

在来マスのBKD垂直伝播防止に関する研究—I 採卵期アマゴ親魚からのBKD病原菌の検出

小原 昌和

The study on the vertical transmission of Bacterial Kidney Disease in Japanese salmon. — I

Detection of Bacterial Kidney Disease causative agent from reared AMAGO salmon bloodstock in the spawning season

Masakazu Kohara

細菌性腎臓病（以下BKDと記す）は、1985年頃から長野県下の在来マス類養魚場に蔓延してきている。在来マス類に発生する細菌病では、せつそう病とともに被害をもたらす重要な病気であり、防除技術の開発が望まれる。

診断法については、共同凝集試験¹⁾が開発され、養殖現場においても確定診断が可能となったほか、研究室段階での診断には蛍光抗体法²⁾が多く利用されるなど技術の向上が図られた。しかし、治療及び予防対策面では具体的な技術が開発されていない。特にBKDについては、病原菌の卵内感染による垂直伝播の問題があり、防除対策の開発を妨げている。

一方、アメリカでは、親魚、卵及び稚魚を対象にエリスロマイシンを投与する防除対策が試みられている²⁾。この対策をわが国のBKD防除対策に応用するにあたり、親魚及び卵の汚染状況を把握する必要があるため、本県で主要な養殖魚種であるアマゴを対象に、採卵期における親魚のBKD病原菌の保菌状況を調査した。

材料及び方法

供試魚群

1991年及び1992年において、BKDに汚染された木曾郡内の民間養魚場のアマゴ親魚群を対象に、採卵期におけるBKD保菌検査を行った。

この養魚場では、山間部の河川水を利用してアマゴを養殖しており、ここより上流側に養魚場はない。これまでIHN、せつそう病及びBKDの発生はなかったが、1989年に初めてBKDの発生が確認されてからは毎年春から夏にかけてBKDが流行し、被害が出ている。

1991年には、それまでこの養魚場で飼育されていた1800尾の親魚群（1+年魚）の中から9月10日に供試群として200尾（魚体重216.6～389.1g）を無作為に抽出し、採卵期の検査時までFRP水槽（1×3×0.8m）で飼育した。期間中の水温は9.0～17.5℃であった。なお、本群では4月にBKDが発生し、5月には多い日で1日10～20尾程度の死亡魚が観察され、激しい流行が見られたが、6月には多くて1日に数尾程度、7月には1日に1～2尾まで死亡数が減少し、8月にはほとんど死亡魚が見られなくなった。

1992年においても、9月3日に2450尾の親魚群（1+年魚）から200尾（魚体重257.6～533.0g）を抽出し、採卵期の検査時までFRP水槽（1×3×0.8m）で飼育した。期間中の水温は10.7～18.5℃であった。本群では、6月初旬にBKDが発生し、6及び7月においては1日に1～7尾程度の死亡が散見され、8月には毎日1～5尾の死亡を伴う流行がみられた。

保菌魚の検査

1991年においては、10月16日に供試群から60尾（雌55尾、雄5尾）を、また1992年には10月20日に供試群から35尾（雌28尾、雄7尾）の成熟魚を採取し、検査を行った。

検査の手順としては、まず魚体腹部を切開して腎臓を露出させた後、BKD発病魚で典型的に認められる白色の隆起した結節様病変の有無を観察した。そして、滅菌綿棒を使用して腎臓の塗抹標本を作製し、間接蛍光抗体法により病原菌の有無を検査した。

さらに、滅菌綿棒により雌の体腔液及び雄の精液を採取

して塗沫標本を作製し、間接蛍光抗体法に供した。

間接蛍光抗体法 (I F A T)

間接蛍光抗体法 (以下蛍光抗体法と記す) の操作手順及び判定方法については、木村ら²⁾に従った。

使用した血清材料は、水産庁魚病診断液配布事業により (社) 日本水産資源保護協会から配布を受けた抗BKDウサギ血清と、FITC 標識ウサギ Ig G ブタ血清 (和光純薬社製) である。

表1 採卵期のアマゴ親魚群における BKD 保菌魚の検出

検査年	検査親魚数	腎臓所見	F A T		
			腎 臓	生殖液	
				体腔液	精 液
1991 年	60	0/60 (0.0)	7/60 (11.7)	1/55 (1.8)	0/5 (0.0)
1992 年	35	0/35 (0.0)	7/35 (20.0)	3/28 (10.7)	0/7 (0.0)

* () 内の数値は、百分率を示す。

*腎臓所見は、BKDに定型的な結節様病変の有無を示す。

結 果

BKD保菌親魚の検出

1991 年におけるアマゴ親魚の保菌検査結果を表 1 に、1992 年の結果を表 2 に示した。

1991 年では、腎臓の検査で 60 尾中 7 尾 (11.7%) の保菌魚を検出した。このうち、雌が 6 尾、雄が 1 尾であった。生殖液での検出率は腎臓の場合よりも低くなり、1 尾の雌の体腔液から検出したが、雄の精液からは検出できなかった。この 1 尾は、腎臓で保菌が認められた個体であった。なお、保菌魚の腎臓に定型的な病変所見は認められなかった。

1992 年では、腎臓の検査で 35 尾中 7 尾 (20.0%) の保菌魚を検出した。これらはすべて雌であった。生殖液から

の検出率は腎臓の場合よりも低くなり、3 尾の保菌魚を検出した。この 3 尾は、腎臓で保菌が認められた雌親魚であり、雄の精液からは検出できなかった。なお、保菌魚の腎臓に定型的な病変所見は認められなかった。

腎臓及び体腔液からの BKD 菌検出状況

1991 年及び 1992 年に検出した 13 尾の雌保菌親魚について、木村ら²⁾ が示す蛍光抗体法の判定階級に従って、同一親魚の腎臓と体腔液における菌の検出程度を表 3 に示した。

腎臓及び体腔液における保菌程度は+から+++階級までであった。体腔液で保菌がみられた 4 個体の腎臓における判定はすべて+++階級であり、腎臓の判定が++階級以下であった 10 個体の体腔液中から菌は検出できなかった。

表2 雌親魚の腎臓及び体腔液における階級別のBKD菌検出尾数

検査材料	判定階級	体 腔 液			
		+++	++	+	-
腎 臓	+++	3		1	2
	++				1
	+				6
	-				70

*判定階級 +++ : 各 1 視野中に 10 菌体以上

++ : 各 1 視野中に 1~10 菌体

+ : 100 視野中に 2~10 菌体

考 察

BKDの卵内感染については、Evelyn et al³⁾が培養法により卵内に病原菌が存在することを明らかにし、重度に汚染された体腔液から卵内感染が起きるとしている⁴⁾。さらにLee and Evelyn⁵⁾は、BKD病原菌を接種した体腔液に暴露させたマスノスケ卵で卵内感染が起こり、発病につながると報告している。また、兵藤ら⁶⁾はエリスロマイシンを投与したヤマメ親魚の卵内から菌が検出されなかった原因は、エリスロマイシンの投与により腎臓及び体腔液の菌濃度が低かったことであると述べている。これまでに病原菌が卵内に侵入する機序について明らかになっていないが、卵内感染が体腔液の汚染と関連していると考えられる。そして、汚染された体腔液が混入した状態での受精や吸水時に病原菌が進入していることが疑われる。

本研究でも、採卵期のアマゴ親魚の体腔液が病原菌に汚染されていることが明らかになった。しかも、体腔液から菌が検出された親魚は腎臓における保菌率が高い個体であり、腎臓における保菌が進んだ個体ほど体腔液の汚染が進むのではないかと考える。

よって、採卵期前の親魚へエリスロマイシンなどの抗菌剤を投与することにより親魚の感染発病を抑制し、体腔液の汚染を防止することがBKDの垂直伝播の機会を減らすことにつながるものと考えられる。また、親魚投薬と併せて、汚染卵を未受精の段階で洗浄及び消毒する方法についても今後検討する必要がある。

要 約

- 1 在来マスのBKD垂直伝播防止対策を検討するために、採卵期のアマゴ親魚群における保菌率及び体腔液の汚染を調べた。
- 2 BKDに汚染された養魚場では、採卵期のアマゴ親魚群内で11.7～20.0%の保菌親魚を検出した。
- 3 雌親魚の内で1.8～10.7%の個体の体腔液から病原菌を検出したが、雄精液からは検出しなかった。
- 4 体腔液から菌が検出された親魚は腎臓における保菌率が高い個体であり、腎臓における保菌が進んだ個体ほど体腔液の汚染が進むのではないかと考える。

参考文献

- 1) 木村喬久, 吉水 守: 特異抗体感作 *staphylococci* を用いた *co agglutination test* によるサケ科魚類の細菌性腎臓病 (BKD) の迅速診断法について. 日本誌, 47, 1173-1183 (1981).
- 2) 木村喬久, 吉水守, 原武史: サケ科魚類の細菌性腎臓病 (BKD) の診断技法. 水産増養殖叢書 35, 日本水産資源保護協会, 東京, 1987, pp. 26-47.
- 3) Evelyn, T. P. T., Ketcheson, J. E., and Prospero-Porta, L.: Further evidence for the presence of *Renibacterium salmoninarum* in salmonid eggs and for the failure of popidone-iodine to reduce the intra-ovum infection rate in water-hardened eggs. *J. Fish Disease*, 7, 173-182 (1984).
- 4) Evelyn, T. P. T., Prospero-Porta, L. and Ketcheson, J. E.: Experimental intra-ovum infection of salmonid eggs with *Renibacterium salmoninarum* and vertical transmission of the pathogen with such eggs despite their treatment with erythromycin. *Dis. Aquat. Org.*, 1, 197-202 (1986).
- 5) Lee, E. G. H. and Evelyn, T. P. T.: Effect of *Renibacterium salmoninarum* levers in the ovarian fluid of spawning Chinook salmon on the prevalence of the pathogen in their eggs and progeny. *Dis. Aquat. Org.* vol. 7 179-184 (1989).
- 6) 兵藤則行, 山田和雄, 野上康宏, 鈴木惇悦, 吉水 守: 細菌性腎臓病 (BKD) の防疫に関する研究-I, 垂直感染防除を目的としたエリスロマイシン注射時期の検討. 新潟内水試研報 No21, pp. 33-38 (1995).

1) 木村喬久, 吉水 守: 特異抗体感作 *staphylococci* を用いた *co agglutination test* によるサケ科魚類の細