

## 蛍光抗体法によるコイ組織内の エロモナス菌の検出

竹内俊博\*・宮崎照雄

三重大学水産学部

### Detection of Aeromonad Bacteria in Tissues of the Carp with Fluorescent Antibody Techniques

Toshihiro TAKEUTI and Teruo MIYAZAKI

Faculty of Fisheries, Mie University

Both *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida* were injected into the skin of carps (23g in mean body weight) with 0.1ml of PBS containing *A. hydrophila*  $10^6$  CFU + *A. salmonicida*  $10^6$  CFU/ml, *A. hydrophila*  $10^7$  CFU + *A. salmonicida*  $10^7$  CFU/ml, *A. hydrophila*  $10^6$  CFU + *A. salmonicida*  $10^8$  CFU/ml and *A. hydrophila*  $10^5$  CFU + *A. salmonicida*  $10^9$  CFU/ml. The injected lesions were studied with histopathological and indirect fluorescent antibody techniques (IFAT). All injected lesions showed necrosis, hemorrhage and bacterial multiplication in the skin and lateral musculature. IFAT used the absorbed anti-*A. hydrophila*-serum markedly revealed fluorescent antibody response in all injected lesions, indicating the bacterial multiplication in tissues. On the other hand, IFAT used the absorbed anti-*A. salmonicida*-serum narrowly revealed fluorescent antibody response in the lesions in which *A. hydrophila*  $10^6$  CFU + *A. salmonicida*  $10^7$  CFU and *A. hydrophila*  $10^4$  CFU + *A. salmonicida*  $10^8$  CFU were injected. These results indicated that *A. hydrophila* more dominantly multiplied in the carp tissues than *A. salmonicida* when they were mixed. The indirect fluorescent antibody technique used absorbed antisera proved to be an effective and useful method for bacterial distinction in lesions where bacteria belonging to the same genus were mixed.

Key words : Aeromonad, Indirect fluorescent antibody technique

穴あき病は、コイ、キンギョおよびフナの間には発生する疾病で、魚の体表に糜爛や潰瘍病巣が形成されるのが特徴である。その病原体として、*Flexibacter columnaris* (宮崎ら 1973), *Aeromonas hydrophila* (高橋ら 1975 a,b), 一種の滑走細菌 (宮崎ら 1976 a,b,c) および非定型 *A. salmonicida* (ELLIOTT and SHOTTS 1980a,b) がそれぞれあげられ、これらの細菌の単独あるいは混合感染によって魚の体表に病巣が形成されると考えられている。患部の組織内における *F. columnaris* や一種の滑走細菌はその特徴的な形態から判別が容易であるが、同じエロモナス属の *A. hydrophila* と *A. salmonicida* の識別は全く不可能であった。しかし、同じエロモナス属の細菌でも、*A. hydrophila* と *A. salmonicida* のそれぞれの抗血清を用いた間接蛍光抗体法によれば両者の識別が可能であると考えられた。本研究では、*A. hydrophila* と *A. salmonicida* の両者をコイに接種し、その接種患部の組織内における二種の分布状態を間接蛍光抗体法によって観察した。

## 材料および方法

### 供試魚および供試細菌

感染実験には平均体重23gのコイ14尾を用いた。供試細菌の *A. hydrophila* は1985年11月、大阪府淡水魚試験場より採取した穴あき病のフナの患部から分離したH-1株であり、*A. salmonicida* は1984年6月、奈良県下の養殖場から採取したセッソウ病のアマゴ患部から分離したA-1株である。これら二種の細菌をそれぞれBHI寒天平板培地で25°C、48時間培養後、pH7.5滅菌リン酸緩衝液に懸濁した。感染実験に際し、これら二種の細菌の懸濁液を *A. hydrophila* 10<sup>6</sup> CFU + *A. salmonicida* 10<sup>6</sup> CFU /ml, *A. hydrophila* 10<sup>7</sup> CFU + *A. salmonicida* 10<sup>7</sup> CFU /ml, *A. hydrophila* 10<sup>6</sup> CFU + *A. salmonicida* 10<sup>8</sup> CFU /ml, *A. hydrophila* 10<sup>5</sup> CFU + *A. salmonicida* 10<sup>9</sup> CFU /ml, および *A. hydrophila* 10<sup>9</sup> CFU + *A. salmonicida* 10<sup>9</sup> CFU /ml, となるよう混合した。その二種の細菌の混合液を各区3または4尾に、1尾あたり0.1mlずつ体側部の鱗下に注射した。細菌接種後、魚は50リットル水槽 (水温20°C) に収容した。

### 組織標本作製および蛍光抗体法

供試魚は、接種後毎日1尾ずつ各接種群から採取した。それらの供試魚の注射患部をナイフで切り取り、10%中性ホルマリン水 (4°C) で3-5日間固定した。固定標本のエタノール系列による脱水は4°Cで行い、パラフィン包埋は56°Cで行い、3-5μmのパラフィン切片を作製した。蛍光抗体法のための *A. hydrophila* のウサギ抗血清 (以下Ah抗血清) は高知大学農学部水族病理学講座より分与を受けた。また、*A. salmonicida* のウサギ抗血清 (As抗血清) は北里大学水産学部より分与を受けた。これら二種の細菌のウサギ抗血清からそれぞれの共通抗体を除去するため、まずAs抗血清に滅菌リン酸緩衝液 (以下PBS) で3回洗浄した *A. hydrophila* ホンマリン死菌を懸濁させ37°Cで2時間反応させた。その後、4°Cで1晩静置し、遠心分離器で死菌を除去して吸収As抗血清を得た。また、吸収Ah抗血清は *A. salmonicida* ホルマリン死菌懸濁により得た。そしてガラス凝集テストにより両吸収抗血清から共通抗体が除去されたことを確認した。吸収As抗血清の凝集力価は640、吸収Ah抗血清の凝集力価は640であった。組織切片のための蛍光抗体法は次に述べる間接蛍光抗体法を用いた。まず組織切片は脱パラフィン後PBSで十分に洗浄し、トリプシン消化液で30分間処理しPBSで十分に洗浄した。その組織切片上に各吸収抗血清をかけて

60分間反応させ、PBS で充分洗浄後、FITC 標識抗ウサギIgGヤギ血清（医学生物学研究所）をかけて60分間反応させ PBS で十分に洗浄した。組織切片は緩衝グリセリン液で封入し、蛍光顕微鏡（オリンパス）のU励起で観察した。また、*A. hydrophila* と *A. salmonicida* の菌体についても組織切片と同様に処理し、菌体の蛍光反応の指標とした。なお、病理組織学的観察には組織切片にギムザ染色を施した。

## 結 果

### 実験魚の外見

各接種群の実験魚はともに、接種後1日目から注射部位が出血を伴って腫大し、立鱗を呈していた。なお、1尾あたり *A. hydrophila*  $10^8$  CFU + *A. salmonicida*  $10^8$  CFU 接種群では4日目に斃死が認められた。

### 病理組織学的所見

1尾あたり、*A. hydrophila*  $10^5$  CFU + *A. salmonicida*  $10^5$  CFU, *A. hydrophila*  $10^6$  CFU + *A. salmonicida*  $10^6$  CFU, *A. hydrophila*  $10^8$  CFU + *A. salmonicida*  $10^8$  CFU および *A. hydrophila*  $10^5$  CFU + *A. salmonicida*  $10^7$  CFU 各接種群の実験魚ではともに、細菌注射患部において細菌が真皮から体側筋組織にかけて増殖しており、そこに壊死と出血が起こっていた (Fig. 1)。それに対して、1尾あたり *A. hydrophila*  $10^4$  CFU + *A. salmonicida*  $10^8$  CFU を接種した実験魚では、細菌注射患部において細菌が真皮から体側筋組織にかけて増殖しており、そこに壊死、軽微な出血、好中球やマクロファージの浸潤およびそれらの食菌像が観察された (Fig. 2)。

### 蛍光抗体法による観察

1尾あたり *A. hydrophila*  $10^5$  CFU + *A. salmonicida*  $10^5$  CFU, *A. hydrophila*  $10^6$  CFU + *A. salmonicida*  $10^6$  CFU および *A. hydrophila*  $10^8$  CFU + *A. salmonicida*  $10^8$  CFU の3接種群においては、注射患部の真皮と体側筋組織に、吸収 Ah 抗血清に反応して蛍光を発する菌体 (*A. hydrophila*) が顕著に認められた。しかし、吸収 As 抗血清に反応して蛍光を発する菌体 (*A. salmonicida*) は認められなかった。

1尾あたり *A. hydrophila*  $10^5$  CFU + *A. salmonicida*  $10^7$  CFU 接種群においては、注射患部の真皮と体側筋組織に、吸収 Ah 抗血清に反応して蛍光を発する菌体 (*A. hydrophila*) が顕著に認められた。吸収 As 抗血清に反応して蛍光を発する菌体 (*A. salmonicida*) は体側筋組織に認められたが小数であった。

1尾あたり *A. hydrophila*  $10^4$  CFU + *A. salmonicida*  $10^8$  CFU 接種群においては、注射患部の真皮と体側筋組織に、吸収 Ah 抗血清に反応して蛍光を発する菌体 (*A. hydrophila*) が顕著に認められた (Fig. 3)。また、同部位には吸収 As 抗血清に反応して蛍光を発する菌体 (*A. salmonicida*) もかなり認められた (Fig. 4)。

## 考 察

本研究では *A. hydrophila* と *A. salmonicida* をコイに混合感染させた。両細菌はともにエロモナス属の細菌であり、それぞれの細菌を抗原として作成したウサギ抗血清は両者の細菌に共通の

抗体を含んでいた。今回、筆者らが行なった抗血清からの共通抗体の除去方法はそれぞれの抗血清からの共通抗体の除去に有効であることがわかった。そして、それぞれの吸収抗血清を用いた蛍光抗体法により、*A. hydrophila* と *A. salmonicida* を混合感染させた病患部において両細菌をそれぞれ識別することができた。このことから、混合感染が起こった病患部の組織標本において、抗血清を用いた蛍光抗体法はそれぞれの細菌の存在および病変との関係を解析するのに有効であることがわかった。

本研究では両細菌の接種菌量の差により蛍光抗体法の感度に差違が生じた。つまり、1尾あたり *A. hydrophila*  $10^4$  CFU + *A. salmonicida*  $10^8$  CFU 接種群のように *A. salmonicida* の接種菌量がきわめて多い群においてのみ *A. salmonicida* を確認できた。しかし、両細菌の接種菌量の差が少ない他の群では *A. salmonicida* を確認できなかった。これは、魚体内で *A. hydrophila* の増殖が優勢であり、そのため *A. salmonicida* の増殖が抑えられたことを示唆している。コイの自然発症の穴あき病では、病患部の形成は *A. hydrophila* と非定型 *A. salmonicida* の混合感染によると言われている (ELLIOTT and SHOTTS, 1980 a, b)。しかし、その病患部から *A. hydrophila* が優先的に分離されることも事実である (高橋ら, 1975 b)。本研究では非定型 *A. salmonicida* とは若干異なる定型 *A. salmonicida* を用いたが、その注射患部の病理組織標本では *A. salmonicida* よりも *A. hydrophila* の方が優先的であった。このことは *A. salmonicida* と *A. hydrophila* の混合感染の場合には、*A. hydrophila* の増殖が優先的であることを示唆している。コイの自然発症の穴あき病患部でも非定型 *A. salmonicida* と *A. hydrophila* は同様の関係にあると考えられ、今後、蛍光抗体法により両細菌の関係を解明したい。

## 文 献

- ELLIOTT, D.G. and E.B. SHOTTS, 1980 a. Aetiology of an ulcerative disease in goldfish, *Carassius auratus*(L) : Microbiological examination of diseased fish from seven locations. *J. Fish Dis.*, 3:133-143.
- ELLIOTT, D.G. and E.B. SHOTTS, 1980 b. Aetiology of an ulcerative disease in goldfish, *Carassius auratus*(L) : Experimental induction of the disease. *J. Fish Dis.*, 3:145-151.
- 宮崎照雄・江草周三, 1973. キンギョおよびフナのいわゆる穴あき病とエピスチリス着生コイについて. 魚病研究, 7: 115-124.
- 宮崎照雄・窪田三朗・江草周三, 1976 a. ニシキゴイの滑走細菌性穴あき病の病理組織学的研究 - 1. 感染病巣. 三重大水産研報, 3:49-58.
- 宮崎照雄・窪田三朗・江草周三, 1976 b. ——— II. 治癒段階の潰瘍病巣. 同誌, 3: 59-66.
- 宮崎照雄・窪田三朗・江草周三, 1976 c. ——— III. 内蔵諸器官. 同誌, 3: 67-73.
- 高橋耿之介・川奈俊男・中村多恵子, 1975 a: キンギョの穴あき病に関する研究 - I. 発病部位について. 魚病研究, 9: 174-178.
- 高橋耿之介・川奈俊男・中村多恵子, 1975 b: ——— VI. 病魚からの分離菌について. 魚病研究, 10: 22-30.

## Explanation of Plate I

- Fig. 1. An injected lesion with *A. hydrophila*  $10^8$  CFU + *A. salmonicida*  $10^8$  CFU. The lateral musculature showed marked bacterial multiplication, necrosis and hemorrhage. Giemsa, X320.
- Fig. 2. An injected lesion with *A. hydrophila*  $10^4$  CFU + *A. salmonicida*  $10^8$  CFU. The lateral musculature showed marked bacterial multiplication, necrosis, slight hemorrhage and infiltration of inflammatory cells. Giemsa, X320.
- Fig. 3. Staining with indirect fluorescent antibody technique used absorbed anti-*A. hydrophila* serum on the section shown in Fig. 2 displayed marked fluorescent reactions in the necrotic musculature. This figure demonstrated bacterial cells of *A. hydrophila*. X200.
- Fig. 4. Staining with indirect fluorescent antibody technique used absorbed anti-*A. salmonicida* serum on the section shown in Fig. 2 displayed fluorescent reactions in the necrotic musculature. This figure demonstrated bacterial cells of *A. salmonicida*. X200.

