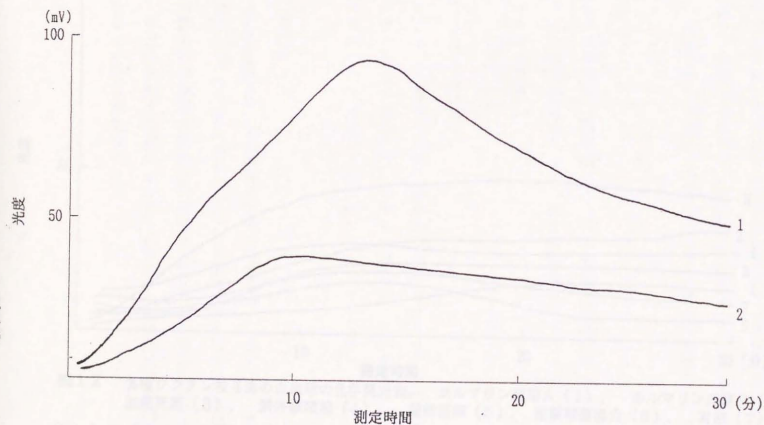


図11 アジュバントワクチン投与魚の白血球の化学発光能。アジュバント混合ホルマリン死菌 (1)
対照 (アジュバントのみ) (2)

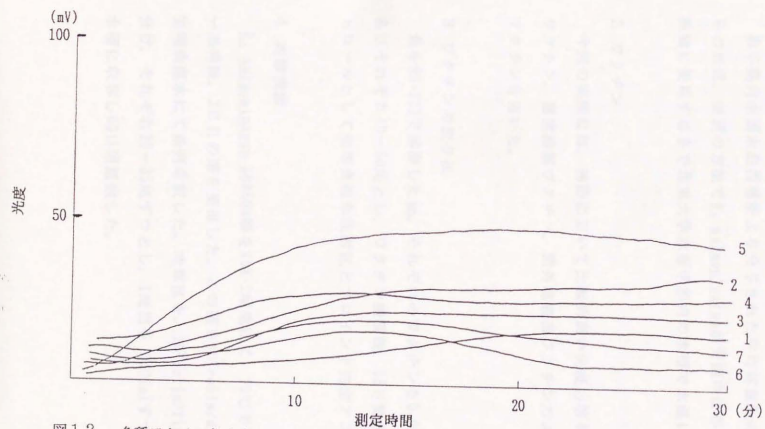


図12 各種ワクチン投与魚の白血球の化学発光能。ホルマリン死菌A (1)、ホルマリン死菌B (2) 加熱死菌 (3)、紫外線殺菌 (4)、菌体溶解 (5)、連鎖球菌混合 (6)、対照 (7)

第2節 BKDワクチンの有効性

材料および方法

1 供試魚

岩手県内水面水産指導所より分与された平均体重5gのニジマスを用いた。これらの魚は、前述の方法で *R. salmoninarum* が腎臓中に存在しないことを確認した後、実験に使用するまで北里大学水産学部内の水槽で水温14℃で飼育した。

2 ワクチン

今回の実験には、前節において比較的高い免疫応答を示したアジュバント混合ワクチン、菌体溶解ワクチン、紫外線殺菌ワクチンおよびホルマリン死菌非洗浄ワクチンを用いた。

3 ワクチンの投与方法

魚をMS-222で麻酔した後、それぞれのワクチンを0.05mlずつ腹腔内注射した。各区それぞれ40-50尾とし、ワクチン接種後、35日間水温14℃で飼育した。コントロールとして生理食塩水注射区とフロイント完全アジュバント注射区を設けた。

4 攻撃実験

R. salmoninarum KU8504株をKDM-2培地にて15℃で14-16日間培養し、コロニー出現後、3日目の菌を使用した。この菌を 10^8 cells/mlの濃度に調製し、さらに生理食塩水にて系列希釈した。攻撃区を、 10^7 cells/fish区と 10^6 cells/fish区に分け、それぞれ20-35尾ずつとし、1尾当たり0.05mlずつ菌液を注射した。13℃の水槽に収容し60日間観察した。

斃死した実験魚について、BKDの病徴を観察した後、腎臓スタンプ標本を作りグラム染色を行った。また間接蛍光抗体法と間接ドットブロット法によって、R. salmoninarum の存在を確めた。60日後、生存魚をすべて取り上げ、斃死魚と同じようにBKDの病徴、腎臓スタンプ標本のグラム染色、間接蛍光抗体法および間接ドットブロット法によるR. salmoninarum 抗原の検出を行った。

6 ワクチンの効果判定

各ワクチンの効果判定には、Amend(1981)の有効率 (RPS)を適用した。有効率は記の計算式で求めた。

$$\text{有効率 (RPS)} = 1 - \frac{\text{ワクチン投与魚の斃死率 (\%)}}{\text{コントロール魚の斃死率 (\%)}} \times 100$$

有効率が60以上になったワクチン区を有効と判定した。

結果

1 アジュバント混合ワクチンの有効性

アジュバント添加ホルマリン死菌ワクチン投与ニジマスの攻撃実験の結果を図13および図14に示した。 2.2×10^7 cells/fishの菌量で攻撃したワクチン投与魚の攻撃後25日目までの生存率は、コントロール魚であるアジュバントのみを接種区の生存率と比べて有意な差（攻撃後25日目の有効率は76.5）を示した。しかし、その後ワクチン投与魚にも斃死が始まり60日目の生存率は、38.2%であった（攻撃後60日目の有効率は38.4）（図13）。 5.1×10^6 cells/fishの菌量で攻撃したワクチン投与魚もほぼ同様な斃死パターンを示し、60日目の生存率は44.1%（有効率は35.7）であった（図14）。アジュバント添加ワクチン区において攻撃試験終了後の生存魚からそれぞれ38.4%および35.7%の割合でR. salmoninarumの抗原が検出された（表43）。

2 菌体溶解ワクチン、紫外線殺菌ワクチンおよびホルマリン死菌ワクチンの有効性

5.7×10^7 cells/fishの菌量で攻撃された菌体溶解ワクチン、紫外線殺菌ワクチンおよびホルマリン死菌ワクチンの有効率は、それぞれ35.8, 5.1, 10.0であった（図15）。これらのワクチンの中では、菌体溶解ワクチンが比較的よい防御能を示した。しかしこれらの生存魚からも75%から100%の割合でR. salmoninarum抗原が検出された。 5.7×10^6 cells/fish攻撃区においても有効率は、菌体溶解ワクチン区で36.4、紫外線殺菌ワクチン区で5.6、ホルマリン死菌ワクチン区で23.7であり、 5.7×10^7 cells/fish攻撃区とほぼ同様な結果が得られた（図16）。そして生存魚腎臓からR. salmoninarum抗原が、高い割合（54.4%から100%）で検出された（表43）。

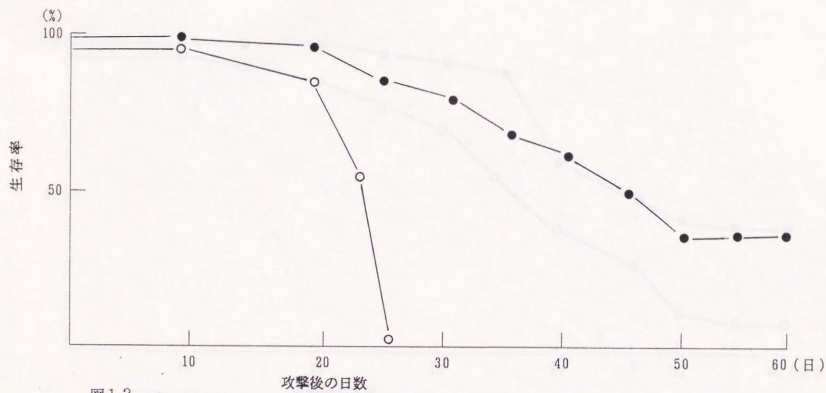


図13 *R. salmoninarum* 2.2×10^7 cells/fishの菌数で攻撃されたアジュバント
ワクチン投与魚の生存率
アジュバントワクチン (●)、対照 (アジュバントのみ) (○)

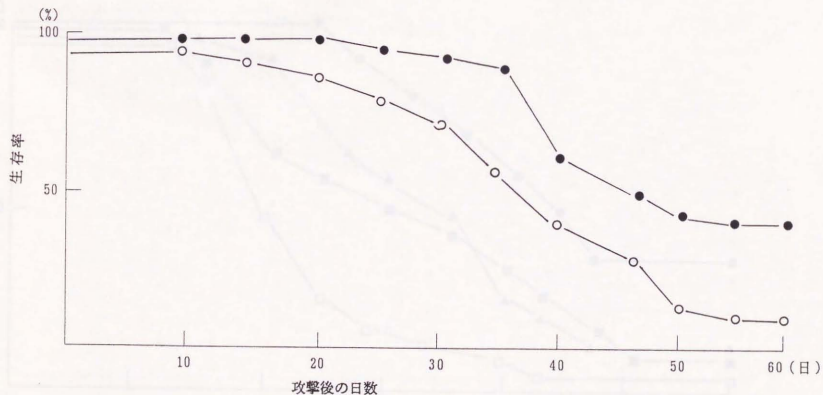
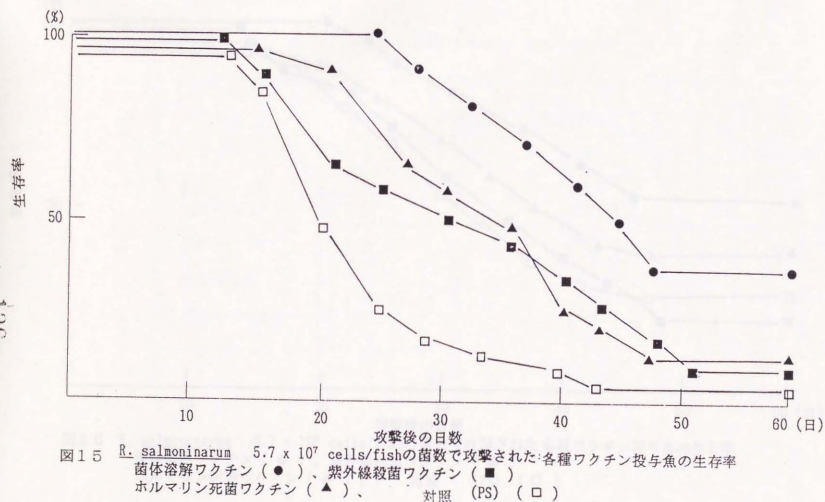


図1.4 *R. salmoninarum* : 5.1×10^6 cells/fishの菌数で攻撃されたアジュバント
ワクチン投与魚の生存率
アジュバントワクチン (●)、 対照 (アジュバントのみ) (○)



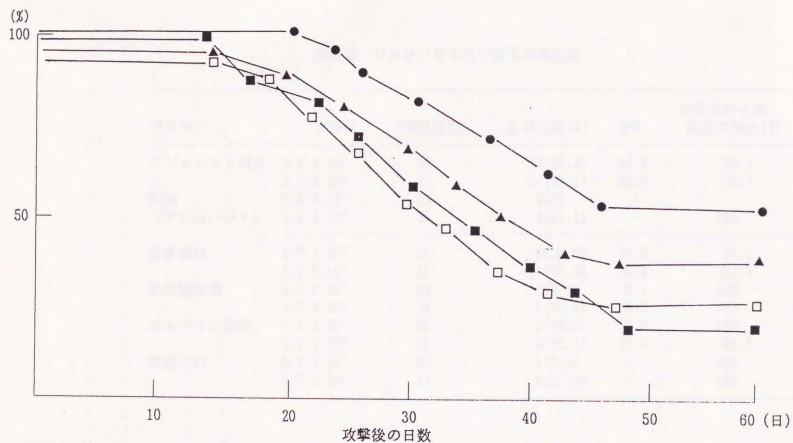


図16 *R. salmoninarum* 5.7×10^6 cells/fishの菌数で攻撃された各種ワクチン投与魚の生存率
 菌体溶解ワクチン (●)、紫外線殺菌ワクチン (■)
 ホルマリン死菌ワクチン (▲)、対照 (PS) (□)

表4-3 ワクチン投与魚の感染実験結果

ワクチン	攻撃区	実験尾数	生存尾数(%)	RPS	生存魚からの 抗原の検出(%)
アジュバント混合	2.2×10^7	34	13(38.2)	38.2	38.4
	5.1×10^6	34	14(41.2)	33.6	35.7
対照 (アジュバント)	2.2×10^7	35	0(0)	-	-
	5.1×10^6	35	4(11.1)	-	100
菌体溶解	5.7×10^7	21	8(38.0)	35.8	75.0
	5.7×10^6	21	11(52.3)	36.4	54.5
紫外線殺菌	5.7×10^7	24	2(8.3)	-5.1	100
	5.7×10^6	24	5(20.8)	5.6	100
ホルマリン死菌	5.7×10^7	23	3(13.0)	10.0	100
	5.7×10^6	21	9(42.8)	23.8	66.6
対照(PS)	5.7×10^7	30	1(3.3)	-	100
	5.7×10^6	24	6(25.0)	-	100

第3節 考察

種々のBKDワクチンを調製してまずニジマスに対する免疫応答を調べ、その中で比較的すぐれた応答を示したものの、すなわち、アジュバント混合ワクチン、菌体溶解ワクチン、紫外線殺菌ワクチンおよびホルマリン死菌ワクチンについて防御能の有無を検討した。これらのワクチンのうち、最も高い防御効果を示したのは、アジュバント混合ワクチンと菌体溶解ワクチンであった。アジュバント混合ワクチンの有効性については、すでにPaterson *et al.* (1981)やEvelyn (1971)がワクチン魚における高い凝集抗体価や、BKDの出現率の減少について報告している。しかしPaterson *et al.* (1981)は、それにもかかわらずBKD感染率は減少しなかったとしている。今回の実験においてもアジュバント混合ワクチン投与魚の白血球は他のワクチン投与魚と比べて高い貪食率と強い化学発光能を示し、さらに感染実験においても比較的すぐれた結果を示した。しかし、ほとんどの生存魚から*R. salmoninarum*抗原が検出された。従ってこれらの魚は、免疫能の低下とともにBKDが発症したり、あるいは保菌魚として他の魚に*R. salmoninarum*を感染させる感染源となる可能性がある。本実験においてコントロールとして設けたフロイント完全アジュバント注射区においても生理食塩水注射区に比べて免疫応答の増加がみられた。フロイント完全アジュバントが自然免疫を活性化することは、Oli-ver *et al.* (1985)によって報告されている。また、Kaattari *et al.* (1987)は、フロイント完全アジュバントの注射によってギンザケの*R. salmoninarum*に対する抵抗性が劇的に増加することを報告している。しかし、本実験においてはKaattari *et al.* (1987)の結果ほどの*R. salmoninarum*に対する抵抗性の増加は認められなかった。これは、ニジマスとギンザケとの*R. salmoninarum*に対する自然免疫応答の違いによるのかも知れない。

現在、最もすぐれた結果が報告されているBKDのワクチンは、McCarthy *et al.* (1984)の菌体溶解ワクチンである。今回の実験においても、菌体溶解ワクチン投

与魚は、アジュバント混合ワクチン投与魚には劣るものの、血中凝集抗体価、白血球の貪食能、化学発光のいずれにおいても優れた免疫応答を示した。また感染実験において、McCarthy *et al.* (1984)の結果に見られたよりは劣るもののある程度の防御能（有効率 35）を示した。しかし、やはりほとんどの生存魚から *R. salmoninarum* 抗原が検出された。

Sakai *et al.* (1987b, 1989b) は、連鎖球菌症のワクチンが白血球の貪食能を増加させることを報告していた。今回、この連鎖球菌症ワクチンとBKDワクチンとを同時に与えることによって、連鎖球菌症ワクチンがBKDワクチンのアジュバントとして働くことを期待した。しかし、免疫応答の実験においてホルマリン死菌ワクチンを与えた場合とまったく差がなく、連鎖球菌症ワクチンによるアジュバント効果は認められなかった。Kaattari *et al.* (1987, 1988) も、数々の方法を用いて *V. anguillarum* と *R. salmoninarum* を結合させてワクチンの有効性を検討したが、有益な防御能は得られなかったと報告している。

すでに実用化されているビブリオワクチンでは、菌をホルマリンで不活化した後、十分に菌体を洗浄してワクチンとして用いている。しかし、Amend *et al.* (1984) は、ビブリオ病やレッドマウス病のワクチンにおいては菌体のLPSが重要な免疫原となっているが、BKDやせつそう病の場合はむしろ菌体表面上のタンパク質が重要な免疫原であることを示唆している。そこで本実験においては、ホルマリンで菌体を不活化する前に、菌体を十分にミキサーで攪拌することによって菌体表面上のタンパク質を生理食塩水に溶出させ、それを菌体といっしょに魚体に注射した。しかしこのように処理したホルマリン死菌ワクチンにおいても、血中凝集抗体価、白血球の貪食能および化学発光には、まったく差がみられなかった。また菌体非洗浄ワクチンを用いて攻撃実験を行ったが、生残率が低く、有効性に乏しかった。最近、Turaga *et al.* (1987) が、*R. salmoninarum* の菌体外生成物 (ECP) は、*in vitro* においてリンパ球の抗体産生能を抑制する働きがあることを報告しており、あるいは本実験の結果は、ホルマリン死菌に加えたこれらの成分が

むしろ免疫の抑制に働いたことも考えられる。

攻撃試験終了後のワクチン投与生残魚のほとんどから *R. salmoninarum* 抗原の存在が確認された。この事実は、ワクチン投与魚群において *R. salmoninarum* に対する免疫力が低下するとBKDが発病するおそれのあることを示唆している。このような現象はビブリオワクチン投与魚には観察されていない (Sakai *et al.* 1986a)。最近、Kaattari *et al.* (1989) (私信) は、本菌に感染した魚の腎臓中でおこる抗原抗体反応が食細胞によって処理されないために、感染魚が複合体性過敏症に陥ることを報告している。さらに、本菌が食細胞内で生存できる能力を有することも防御能を獲得する上において大きな障害となっている (Young and Chapman, 1978)。これらの事実を総合すると、宿主の抵抗力によってBKDを予防することのきわめて難しいと結論される。

細菌性腎臓病は、外来の伝染病であると考えられており、わが国では1973年に北海道ではじめて発見され、その後全国各地に広がった。本研究においては疫学的視点から養殖ギンザケのBKDを研究した。そしてその養殖が、わが国においてBKDを広める大きな原因になっていることを明らかにした。*R. salmoninarum*は水平にも垂直にも感染することが知られている。現在、水産庁が中心となって*R. salmoninarum*汚染卵を蛍光抗体法によって検査しているが、この検査方法では 10^3 から 10^4 cells/g以上の菌量でないと検出できず、またその検査体制は必ずしも十分でなく、正規の経路以外からも卵が輸入されている状態にある。今回のBKDの野外調査の結果をみると本病が減少している傾向は認められなかった。養殖ギンザケでは、魚令の高いほどBKDの明確な病徴が見られるようになり、さらに海へ運ばれることによってBKDによる斃死が増大する傾向にあった。海面におけるBKDによる斃死の増大は、マスノスケについて調べたBanner *et al.* (1983)も報告されている。もう一つの問題は、ギンザケからその他の魚種に本病が感染することである。養殖ヤマメとイワナを中心にBKDの疫学的調査を行った結果、あまり数は多くないものの、ヤマメもイワナも*R. salmoninarum*に感染しているという実態が明らかとなった。Kinura and Yoshimizu (1981)も同じようにヤマメのBKDについて報告している。これらの魚にBKDが見つかった場所のほとんどがギンザケ養殖とのなんらかの関係があることが明らかとなり、これらの魚類へのBKDを防ぐためには、ギンザケ養殖をその地域に持ち込まないことが必要であると考えられる。

種々の魚に対する*R. salmoninarum*の感受性を調べた結果、アユが本菌に対してきわめて高い感受性を持つことが示された。これまで、アユのBKDについては報告されていないが、将来ギンザケとアユが同じ場所で養殖されることになれば、アユにもBKDが発生する可能性があり、今後十分に注意しなければならない。

*R. salmoninarum*の海水中での水平感染についてはこれまで報告されていないが、

本研究によつて *R. salmoninarum* が海水中に30日以上生存することが明らかとなった。また、海水ギンザケ養殖場付近から採集した海産魚から *R. salmoninarum* 抗原が検出され、貝類が本菌を保菌する可能性も示された。これらの結果は、*R. salmoninarum* が海水中で水平感染する可能性を示唆している。最近 Evelyn (1988) は、淡水中で *R. salmoninarum* に感染していなかったベニザケが、海水中で *R. salmoninarum* に感染したことを報告している。このようなことから海水を介して養殖ギンザケからシロサケ、サクラマスへBKDが流行する可能性がある。今回、海水環境よりサンプリングされたサクラマスに、かなり高い割合で *R. salmoninarum* の感染が見られた。岩手県においては、現在サクラマスの増養殖がさかんに行われており、十分な対策を行わなければ、将来サクラマスのBKDが大きな問題となる可能性が考えられる。潮上シロサケを中心に、ドットプロット法による *R. salmoninarum* 抗原検査と、マイクロタイター法による血中抗体検査を行った。その結果、ドットプロット法によつて3%の割合で抗原が検出され、さらにマイクロタイター法によつて13%の魚に *R. salmoninarum* に対する抗体が検出された。これらの魚の *R. salmoninarum* の感染源として、同じ湾で行われているギンザケ養殖が疑われ、放流直後に感染したのではないと思われる。シロサケへのBKDの伝播は、シロサケの資源に少なからず影響を与えることも予測され、シロサケの放流が行われている湾内のギンザケ養殖を規制するなどの行政の対応が必要となるであろう。

BKDの予防ワクチンについては、ワクチン投与によつて免疫が賦与されることを明かにしたがその能力は低く、直ちに予防に結びつく結果は得られなかった。現在のところ、BKDに対する有効なワクチンの開発はきわめて難しいと考えられる。

これまで述べてきたように、わが国においては、BKDはギンザケに多くみられ、その他の魚種には、まだ発生例が少ない。しかし水平感染については、現在徐々にではあるが拡大しており養殖区域に、一度本病が入るとなかなか除くことが困難な状況にある。また、シロサケ資源への影響が懸念される。Wedeneyer and Nelson (1977) は、魚病の水平感染を予防する方法として、①病気が発生している

養魚場の水からの病原体の除去 ②養魚場での病気の広がりを防ぐために水の再利用システムにおける病原体の駆除 ③養魚場における排水中の病原体の撲滅による環境の保護を上げている。ギンザケ養殖の場合、これらの対策を海面で実行することは不可能であり、淡水養殖期間にしか適応されない。また、これらの予防方法の実施には紫外線やオゾン等による養魚用水の殺菌が必要であるが、紫外線やオゾンがどれだけ *R. salmoninarum* を殺菌するかについては、まだ検討されていない。従って現在実施できる最もよい方法は、病魚および保菌魚を持ち込まないことであり、検査を徹底することであろう。本研究において検討したドットブロット法は、*R. salmoninarum* の保菌魚を検査するのに感度と簡便さにおいても優れた方法であり、検査を実施する上で有力な手段を与えるものと考えられる。

要約

- 1 間接ドットプロット法を用いる酵素抗体法は、感度および所用時間の点で最も実用的と判断された。発光剤としては、ジ-アミノベンチジンが感度の面からすぐれていた。本法は、ホルマリン固定サンプルからもBKDの診断出来ることが分かった。
- 2 各診断法の感度は、ドットプロット法が 10^2 cells/g、間接蛍光抗体法が 10^3 cells/g、共同凝集反応が 10^4 cells/g、ラテックス凝集反応と対向免疫電気泳動が 10^7 cells/g、そしてゲル内沈降法は 10^3 cells/gであった。
- 3 養殖ギンザケにおける R. salmoninarum 感染の実態を、1985年から1989年までの5年間にわたって調べた。淡水においては17.2% (1532尾中264尾)、馴致時には25.1% (635尾中160尾)、そして海水においては33.6% (383尾中129尾) であった。このように養殖期間が長くなるに従って拡大する傾向にあった。
- 4 BKDは養殖ヤマメ、イワナおよびニジマスにおいて、それぞれの陽性率は、21.5%, 5.1%, および4.3%であった。
- 5 天然水域より採捕されたサクラマスおよびシロサケの R. salmoninarum 感染率は、15.0%および3.4% であった。従って、これらの資源は少なからず R. salmoninarum に感染していることが示された。
- 6 R. salmoninarum はシロサケおよびアユに対して高い感染性を示したが、ヤ

マメ、ギンザケ、イワナおよびニジマスに対する感染性はあまり高くなかった。しかし、これらの魚がR. salmoninarumの保菌魚となりうることが示された。なお、コイはR. salmoninarumに対して感受性を示さず、保菌魚となる可能性も少ないと考えられた。

- 7 R. salmoninarumは海水中および淡水中で少なくとも40日間生存することが示された。
- 8 海水ギンザケ養殖場付近で採捕した海産魚（ニジカジカ）からR. salmoninarum 抗原が検出され、R. salmoninarumが養殖場から周囲水域の海産魚に伝播することが示唆された。
- 9 海水ギンザケ養殖場の周囲に吊したホタテガイからR. salmoninarum抗原が見い出され、ホタテガイもR. salmoninarumに感染することが示された。
- 10 R. salmoninarum感染魚の血中抗体価をELISA法とマイクロタイター法で測定したところELISA法はマイクロタイター法の5-10倍の感度をもつことが分かった。
- 11 養殖ギンザケのR. salmoninarumに対する抗体の保持率は、マイクロタイター法で 31.1 %であった。一方、シロサケにおいては、9.9 %であった。
- 12 7種類のBKDワクチンを調製してニジマスに注射し、免疫応答をマイクロタイター法、白血球の食食能および化学発光を用いて調べたところ、フロイント完全アジュバント混合ワクチンが最もすぐれた免疫応答を示した。

- 13 フロイント完全アジュバント混合ワクチン、ホルマリン死菌ワクチン、紫外線殺菌ワクチンおよび菌体溶解ワクチンを用いて、BKDに対する防御能を検討したところ、いずれのワクチン区においても、十分な防御効果は認められなかった。さらに、ほとんどの生存魚から *R. salmoninarum* 抗原が検出された。

謝 辞

本研究は東京大学農学部若林久嗣教授の御指導、御鞭撻の下に行われたものでありここで深甚なる謝意を表する。また、種々の有益な御助言と御激励を賜った北里大学水産学部小林正典教授に感謝する。北里大学水産学部厚田静男講師には、本研究の細部にわたり直接御指導を賜るとともに、本論文の作成に際し御助言をいただいた、衷心より謝意を表する。さらに本論文作成に当たり種々御協力をいただいた北里大学水産学部水族病理学研究室の関係各位に深謝する。

そのほか試料の入手につき種々御援助、御配慮下さった岩手県内水面指導所熊谷明氏（現宮城県水産試験場）稲荷森輝明氏、宮城県内水面試験場 星合惣一氏および岩手県三陸町ギンザケ養殖業者の関係各位に深謝する。

引用文献

- Amend, D.F.(1981): Potency testing of fish vaccine. Dev. Biol. Standard., 49, 447-454.
- Amend, D.F., Johnson, K.A.(1984): Evidence for lack of antigenic competition among various combinations of Vibrio anguillarum, Yersinia ruckeri, Aeromonas salmonicida and Renibacterium salmoninarum bacterins when administered to salmonid fishes. J. Fish Dis., 7, 293-299.
- Allison, L.N.(1958): Multiple sulfa therapy of kidney disease among brook trout. Prog. Fish Cult., 20, 66-68.
- Austin, B.(1985): Evidence of antimicrobial compounds for the control of bacterial kidney disease in rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. J. Fish Dis., 8, 209-220.
- Austin, B. and Rayment, J.(1985): Epizootiology of Renibacterium salmoninarum, the causal agent of bacterial kidney disease in salmonid fish. J. Fish Dis., 8, 505-509.
- Austin, B., Embley, T.M. and Goodfellow, M.(1983): Selective isolation of Renibacterium salmoninarum. FEMS Microbiol Lett., 17, 111-114.
- Austin, B., Bucke, D., Feist, S. and Rayment, J. (1985): A false positive reaction in the indirect fluorescent antibody test for Renibacterium salmoninarum with a 'coryneform' organism. Bull. Eur. Asso. Fish Pathol., 5, 8-9.

- Banner, C.R., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L. (1983): Renibacterium salmoninarum as a cause of mortality among chinook salmon in salt water. J. World Maricult. Soc. 4, 236-239.
- Banner, C.R., Long, J.J., Fryer, J.L. and Rohovec, J.S. (1986): Occurance of salmonid fish infected with Renibacterium salmoninarum in the Pacific Ocean. J. Fish Dis., 9, 273-275.
- Belding, D.L. and Merrill, B. (1935): A preliminary report upon a hatchery disease of the Salmonidae. Trans. Amer. 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. Can., 18, 559-562.
- Bell, G.R., Traxler, G.S. and Dworschak, C. (1988): Development in vitro and pathogenicity of an erythromycin-resistant strain of Renibacterium salmoninarum, the causative agent of bacterial kidney disease in salmonids. Dis. Aquat. Org. 4, 19-25.
- Bruno, D.W. (1989): Scottish experience with bacterial kidney disease in farmed salmonids between 1976 and 1985. Aquacult. Fish. Managmt., 17, 185-190.
- Bruno, D.W. (1987): Serum agglutinating titers against Renibacterium salmoninarum the causative agent of bacterial kidney disease, in rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson, and Atlantic salmon, Salmo salar L. J. Fish Biol., 30, 327-334.

- Bruno, D.W. (1988): The relationship between auto-agglutination, cell surface hydrophobicity and virulence of the fish pathogen Renibacterium salmoninarum. FEMS Microbiol Lett., 51, 135-140.
- Bruno, D.W. and Munro, A.L.S. (1986): Uniformity in the biochemical properties of Renibacterium salmoninarum isolates obtained from several sources. FEMS Microbiol Lett., 33, 247-250.
- Bullock, G.L. and Stuckey, H.M.(1975): Fluorescent antibody identification and detection of the Corynebacterium causing kidney disease of salmonids. J. Fish. Res. Bd. Can., 32, 2224-2227.
- Bullock, G.L., Stuckey, H.M. and Chen, P.K. (1974): Corynebacterial kidney disease of salmonids: growth and serological studies on the causative bacterium. Applied Microbiol., 28, 811-814.
- Bullock, G.L., Stuckey, H.M. and Mulcahy, D. (1976): Corynebacterial kidney disease: egg transmission following iodophore disinfection. Fish Health News, 76, 51-52.
- Bullock, G. L., Griffin, B.R. and Stuckey, H.M. (1980): Detection of Corynebacterium salmoninus by direct fluorescent antibody test. J. Fish. Res. Bd. Can., 37, 719-721.
- Chen, P.K., Bullock, G.L., Stuckey, H.M. and Bullock, A.C. (1974): Serological diagnosis of corynebacterial kidney disease of salmonids. J. Fish. Res. Bd. Can., 31, 1939-1940.
- Cipriano, R.C., Stariliper, C.E. and Schachte, J.H.(1985): Comparative

sensitivities of diagnostic procedures used to detect bacterial kidney disease in salmonid fishes. J. Wildl. Dis., 21, 144-148.

Cipriano, R.C., Pyle, J.G., Starliper, C.E. and Pyle, W. (1985):

Detection of Vibrio anguillarum antigen by dot blot assay. J.

Wildl. Dis., 21, 211-218.

Cossarini-Dunier, M. (1985): indirect enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA) to titrate rainbow trout serum antibodies against two

pathogens: Yersinia ruckeri and Egtved virus. Aquaculture, 49, 197-208.

Daly, J.G. and Stevenson, R.M.W. (1985): Charcoal agar, a new growth

medium for the fish disease bacterium Renibacterium salmoninarum.

Appl. Environ. Microbiol. 50, 868-871.

Daly, J.D. and Stevenson, R.M.W. (1987): Hydrophobic and

haemagglutinating properties of Renibacterium salmoninarum.

J. Gen. Microbiol., 133, 3575-3580.

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. Wildl. Dis.,

7, 328-335.

Evelyn, T.P.T. (1977): An improved growth medium for the kidney

bacterium and some notes on using the medium. Bull. De l'Office.

Inter. Epiz., 87, 511-513.

Evelyn, T.P.T. (1988): Bacterial kidney disease in British Columbia,

Canada: comments on its epizootiology and methods for its control on fish farms. In: AQUA NOR 87 Trondheim international Conference, Norske Fiskeoppdretters Forening - Fishoppdretternes Salgslag A/L, Trondheim, Norway, 51-57.

Evelyn, T.P.T., Ketcheson, J.E. and Prosperi-porta, L. (1984): Further evidence for the presence of Renibacterium salmoninarum in salmonid eggs and for the failure of providone-iodine to reduce the intra-ovum infection rate in water-hardened eggs. J. Fish Dis., 7, 173-182.

Fryer, J.L. and Sanders, J.E. (1981): Bacterial kidney disease of salmonid fish. Ann. Rev. Microbiol. 35, 273-298.

Getchell, R.G., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L. (1985): Comparison of Renibacterium salmoninarum isolates by antigenic analysis. Fish Pathol., 20, 149-159.

Groman, D.B. and Klonz, G.W. (1983): Chemotherapy and prophylaxis of bacterial kidney disease with erythromycin. J. World Maricult. Soc., 14, 226-235.

Hamilton, A.J., Fallon, M.J.M., Alexander, J. and Canning, E.J. (1987): A modified enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) for monitoring antibody production during experimental Aeromonas salmonicida infection in rainbow trout(Salmo gairdneri). Dev. Comp. Immunol., 11, 253-258.

早川穰, 原田隆彦, 畑井喜司雄, 窪田三朗, 文谷俊雄, 星合惣一 (1988): 海面養殖ギンザケにみられた細菌性腎臓病の病理組織学的研究. 魚病研究, 24,

Kaattari, S., holland, N., Turaga, P. and Weins, G. (1987): Development of a vaccine for bacterial kidney disease. Bonneville Power Administration, Project 84-46, Annual report 1986, Portland, Oregon.

Kaattari, S., Chen, D., Truga, P. and Wiens, G. (1988): Development of a vaccine for bacterial kidney disease. Bonneville Power Administration, Project 84-46, Annual report 1987, Portland, Oregon.

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.

Kimura, T. and Yoshimuzu, M. (1981): A coagglutination test with antibody-sensitized staphylococci for rapid and simple diagnosis of bacterial kidney disease (BKD). Devel. Biol. Stand., 49, 135-148.

Kodama, H., Honda, A., Moustafa, M., Mikami, T. and Izawa, H. (1985): Detection of antibody in rainbow trout against Aeromonas salmonicida a by enzyme-linked immunosorbent assay. Fish Pathol., 20, 237-242.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-272.

Mackie, T.J., Arkwright, J.A., Pryce-Tannatt, T.E., Mottram, J.C., Johnson, W.D. and Menzies, W.J.M. (1933): The second Interim Report

of the Furunculosis Committee. H. M. Stationary Office, Edinburgh, 1-81.

McCarthy, D.H., Croy, T.R. and Amend, D.F. (1984): Immunization of rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson, against bacterial kidney disease: preliminary effect evaluation. J. Fish Dis., 7, 65-71.

Mitchum, D.L., Sherman, L.E. and Baxter, G.T. (1979): Bacterial kidney disease in feral populations of brook trout(Salvelinus fontinalis), brown trout(Salmo trutta), and rainbow trout(Salmo gairdneri). J. Fish. Res. Bd. Can., 36, 1370-1376.

Nakane, P. and Kawai, A. (1974): peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation. J. Histochem. Cytochem., 22, 1084-1091.

Oliver, G., Evelyn, T.P.T. and Lallier, R. (1985): Immunity to Aeromonas salmonicida in coho salmon(Oncorhynchus kisutch) induced by modified Freund's complete adjuvant: its nonspecific nature and the probable role of macrophages in the phenomenon. Dev. Comp. Immunol., 9, 419-432.

Ordal, E.J. and Earp, B.J. (1956): Cultivation and transmission of etiological agent of kidney disease in salmonid fishes. Proc. Soc. Experi. Biol. Med., 92, 85-88.

Pascho, R. J. and Mulcahy, D. (1987): Enzyme-linked immunosorbent assay for a soluble antigen of Renibacterium salmoninarum, the causative agent of bacterial kidney disease. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 44, 183-191.

- Pascho, R. J. Elliott, D. G., Mallett, R. W. and Mulcahy, D. (1987):
 Comparson of five techniques for the detection of Renibacterium salmoninarum in adult coho salmon. Trnas. Am. Fish. Soc., 11, 882-890.
- Paterson, W.D., Desautels, D. and Weber, J. (1980): The immune response of Atlantic salmon(Salmo salar) to the causative response agenst of bacterial kidney disease(Renibacterium salmoninarum). J. Fish Dis., 4, 99-111.
- Paterson, W.D., Lall, S.P. and Desautels, D. (1981): Studies on bacterial kidney disease in Atlantic salmon(Salmo salar) in Canada. Fish Pathol., 15, 283-292.
- Rucker, R.R., Bernier, A.F., Whipple, W.J. and Burrows, R.E. (1951): Sulfadiazine for kidney disease. Prog. Fish. Cult., 13, 135-137.
- Sakai, D.K., Nagata, M., Iwami, T., Kiode, N., Tamiya, Y., Ito, Y. and Atoda, M. (1986): Attemplte to control BKD by dietary modification and erythromycin chemotherapy in hatchery-reared masu salmon Oncorhynchus masou Brevoort. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 52, 1141-1147.
- Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayashi, M. (1986): Comparative sensitivities of several diagnostic methods used to detect fish furunculosis. kitasato Arch. of Exp. Med., 59, 42-48.
- Sakai, M., Koyama, G., Atuta, S. and Kobayashi, M. (1987): Detection of Renibacterium salmoninarum by a modified peroxidase-antiperoxidase

(PAP) procedure. Fish Pathol., 22, 1-5.

Sakai, M., Kubota, R., Atsuta, S. and Kobayashi, M. (1987): Vaccination of rainbow trout Salmo gairdneri against β -hemolytic streptococcal disease. Nippon Suisan Gakkaishi, 53, 1373-1376.

Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayashi, M. (1989a): Comparison of method used to detect Renibacterium salmoninarum, the causative agent of bacterial kidney disease. J. Aqu. Amin. Health, 1, 21-24.

Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayashi, M. (1989b): Protective immune response in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, vaccinated with β -hemolytic streptococcal bacterin. Fish Pathol., 24, 169-173.

Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayashi, M. (1989c): Bacterial kidney disease in Masu salmon, Oncorhynchus masou. Physiol. Ecol. Japan Spec., 1, 577-586.

Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayashi, M. (1989d): Attempted vaccination of rainbow trout Oncorhynchus mykiss against bacterial kidney disease. Nippon Suisan Gakkaishi, 55, 2105-2109.

Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayashi, M. (1989e): The immune response of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss vaccinated by Renibacterium salmoninarum, the causative agent of bacterial kidney disease. Current Topics in Marine Biotechnology(ed. by S. Machii, I. Karube and Y. Ishida), 348-349.

Sakai, M., Ogasawara, K., Atsuta, S. and Kobayashi, M. (1989): Comparative sensitivity of carp, Cyprinus carpio L, and rainbow

- trout, Salmo gairdneri, Richardson, to Renibacterium salmoninarum. J. Fish Dis., 12, 367-372.
- Sanders, J.E and Fryer, J.L. (1980): Renibacterium salmoninarum gen. nov., sp. nov., the causative agent of bacterial kidney disease in salmonid fishes. Inter. J. System. Bacteriol., 30, 496-502.
- Sanders, J.E., pilcher, K.S. and Fryer, J.L. (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. Can., 35, 8-11.
- Snieszko, S.F. and Griffin, P.J. (1955): Kidney disease in brook trout and its treatment. Prog. Fish Cult., 17, 3-13.
- Thuvander, A., Hongslo, T., Jansson, E. and Sundquist, B. (1987): Duration of protective immunity and antibody titers measured by ELISA after vaccination of rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson, against vibriosis. J. Fish Dis., 10, 479-486.
- Truaga, P., Wiens, G. and Kaatari, S. (1987): Bacterial kidney disease: the potential role of soluble antigen(s). J. Fish Biol. 31(Suppl.A), 191-194.
- Warren, J.W (1963): Toxicity tests of erythromycin thiocyanate in rainbow trout. Prog. Fish Cult., 25, 88-92.
- Wedemeyer, G.A. and Nelson, N.C. (1977): Survival of two bacterial fish pathogens(Aeromonas salmonicida and the enteric redmouth bacterium) in ozonated, chlorinated, and untreated waters. J. Fish. Res. Bd.

Can., 34, 429-432.

Wins, G.D. and Kaatari, S.L. (1989): Monoclonal antibody analysis of common surface protein(s) of Renibacterium salmoninarum. Fish Pathol., 24, 1-8.

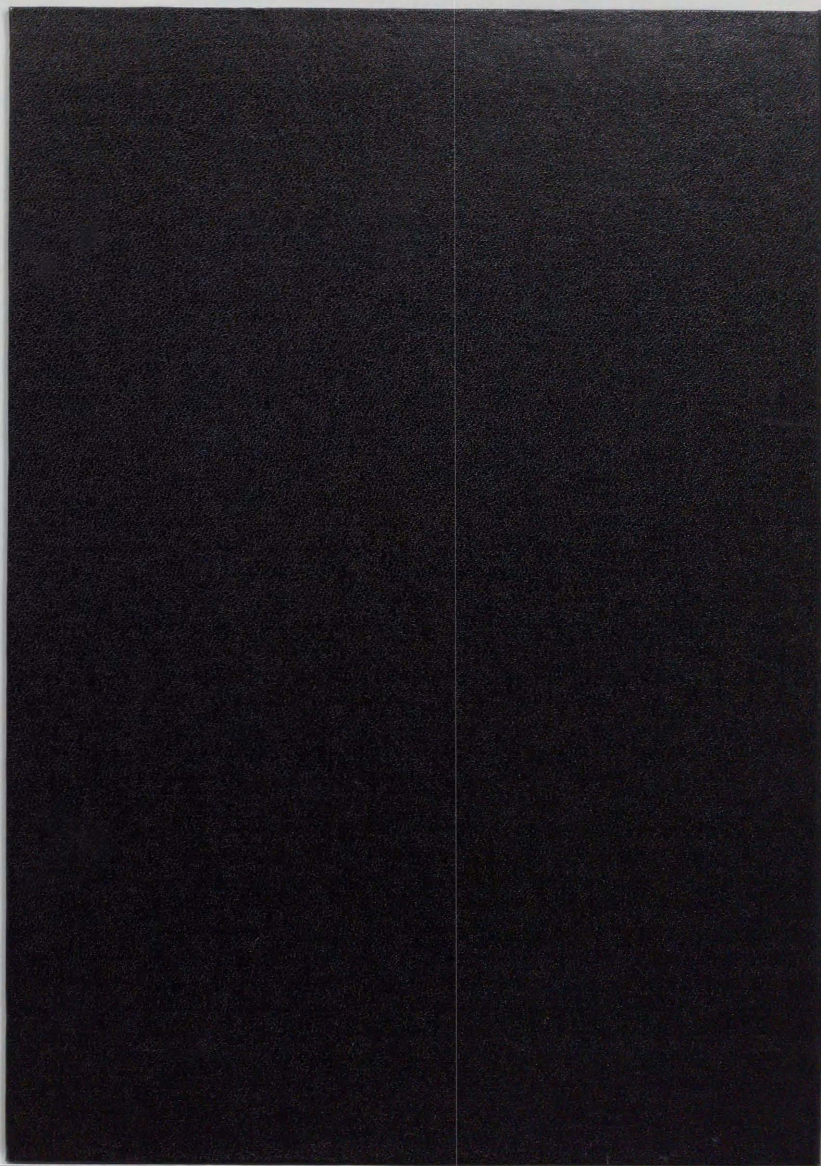
Wolf, K. (1966): Bacterial kidney disease of salmonid fishes. U. S. Fish, Wildl. Serv., Fish Disease Leafl., 8, 1-4.

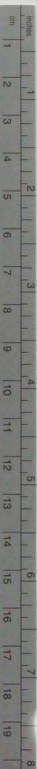
Wolf, K. and Dunber, C.E. (1959): Test of 34 therapeutic agents for control of kidney disease in trout. Trnas. Am. Fish. Soc., 88, 117-124.

Wood, J.W. and Wallis, J. (1955): Kidney disease in adult chinook salmon and its transmission by feeding to young chinook salmon. Fish. Comm. Oregon, Res. Briefs, 6, 32-40.

吉水守, 紀栄典, 野村哲一, 木村喬久 (1987): BKD原因菌 Renibacterium salmoninarum ATCC 33209 と共通抗原を有する Pseudomonas 属細菌の存在について. さけ・ます研報, 41, 121-127.

Young, C.L. and Chapman, G.B. (1978): Ultrastructural aspects of the causative agent and histopathology of bacterial kidney disease in brook trout (Salvelinus fontinalis). J. Fish. Res. Bd. Can., 35, 1234-1248.





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

