

冷水病原菌 *Flavobacterium psychrophilum*
の検出と型別に関する研究

泉 庄太郎

博士論文

冷水病原菌 *Flavobacterium psychrophilum*
の検出と型別に関する研究

東京大学農学生命科学研究科水圏生物科学専攻

泉 庄太郎

目次

序章		1-5
第1章	PCRを用いた <i>Flavobacterium psychrophilum</i> の検出法の確立	6-24
	序論	7
	材料と方法	9
	結果及び考察	14
	図、表	17
第2章	琵琶湖産アユと輸入ギンザケ卵からのPCRを用いた <i>Flavobacterium psychrophilum</i> の検出	25-41
	序論	26
	材料と方法	28
	結果及び考察	30
	図、表	33
第3章	血清型による <i>Flavobacterium psychrophilum</i> の型別	42-53
	序論	43
	材料と方法	44
	結果及び考察	46
	図、表	48

第4章	<i>gyrB</i> を標的としたPCR-RFLPによる <i>Flavobacterium psychrophilum</i> の型別	54-71
	序論	55
	材料と方法	56
	結果及び考察	59
	図、表	61
第5章	プラスミドプロファイルによる <i>Flavobacterium psychrophilum</i> の型別	72-90
	序論	73
	材料と方法	74
	結果及び考察	78
	図、表	81
終章	総合考察	91-101
	総合考察	92
	図、表	97
	謝辞	102
	引用文献	103-110

序章

冷水病 (BCWD, Bacterial Cold-Water Disease) は同意語として低温病 (Low Temperature Disease) なども知られる細菌性のサケ科魚類の病気である。その名の通り、低水温下の養殖場で発生し、産業的に甚大な被害をもたらすことで知られている。原因菌は、グラム陰性の長桿菌、*Flavobacterium psychrophilum* である。

本原因菌は1948年、Borgによって北米のギンザケ (Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*) から最初に分離され、1960年、同人によって *Cytophaga psychrophila* と命名された。その後、*Flexibacter psychrophilus* と改名され、さらに、同年、Reichebachによって *Cytophaga psychrophila* と再改名されたが、1996年、BernardetらのDNA-DNAハイブリダイゼーション、RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 等を用いた分子生物学的分類により *Flavobacterium psychrophilum* と改名され現在に至っている (Borg 1960, Bernardet and Grimont 1989, Reichebach 1989, Bernardet *et al.* 1996)。

Flavobacterium psychrophilum の地理的分布としては、アメリカ合衆国、カナダなどの北米とフランス、デンマーク、ドイツなどヨーロッパ各国で知られていたが、現在では、日本、南米、オーストラリア、韓国などでも報告されている (Davis 1946 cited by Holt *et al.* 1993, Bernardet *et al.* 1988, Wakabayashi *et al.* 1991, Schmidtke and Carson 1995, Lee and Heo 1998)。

宿主範囲はすべてのサケ科魚類に及ぶと考えられている。ギンザケ幼魚は特に感受性が高く、マスノスケ (Chinook Salmon, *O. tshawytscha*)、ベニザケ (Sockeye Salmon, *O. nerka*)、サケ (Chum Salmon, *O. keta*)、カットスロウトトラウト (Cutthroat Trout, *O. clarki*)、カワマス (Brook Trout, *Salvelinus fontinalis*)、ブラウントラウト (Brown Trout, *Salmo trutta*)、タイセイヨウサケ (Atlantic Salmon, *S. salar*) も感染することが知られている。また、1980年頃からヨーロッパのニジマス (Rainbow Trout, *O. mykiss*) 孵化場で甚大な被害を出しているRTFS (Rainbow Trout Fry Syndrome) も *F. psychrophilum* を原因菌とする病気である (Bernardet *et al.* 1988, Lumsden *et al.* 1996)。現在では広くサケ科魚類以外にも感染することが知られており、コイ (Carp, *Cyprinus carpio*)、テンチ (Tench, *Tinca tinca*)、ヨーロッパウナギ (European eel, *Anguilla anguilla*)

la), アユ (*Ayu, Plecoglossus altivelis*), オイカワ (*Oikawa, Zacco platypus*) などの分離報告がある (Kent *et al.* 1989, Lehmann *et al.* 1991, Dalsgaard 1993, Wakabayashi *et al.* 1992, Iida and Mizokami 1996)。

本疾病は通常水温が12℃かそれ以下の時に発生する。主に幼魚が発病し、原因菌は外部病巣からも内臓からも分離される。症状は、孵化稚魚では卵黄囊の腹側表面が侵され、それが破れ内容物が漏出する。本病の急性疾患の幼魚では、尾柄部が暗色となり、全く外部病巣が出現することなく斃死する。しかし、一般的には皮膚病巣が形成され、同意語として尾柄病 (Peduncle Disease) も知られる様に、はじめは尾柄部に認められることが多いが、胴、頭部にも出現する (Fig. 1)。病巣は発達し、皮下組織は広範囲に侵される。もしその魚が十分に生きながらえた場合、尾鰭を失い、結局は尾柄の脊柱が露出してしまふ。本病の慢性型では、脊柱前彎症や側彎症を呈する。これらの主に外部的病変を提示する場合を冷水病 (CWD, Cold Water Disease) と呼び、一方、肝臓の壊死、脾臓の肥大、鰓の壊死、眼球突出、貧血等の主に内臓の病変が認められる時、VCWD (Visceral form of Cold Water Disease) と呼ばれることもある (Obach 1991)。またRTFSも、内臓疾患性の症状が特徴的であることが知られている (Lorenzen *et al.* 1997)。

冷水病の診断方法は、これまで推定診断には症状によるもの、確定診断には寒天平板を用いた病原体の分離の後、抗血清を用いた分離菌株の血清学的あるいは生化学的同定を行うものが一般的であった。また、吸収抗血清を用いた蛍光抗体法による簡便な診断法が報告されているが (Lorenzen and Karas 1992)、吸収抗血清の準備や、非特異反応による診断の難しさといった理由で現場で用いることを考えた場合には不便が残る。また、不顕性感染魚からの保菌検出についてはいまだ有効な方法は報告されていない。

現在、日本における冷水病の地理的分布は沖縄県を除くほぼ全国的なものとなっているが、被害は養殖場にとどまらず、天然の河川や湖にまで広がっている。また、その産業的な被害の大きさ、地域的、宿主域的な広がりによって、日本におけるもっとも深刻な細菌性魚類疾病の一つであるといえる。冷水病発生の最初の報告は、1987年、徳島県下の養殖アユで報告されたもので、つい

で、宮城県のギンザケ養殖場での発生が報告された (Wakabayashi *et al.* 1992, Wakabayashi *et al.* 1991)。その後ニジマス、オイカワなどにその宿主域を広げており (Iida and Mizokami 1996)、その中でもアユ養殖における被害がもっとも深刻なものとなっている。外来種であるギンザケやニジマスと異なり、アユは日本在来種であること、欧米では古くから知られているが日本では比較的新しい病気であることを考えると、日本における冷水病の由来は外来種とともに持ち込まれたものが起源であることが懸念されるが、このことに関する疫学的追跡調査や研究はほとんどなされていない。

そこで、本研究では、分子生物学的手法を応用して、不顕性感染魚の保菌検査法を確立し、それを利用して特に被害の大きいアユにおける *F. psychrophilum* の保菌状態を調査した。また、その由来を探るべく種々の方法を用いて型別を行った。

第1章では、PCR (Polymerase Chain Reaction) による *F. psychrophilum* の簡易検出法の確立を目指した。第2章では、PCRによる簡易検出法を用いて、琵琶湖産種苗アユからの *F. psychrophilum* の検出を行い、実際の保菌状況を把握することにした。また、同検出法を応用し、輸入ギンザケ卵からの *F. psychrophilum* の検出も試みた。第3章以降では、日本における *F. psychrophilum* の伝搬経路の動物疫学的追跡調査のために、様々な方法で種内型別を行うことにした。第3章では血清型による *F. psychrophilum* の型別を、第4章ではPCR-RFLPによる *F. psychrophilum* の型別を、そして第5章ではプラスミドプロファイルによる *F. psychrophilum* の型別を試みた。



Fig.1. Ayu(*Plecoglossus altivelis*) showing BCWD symptoms

Arrows show typical disease sign; darken peduncle.

第1章

PCRを用いた冷水病原菌 (*Flavobacterium psychrophilum*) の検出法の確立

序論

冷水病は、日本におけるもっとも重要な細菌性魚類疾病の一つであり、とくにアユ養殖における被害がもっとも深刻なものとなっている。しかし、冷水病に対するワクチン等の予防手段はまだ確立されておらず、その発生による大量斃死を防ぐ手段としては発病前に、投薬、加温等の適切な処置をとることが必要である。その処置の時期は発病前の保菌状態の時が最も有効であることは当然である。これまで、冷水病発病魚からの検出には内蔵組織のスタンプ標本を用いた間接蛍光抗体法による診断法も報告されているが、保菌状態の魚に対しては、寒天平板を用いた原因菌の単離を行い、スライド凝集反応や間接蛍光抗体法による血清学的検査、あるいは生化学的な検査によるものしかなかった (Lorenzen and Karas 1992, Evensen and Lorenzen 1996, 1997)。しかし、*F. psychrophilum*は増殖が遅い菌で、また多くの生化学的試験に対する反応性が低く、その判定に要する時間や信頼性といった点で、これらの方法が養殖現場における有効な手段であるとは言えない。

そこで本章では、PCR (Polymerase Chain Reaction) による正確、迅速、高感度の冷水病菌検出法の確立を目的とした (Saiki *et al.* 1988)。PCR法は遺伝子工学におけるクローニング操作、分子生物学におけるDNA鑑定、医学生物学における臨床診断や法医学鑑定などに盛んに用いられている方法である (Steffan and Atlas 1988, Kolk *et al.* 1992, Wang *et al.* 1993, Boondeekhun *et al.* 1993, Erb and Wagner-Dobler 1993, Hykin *et al.* 1994, Minsavage *et al.* 1994)。*Thermus aquaticus* (Taq) 等の熱安定性DNA polymerase、プローブ等を使用し、denature、annealing、extensionの各ステップを20～30サイクルを繰り返すことにより目的とする (本研究では*F. psychrophilum*の) 極少量のDNA断片を可視レベルまで増幅する技術で、現在、このPCRによる病原菌検出は様々な魚類病原微生物に対して開発されている (Cousin *et al.* 1993, Leon *et al.* 1994, Toyama *et al.* 1994, 1996, Brown *et al.* 1994, 1995, Argenton *et al.* 1996, Nishizawa *et al.* 1994, Aoki *et al.* 1997, Izumi and Wakabayashi 1997)。迅速性を求めるには、従来の検出法では必要不可欠ではあるが、最も時間のかかるサンプルからの菌の分離培

養の段階をなくし、組織等から直接検出することが望まれる。そこで、本研究ではアユから無菌的に分離した腎臓組織に人為的に冷水病菌を接種し、この疑似感染組織をサンプルとして従来の寒天平板法、蛍光抗体法との検出感度の比較を行い、PCRによる不顕性感染魚からの*F. psychrophilum*の検出の可能性について検討した。また、これに先立ち予備的段階として純培養菌液を使用し、PCRによる*F. psychrophilum*の検出の最適条件を求めることを行った。

材料と方法

細菌

F. psychrophilum NCIMB1947¹株 (冷水病原菌標準株) を一昼夜TYE液体培地 (トリプトン 0.4%、酵母エキス 0.05%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、pH 7.2; Fujihara and Nakatani 1971) で振盪培養し、3500 rpm、30分遠心分離し回収したものを滅菌蒸留水に約30 mg/mlとなるように懸濁し、ミスラ法*で菌数を測定した (約 $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml)。この菌液は、-80℃で保存した。以下に述べる各DNA抽出法を行うに際し、この菌液を滅菌蒸留水で10倍毎に段階希釈しサンプルとして使用した。

*ミスラ法 (Miles & Misra法)

医学細菌の分野で簡易菌数計算法としてよく用いられる方法で、その実際は以下の通り。

- 1) 試験する培地は平板培地とし、表面をよく乾燥させる。
- 2) 試験菌株を液体培地に培養、あるいは懸濁して所定の濁度に調製する。
- 3) それを滅菌生理食塩液で連続希釈し、7段階の10倍希釈系列の菌液を作製する。
- 4) マイクロピペット等で各希釈の菌液を25 μL ずつ試験する培地表面に滴下する。通常、培地の中心とその周囲に均等に6ヵ所、計7ヵ所に滴下接種する。
- 5) 接種菌液が完全に培地に吸収したのち所定の条件で培養し、接種した試験菌の発育の状態を判定を行う。

アユ

アユは、滋賀県水産試験場の協力により、琵琶湖産養殖用の稚アユを供試した。無菌的に解剖、腎臓を分離され、STEバッファー (100 mM NaCl, 100 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl) とともに手動ガラスホモジナイザーでホモジナイズ (約20% W/V) した。このホモジネートも-80℃で保存した。

DNAの抽出法

(1) Proteinase K を用いた抽出法

サンプル80 μL 、2×Kバッファー (40 mM Tris-HCl, 0.2% Nonidet P40, 0.2

mM EDTA、1% Tween20) 100 μ l、Proteinase K溶液 (1mg/ml, SIGMA P2308) 20 μ lを混合し、55℃で1時間、100℃で10分インキュベートしたものを抽出DNAとし、PCRテンプレートとして使用した (Hiraishi 1992, 1994)。抽出DNAは4℃で保存した。疑似感染サンプルからの検出のときはサンプルとして上記のアユ腎臓ホモジネート10 μ lと希釈菌液70 μ lを混合したものを使用した。

(2)フェノール/クロロフォルム法

Proteinase Kを用いた抽出法で得られた抽出DNA 200 μ lに当量のフェノール/クロロフォルム/イソアミルアルコール (25/24/1、pH 8.0)を加え、激しく振盪した後15000 rpm、4℃で5分間遠心分離し、上清を分離し、さらに、その上清に当量のフェノール/クロロフォルム/イソアミルアルコールを加え、激しく振盪した後15000 rpm、4℃で5分間遠心分離した。そして上清を分離し、その上清に当量のクロロフォルムを加え、激しく振盪した後15000 rpm、4℃で5分間遠心分離、その上清に3倍量の100%エタノールと1/10倍量の3M CH_3COONa を加え15000 rpm、30分遠心分離し、DNAを遠沈させ、上清を捨て、70%エタノールを前述の100%エタノールと同量加え、15000 rpm、30分遠心分離し、DNAを遠沈させ、上清を廃棄した。その後、沈渣を真空乾燥し、TEバッファー (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) 200 μ lに懸濁したものを抽出DNAとし、PCRテンプレートとして使用した。抽出DNAは4℃で保存した。

(3)Chelex100を用いた方法

サンプル100 μ l、滅菌蒸留水900 μ lを混合し、室温で20分放置した後、15000 rpm、4℃で10分遠心分離し、上清を取り除いた。その後、5% Chelex 100 (SIGMA Cat. # C-7901) 溶液を300 μ lを加え、56℃で30分インキュベートし、約10秒激しく攪拌し、さらに100℃で20分インキュベートし、15000 rpm、4℃で10分遠心分離した上清を抽出DNAとし、PCRテンプレートとして使用した。抽出DNAは4℃で保存した (Walsh *et al.* 1991, Crouse *et al.* 1993, 1995, Lambllerie *et al.* 1992, Vignoli *et al.* 1995)。疑似感染サンプルからの検出のとき

はサンプルとして上記のホモジネート10 μ lと希釈菌液90 μ lを混合したものを使用した。

蛍光抗体法

蛍光抗体法には間接蛍光抗体法 (IFAT, Indirect Fluorescent Antibody Technique) を用いた。ホモジネート10 μ lと希釈菌液90 μ lを混合し、3500 rpm、30分遠心分離後、上清90 μ lを廃棄した。沈渣10 μ lを血液塗沫標本をつくる方法と同様の方法で無蛍光スライドガラスに約10 cm²の広さで塗沫、乾燥した後、アセトンで10分間固定した。抗*F. psychrophilum* NCIMB1947^T家兎血清 (抗体価1024のものをPBSで10倍希釈) 40 μ lをマウントし37℃、30分インキュベート、PBS (-) で3回洗浄し乾燥、FITC標識プロテインA (20 μ g/ml) 40 μ lをマウントし、37℃、30分インキュベートし、PBS (-) で3回洗浄したものを最後に滅菌蒸留水で1回洗浄し乾燥させ、蛍光顕微鏡で観察した (Lee and Gordon 1987)。FITC特有の蛍光を発している標的は、同標的を位相差顕微鏡で観察し、菌体であるかどうかを確認した。菌体であることを確認できた標本は陽性と判定し、菌体ではなく非特異蛍光を呈すもの、または蛍光のないものは陰性とした。

寒天平板培養法

ホモジネート10 μ lと希釈菌液90 μ lを混合し、3500 rpm、30分遠心分離し上清90 μ lを廃棄し、沈渣10 μ lをTYE寒天平板 (トリプトン0.4%、酵母エキス0.05%、CaCl₂ · 2H₂O 0.02%、MgSO₄ · 7H₂O 0.05%、pH 7.2、寒天1.5%) 上に画線塗沫、18℃でインキュベートした。24、48、96時間経過後にコロニーを観察し、黄橙色を呈したコロニーを分離培養し、抗*F. psychrophilum* NCIMB 1947^T家兎血清を用いたスライド凝集試験、および蛍光抗体試験を行い、冷水病原菌であることを確認した。

PCR条件

(1) 使用機器, 試薬及び電気泳動条件

PCR, nested PCRの反応液にはTaKaRa *Taq* (TaKaRa Cat. # R001) を、RT-PCRの反応液にはGene Amp *rTth* DNA Polymerase with Buffer Pack (Perkin Elmer Cat. # N808-0098) を用いた。サーマルサイクラーは、Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer Cat. # N803-0003) を使用した。すべてのPCR産物は、1%アガロース1600ゲル (Wako Cat. # 017-09531) 電気泳動により、目的DNA断片の増幅の有無を確認した。PCR産物10 μ l, tracking dye 3 μ l (2% SDS, 25% Ficoll, 0.125% bromo pHenol blue, 40 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7.5) を混合したものを電気泳動の試料とし、TAEバッファー (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) を電解液として100 V, 40分間泳動した。泳動槽にはMupidミニゲル泳動槽 (Advance社製) を使用した。その後、臭化エチジウム溶液で染色し、水道水で軽く洗浄した後、302 nmの紫外線下で泳動パターンを写真に撮った。マーカーとしてpHYマーカー (TaKaRa Cat. # 3404A) を使用した。プライマーの塩基配列は、PSY1が、5'-GTTGGCATCAACACACT-3', PSY2が、5'-CGATCCTACTTGCCTAG-3', 20Fが、5'-AGAGTTTGATC (AC) TGGCTCAG-3', 1500Rが、5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3', であり、それぞれ*Eschechia coli*の16S rRNA遺伝子で190から206、1278から1262、8から27、1510から1492のポジションに位置した (Toyama *et al.* 1994, Weisburg *et al.* 1991)。

(2) 通常のPCR

反応液の組成は、*Taq* DNA polymerase (5 U/ μ l) 0.25 μ l、10 \times buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 5 μ l, dNTP mixture (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 各2.5 mM) 5 μ l, primer PSY1 (10 pmol/ μ l), primer PSY2 (10 pmol/ μ l) 各々5 μ l, テンプレート10 μ l, 滅菌蒸留水19.75 μ lの計50 μ lとした。実際に反応液をPCRチューブに分注するときには、作業効率の向上と試薬注入操作の増加によるコンタミネーションの危険減少のため、あらかじめ*Taq*, 10 \times buffer, dNTP mixtureを上記とおなじ比率で混合したMaster

mixtureとprimer PSY1、primer PSY2を混合したPSY primer pair溶液を作製して、Master mixture 10.25 μ l、PSY primer pair 10 μ l、テンプレート 10 μ l、滅菌蒸留水19.75 μ lを分注した。

PCR反応条件は、denaturation 94 $^{\circ}$ C、30秒、annealing 51 $^{\circ}$ C、90秒、extension 72 $^{\circ}$ C、2分を30サイクル、さらにfirst denaturation 94 $^{\circ}$ C、5分、last extension 72 $^{\circ}$ C、5分とした。

(3) nested PCR

第1段階のPCRには20F、1500Rの真正細菌にユニバーサルなプライマーペアを用い、第2段階のPCRにはPSY1、PSY2の*F. psychrophilum*に特異的なプライマーペアを用いた。

反応液の組成およびPCR反応条件は、上記の通常のPCRと同様とした。ただし第2段階のPCRのテンプレートとして、第1段階のPCRで得られたPCR産物をTEバッファーで2%に希釈したものを使用した (Wiedmann *et al.* 1993)。

(4) RT-PCR

逆転写の反応液の組成は*rTth* DNA polymerase (2.5 U/ μ l) 2 μ l、10 \times *rTth* Reverse Transcriptase Buffer (100 mM Tris-HCl, 900 mM KCl) 2 μ l、dNTP mixture (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 各2.5 mM) 6.4 μ l、primer PSY2 (10 pmol/ μ l) 1.5 μ l、10 mM MnCl₂ 2 μ l、テンプレート6.1 μ l、の計20 μ lとした。逆転写反応の条件は、51 $^{\circ}$ C、1分30秒、70 $^{\circ}$ C、5分、とした。

逆転写で得られたcDNAをテンプレートとしたPCR反応の反応液の組成は、10 \times Chelating buffer (50% glycerol, 100 mM Tris-HCl, 1 M KCl, 0.5% Tween20, 7.5 mM EGTA) 8 μ l、25 mM MgCl₂ 8 μ l、primer PSY1 (10 pmol/ μ l) 1.5 μ l、滅菌蒸留水62.5 μ l、上記の逆転写反応を終えた反応液20 μ lの計100 μ lとした。PCR反応条件は、denaturation 94 $^{\circ}$ C、30秒、annealing 51 $^{\circ}$ C、90秒、extension 70 $^{\circ}$ C、2分を30サイクル、last extension 70 $^{\circ}$ C、5分とした (Myers and Gelfand 1991)。

結果及び考察

純培養菌液を使用し各DNA抽出法、各PCR法を用いて検出感度を求めた結果は以下の通りである。Proteinase K を用いた抽出法を使用し作製したテンプレートを用い、通常のPCR、nested PCR、RT-PCRを行った場合の検出感度は、PCR反応チューブあたりそれぞれ 2.16×10^3 CFU、2.16 CFU、 8.25×10^3 CFUであった。Chelex100を用いた方法で作製したテンプレートを用い、通常のPCR、nested PCR、RT-PCRを行った場合の検出感度は、PCR反応チューブあたりそれぞれ 1.14×10^3 CFU、1.14 CFU、 4.13×10^3 CFUであった。フェノール/クロロフォルム法で作製したテンプレートを用い、通常のPCR、nested PCR、RT-PCRを行った場合の検出感度は、PCR反応チューブあたりそれぞれ 6.60×10^3 CFU、6.60 CFU、 6.60×10^3 CFUであった (Fig. 1-Ja-c, Table 1-1)。

以上の結果から、純培養菌体をサンプルとした各DNA抽出法、各PCRによる検出感度は、Chelex100を用いた方法でDNA抽出しnested PCRで増幅した抽出法が1.14 CFU/tubeともっとも高感度であったが、各々のPCRにおいて、抽出法の違いによる検出感度に大きな差はなく、いずれの方法においても高い感度で目的DNA断片の増幅が確認された。抽出法の違いによる検出感度に大きな差がなかった理由として、純培養菌体を滅菌蒸留水に懸濁したものをサンプルとして使用したので、サンプル中のPCR阻害物質が少なかったことも考えられた。一方、サンプルの処理に目を向けると、DNAの抽出については、Proteinase K を用いた抽出法とChelex 100を用いた方法は、1検体について1種類の試薬とチューブ1本しか使用しないのに対し、フェノール/クロロフォルム法では、多くの試薬とチューブを使用し、処理が煩雑で、所要時間も長く、有機溶媒を使用するといった多くのデメリットがあった。また、その煩雑な処理の段階で、試薬やサンプルの汚染による結果の不正確さも危惧された。また、PCR条件については、nested PCRは通常のPCRの倍の操作、時間、試薬を必要とし、RT-PCRは逆転写反応の後に試薬をさらに加える段階が入り、また試薬の価格も高価であった。これらのことから、特に現場においてサンプルから分離培養した菌株をPCRによって同定する際には、DNA抽出において、Proteinase

KかChelex100を用い、PCRにおいて通常のPCRを用いる方法が最適であると思われた。

なお、通常のPCR、nested PCRの条件は、当初、遠山らの条件 (denaturation 94℃、120秒、annealing 45℃、90秒、extension 72℃、120秒を30サイクル、first denaturation 94℃、120秒、last extension 72℃、120秒) に従ったが、使用した機器、試薬等が異なったので、より最適な増幅条件を求め、上記の条件とした。同条件は、第2章で行う実験にも適用した(Toyama *et al.* 1994)。

疑似感染組織を使用し各DNA抽出法、各PCR法を用いて検出感度を求めた結果は以下の通りである。

Proteinase Kを用いた抽出法を使用し作製したテンプレートを用い、通常のPCR、nested PCR、RT-PCRを行った場合の検出感度は、PCR反応チューブあたりそれぞれ 1.94×10^3 CFU、 7.00×10^3 CFU、 1.94×10^4 CFUであった。Chelex100を用いた方法で作製したテンプレートを用い、通常のPCR、nested-PCR、RT-PCRを行った場合の検出感度は、PCR反応チューブあたりそれぞれ 1.50×10^2 CFU、 1.50 CFU、 3.86×10^2 CFUであった。フェノール/クロロフォルム法で作製したテンプレートを用い、通常のPCR、nested-PCR、RT-PCRを行った場合の検出感度は、PCR反応チューブあたりそれぞれ 5.78×10^3 CFU、 5.78 CFU、 5.78×10^2 CFUであった (Fig. 1-2a-c, Table 1-2)。 *F. psychrophilum* に特有なバンド以外にそれより分子量の小さいバンドが認められることもあったが、これらは明らかに分子量が異なるので、PCRによる検出での判定の妨げにはならないと考えられた。寒天平板培養法の検出限界は 4.38×10^3 CFU/10 μ lホモジネートでこれはChelex100でDNA抽出した際の検出感度では 1.48×10^4 CFU/tubeに相当し、蛍光抗体法の検出限界は 1.49×10^3 CFU/10 μ lホモジネートでこれはChelex100でDNA抽出した際の検出感度では 5.05×10 CFU/tubeに相当した。寒天平板培養法においては、少なくとも十万個体以上の生菌を塗抹しないと検出が確認できないという結果であった。この生菌数は、ミスラ法で計数する際、寒天平板上で増殖できる菌数である、ということを見ると、検出に際し寒天上に一緒に塗抹したアユの腎臓組織中、あるいはSTEバッファーが菌の増殖を阻害することも考えられた。また蛍光抗体法については、今回使用

した蛍光抗体法が間接法であることも一因であると思われる非特異反応も見られ、またサンプル固定及び染色の際に菌体の変形しやすいらしく、位相差顕微鏡で観察してもはっきりと菌形を示している、といえないものも多く見られた (Fig. 1-3,4)。

よって、寒天平板培養法や、蛍光抗体法に比べても、Chelex100でDNA抽出しnested PCRを用いた検出法が1.50 CFU/tube と、もっとも高感度であった。また、その操作においても迅速で、結果の判定も容易であり、非特異反応もないことから、現場においても有用な方法であると思われた。

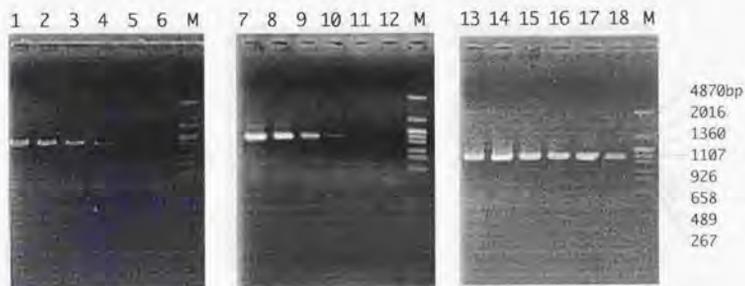


Fig. 1-1a. Agarose gel electrophoresis of PCR products from pure-cultured *F. psychrophilum* DNA extracted with proteinaseK.

Lane # 1-6: PCR was performed with single step PCR. The template DNA concentrations of lane # 1-6 were 2.16×10^5 - 10^0 CFU/tube respectively.
 Lane # 7-12: PCR was performed with RT-PCR. The template DNA concentrations of lane # 7-12 were 8.25×10^5 - 10^0 CFU/tube respectively.
 Lane # 13-18: PCR was performed with nested-PCR. The template DNA concentrations of lane # 13-18 were 2.16×10^5 - 10^0 CFU/tube respectively.
 LaneM: pHY marker

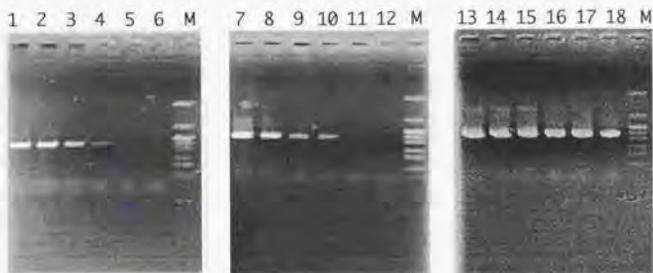


Fig. 1-1b. Agarose gel electrophoresis of PCR products from pure-cultured *F. psychrophilum* DNA extracted with Chelex 100.

Lane # 1-6: PCR was performed with single step PCR. The template DNA concentrations of lane # 1-6 were 1.14×10^3 - 10^8 CFU/tube respectively.
 Lane # 7-12: PCR was performed with RT-PCR. The template DNA concentrations of lane # 7-12 were 4.13×10^3 - 10^8 CFU/tube respectively.
 Lane # 13-18: PCR was performed with nested-PCR. The template DNA concentrations of lane # 13-18 were 1.14×10^3 - 10^8 CFU/tube respectively.
 LaneM: pHY marker

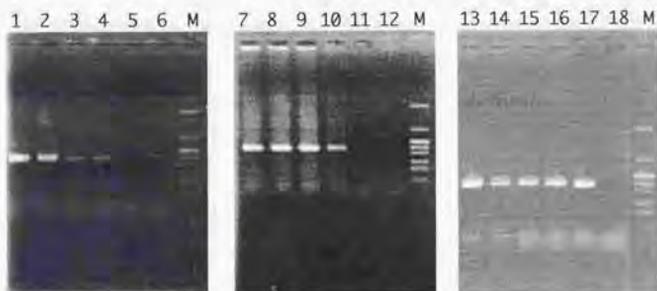


Fig. 1-1c. Agarose gel electrophoresis of PCR products from pure-cultured *F. psychrophilum* DNA extracted with phenol/chloroform.

Lane # 1-6: PCR was performed with single step PCR. The template DNA concentrations of lane # 1-6 were 0.66×10^5 - 10^8 CFU/tube respectively.
 Lane # 7-12: PCR was performed with RT-PCR. The template DNA concentrations of lane # 7-12 were 0.66×10^5 - 10^8 CFU/tube respectively.
 Lane # 13-18: PCR was performed with nested-PCR. The template DNA concentrations of lane # 13-18 were 0.66×10^5 - 10^8 CFU/tube respectively.
 Lane M: pHY marker

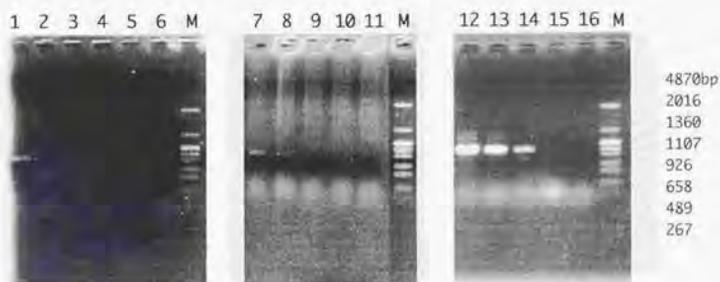


Fig. 1-2a. Agarose gel electrophoresis of PCR products from the mixture of ayu kidney homogenate and *F. psychrophilum* extracted with proteinaseK.

Lane # 1-6: PCR was performed with single step PCR. The template DNA concentrations of lane # 1-6 were 1.94×10^5 - 10^0 CFU/tube respectively.
 Lane # 7-11: PCR was performed with RT-PCR. The template DNA concentrations of lane # 7-11 were 1.94×10^5 - 10^0 CFU/tube respectively.
 Lane # 12-16: PCR was performed with nested-PCR. The template DNA concentrations of lane # 12-16 were 7.00×10^5 - 10^0 CFU/tube respectively.
 laneM: pHY marker

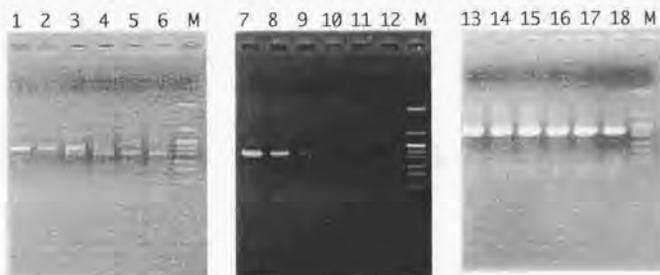


Fig. 1-2b. Agarose gel electrophoresis of PCR products from the mixture of ayu kidney homogenate and *F. psychrophilum* extracted with Chelex 100.

Lane # 1-6: PCR was performed with single step PCR. The template DNA concentrations of lane # 1-6 were 1.50×10^1 - 10^6 CFU/tube respectively.
 Lane # 7-12: PCR was performed with RT-PCR. The template DNA concentrations of lane # 7-12 were 1.50×10^5 - 10^0 CFU/tube respectively.
 Lane # 13-18: PCR was performed with nested-PCR. The template DNA concentrations of lane # 13-18 were 1.50×10^4 - 10^0 CFU/tube respectively.
 laneM: pHY marker



Fig. 1-2c. Agarose gel electrophoresis of PCR products from the mixture of ayu kidney homogenate and *F. psychrophilum* extracted with phenol/chloroform.

Lane # 1-6: PCR was performed with single step PCR. The template DNA concentrations of lane # 1-6 were 5.78×10^5 - 10^0 CFU/tube respectively.
 Lane # 7-12: PCR was performed with RT-PCR. The template DNA concentrations of lane # 7-12 were 5.78×10^5 - 10^0 CFU/tube respectively.
 Lane # 13-18: PCR was performed with nested-PCR. The template DNA concentrations of lane # 13-18 were 5.78×10^5 - 10^0 CFU/tube respectively.
 Lane M: pHY marker

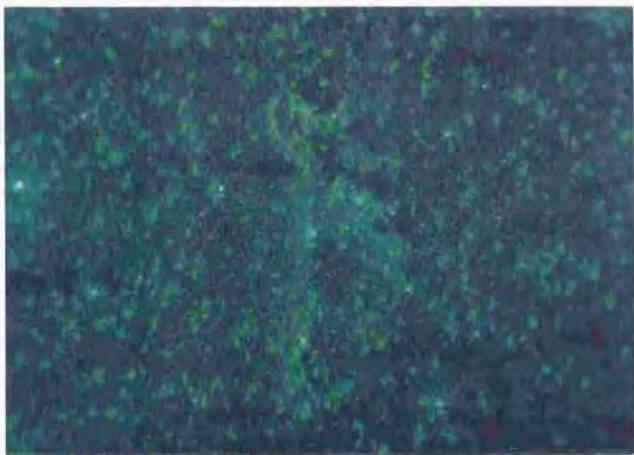


Fig. 1-3. Detection of *F. psychrophilum* by IFAT

Mixture of kidney tissue homogenate and pure-cultured *F. psychrophilum*.
Concentration of *F. psychrophilum* is 1.49×10^8 CFU/ $10^6 \mu\text{l}$ homogenate.

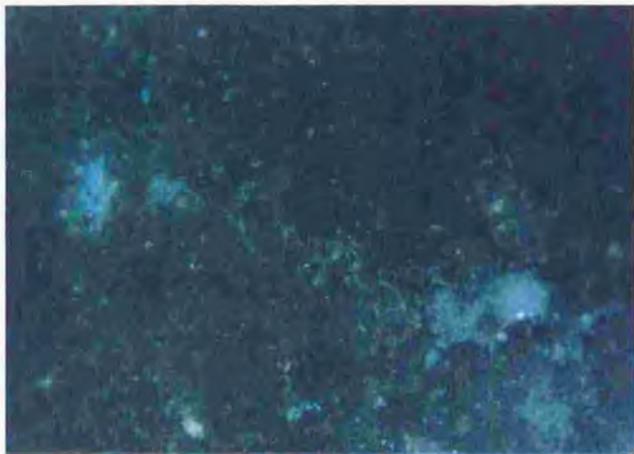


Fig. 1-4. Detection of *F. psychrophilum* by IFAT

Mixture of kidney tissue homogenate and pure-cultured *F. psychrophilum*.
Concentration of *F. psychrophilum* is 1.49×10^8 CFU/ $10^6 \mu\text{l}$ homogenate.

Table 1-1. PCR sensitivity for pure-cultured *F. psychrophilum*.

Extraction	normal PCR	nested PCR	RT-PCR
Protainase K	2.16×10^5	2.16	8.25×10^5
Chelex100	1.14×10^5	1.14	4.13×10^5
Phenol/chlorofoam	6.60×10^5	6.60	6.60×10^5

Table 1-2. PCR sensitivity for the mixture of kidney tissue homogenate and pure-cultured *F. psychrophilum*.

Extraction	normal PCR	nested PCR	RT-PCR
Protainase K	1.94×10^5	7.00×10^5	1.94×10^4
Chelex100	1.50×10^5	1.50	3.86×10^4
Phenol/chlorofoam	5.78×10^5	5.78	5.78×10^5

^a Colony Forming Unit (CFU) per a PCR reaction tube
 Detection limit of cultivation and IFAT are 4.38×10^3 CFU/10 μ l homogenate
 and 1.49×10^3 CFU/10 μ l homogenate respectively.

第2章

琵琶湖産アユと輸入ギンザケ卵からのPCR法を用いた *Flavobacterium psychrophilum*の検出

序論

アユは日本における冷水病の被害の最も大きい魚種である。このアユは、ニシン目 (Clupeida)、アユ科 (Plecoglossidae)、アユ属 (Plecoglossus) の両側回遊魚で、日本のほぼ全域と台湾、朝鮮半島、中国大陸の一部に分布する。寿命1ヶ年の年魚であることが有名であるが、その生活は以下の通りである。秋、川の下流の砂礫地で産卵し、卵は卵膜で砂礫に付着する。孵化後、仔魚は海に流れ下って冬を沿岸海域で過ごした後、翌春、7 cm ぐらいになると河川に遡上する。幼魚は動物性の浮遊生物を摂食する。河川上中流域に定住したアユは、川底の石に付着する藻類をその特有の歯と舌で摂食して成長し、秋、産卵後死亡する。1年では成熟せず、河中で越冬し、翌年産卵する越冬魚もまれにみられる。遊魚の対象としても有名であるが、鶴飼、梁等によっても採られる。日本産淡水魚の内高価なものの一つで、また、産卵場の保護、ダム建設などによる遡上の妨害を克服すれば、最も生産的な淡水魚の一つであるとされている。

このアユ養殖で、日本における最大の種苗生産地および全国の遊魚種苗川アユの生産供給地は滋賀県の琵琶湖 (Fig. 2-1) であり、琵琶湖産種苗アユからも冷水病の分離の報告がある (滋賀県水産試験場; 学会報告、論文掲載等無し)。しかし、実際には琵琶湖産種苗アユの保菌にたいする継続した調査研究はない。そこで、本章では、第1章の結果より、寒天平板培養法や蛍光抗体法に比べ感度が高いと思われたPCRによる琵琶湖産養殖用アユの *F. psychrophilum* の保菌検査を行った。

世界的に冷水病が初めて報告されたのは、北米のサケマス孵化場であり、日本でも輸入卵を使用した宮城県の新津養殖場で冷水病の発生が報告されている (Borg 1960, Wakabayashi et al. 1991)。日本におけるギンザケ養殖の概要は以下の通りである。まず、12月に発眼卵を淡水の孵化場に収容し、1月に孵化させて、2月に餌付けを開始する。淡水養殖場は秋までに平均体重150 gに養成して、海面養殖場へ出荷する。海面養殖場は10月下旬から11月中旬に掛けて種苗を海水馴致後、海面の養殖生け簀に収容し、ドライベレットやモイストベレットを給餌する。翌年4~8月までに2~3 kgに養成して水揚げし、水温上昇前

に全量を水揚げする。ギンザケは日本に生息しないため種苗卵のほとんどをアメリカやカナダから輸入しているが、現在でも各地の孵化場で冷水病の発生が報告されている。このことから、日本におけるギンザケの冷水病は、輸入ギンザケ卵とともに持ち込まれたものであることも予想される。しかしこれまで輸入ギンザケ卵からの*F. psychrophilum*検出は行われておらず、このことは憶測の域を越えない。そこで、アユからのPCRによる検出技術を応用し、輸入ギンザケ卵からの*F. psychrophilum*の検出を試みた。また、寒天平板培養法と、蛍光抗体法による輸入ギンザケ卵からの*F. psychrophilum*の検出も試み検出率を比較した。

材料と方法

アユ

滋賀県水産試験場の協力により、1995年4月から1997年6月までに採集したアユ324尾を供試した。アユは、各個体毎に湿重量をはかり、無菌的に解剖し、腎臓を分離、200 μ lのSTEバッファーまたはPBS(-)でホモジナイズしたものをサンプルとした。1995年4月から6月までの各月に採集したアユの一部 (Lot # 2, 10, 16) についてはサンプル10 μ lを、作製後、直ちにTYE寒天平板に塗抹し、寒天平板培養法による検査を行った。また、同じく作製直後のサンプル10 μ lを第1章と同様の方法で無蛍光スライドガラスに塗抹し蛍光抗体法に使用した。

鯉洗浄サンプルは1.5 mlチューブに入れ、同チューブに滅菌PBS(-) 1 mlを加え約10秒激しくブレンダーで攪拌した後、鰓を取り除き、残った鰓表面洗浄液を15000 rpm、4℃で10分遠心分離した。上清を廃棄し、沈渣を100 μ lのPBS(-)に再懸濁したものをサンプルとした。腎臓ホモジネートサンプルおよび鯉洗浄サンプルはPCRに使用するまで-80℃で保存した。

ギンザケ卵

日本水産資源保護協会の協力により、日本に入国直後の輸入ギンザケ発眼卵及び、国内産ギンザケ発眼卵を入手し、使用した。発眼卵は、処理するまで湿ったガーゼと共に密閉容器中に保存した。容器は4℃の冷蔵庫中で保存した。

ギンザケ卵を1粒ずつ滅菌した1.5 mlチューブに入れ、同チューブに滅菌PBS(-) 1 mlを加え約10秒激しくブレンダーで攪拌した後、ギンザケ卵を取り除き、残ったギンザケ卵表面洗浄液を15000 rpm、4℃で10分遠心分離した。上清を廃棄し、沈渣を100 μ lのPBS(-)に再懸濁したものをサンプルとした。サンプルはPCRに使用するまで-80℃で保存した。

DNA抽出法

第1章のChelex100を用いた方法と同様の方法を用いた。ただし、サンプルとして上記の腎臓ホモジネートサンプル、鰹洗浄サンプル、およびギンザケ卵洗浄サンプル10 μ lを使用した。

PCR

第1章のnested PCRと同様の方法を用いた。ただし、反応液量は、組成の比率を同じにして1st. PCRでは計10 μ l、2nd. PCRでは計20 μ lとした。

寒天平板培養法

第1章の寒天平板法と同様の方法を用いた。

蛍光抗体法

第1章の蛍光抗体法と同様の方法を用いた。

結果及び考察

琵琶湖産種苗アユからの検出

PCRによる琵琶湖産種苗アユの腎臓ホモジネートからの*F. psychrophilum*の検出結果は324尾中52尾(16.0%)が陽性で、51ロット中、陽性の個体があったロットは24ロットであった(Table 2-1)。このことから、琵琶湖産種苗アユが*F. psychrophilum*を保菌した状態で日本国内を流通していることが示唆された。琵琶湖産種苗アユが、日本で最大のアユ種苗の供給源であることを考えると、日本のアユ養殖場で発生している冷水病は琵琶湖産種苗アユとともに持ち込まれたものである可能性も否定できない結果であった。

1995年に採集されたLot# 2, 10, 16の74尾については寒天平板培養法、蛍光抗体法も併用して保菌検査を行ったが、寒天平板培養法、蛍光抗体法の両方法で保菌が確認された個体がなかったのに対し、PCRで保菌が確認された個体は5サンプルであった(Table 2-2)。このことから、第1章で示唆されたとおり、現場サンプルを用いた場合においても、PCRが従来の寒天平板培養法や蛍光抗体法に比べて、優れた検出法であることがわかった。

また、寒天平板を用いたアユからの*F. psychrophilum*の保菌検査に、鰓組織を用いることが有効であるとの報告から、腎臓ホモジネートサンプル、鰓ホモジネートサンプル、および鰓洗浄サンプルからの検出率の比較を行い、鰓組織を用いたPCRによる*F. psychrophilum*の検出の有効性を検討した(Table 2-3)。その結果、鰓ホモジネートサンプル、および鰓洗浄サンプルからの*F. psychrophilum*の検出率はそれぞれ70%、58.3%で、腎臓ホモジネートサンプルからの検出率(12.5%)に比べてかなり検出感度が高いと思われた。腎臓ホモジネートサンプルから保菌が確認された個体で鰓ホモジネートサンプルか鰓洗浄サンプルで保菌が確認されなかった個体はなかった。また、鰓洗浄サンプルの作製は、ホモジネートサンプルの作製に比べて簡便なことも、多検体を扱う保菌調査において有効であると思われた。

そこで、腎臓ホモジネートサンプルに供試した51ロット中の23ロットを用いて鰓洗浄サンプルからのPCRによる検査を行った(Table 2-4)。その結果、全

112尾中保菌が確認された個体はほぼ半数の55尾(49.1%)で腎臓ホモジネートサンプルからの検出率(16%)に比べ、かなり高い値となった。また、腎臓ホモジネートを用いたときには保菌個体が検出できなかったロットで鰓洗浄サンプルを用いたときに保菌個体が検出できたロットも6ロットあった(Lot # 25, 38, 41, 42, 46, 51)。逆に腎臓ホモジネートを用いたときには保菌個体が検出できたロットで鰓洗浄サンプルを用いたときに保菌個体が検出できなかったロットは1ロットだけであった(Lot # 48)。このことから、鰓洗浄サンプルを用いたPCRによる保菌検査が有効であることが考えられた。しかし、冷水病が全身感染性の病気で、また鰓は、常に環境水と接触している器官で、*F. psychrophilum*が環境常的な細菌であることを考えると、鰓洗浄サンプルから*F. psychrophilum*の存在が確認された個体が発病に至る前段階としての保菌状態であると断定できない。従って、鰓洗浄サンプルを用いた保菌調査についてはさらなる検討が必要であると思われる。

輸入ギンザケ卵からの検出

PCRによる輸入ギンザケ卵からの*F. psychrophilum*の検出結果は183粒中81粒(44.3%)が陽性で、23ロット中、陽性の個体があったロットは9ロットであった。このことから、ギンザケ卵が、*F. psychrophilum*を保菌した状態で輸入されており、これらを元にしたギンザケ養殖で発生した冷水病は輸入ギンザケ卵が起源である可能性が考えられた。一方、寒天平板培養法および蛍光抗体法による検出では、PCRで陽性であったロットで検出が確認されなかったロットも多く、明らかにPCRによる検出感度が高いと思われた(Table 2-3)。

また、*F. psychrophilum*に特異的なバンド以外に約1500 bpの弱いバンドがみられたサンプルがあったが、これは第1段階のユニバーサルプライマーによって増幅した*F. psychrophilum*以外の菌に由来するものと思われた(Fig. 2-3)。

今回の検査ではギンザケ輸入卵の洗浄液を検査対象として用いていることから、検出された個体には、卵外に*F. psychrophilum*が存在していたと考えられ

る。しかし、*F. psychrophilum*はギンザケ卵の卵外 (on egg) のみではなく、卵内 (in egg) に存在することが知られていることから、今後の輸入ギンザケ卵の *F. psychrophilum* の検査には、卵洗浄液以外にも卵内を検査することも必要であると思われた (Brown *et al.* 1997, Kumagai and Takahashi 1997)。また、今回の研究には輸入ギンザケ卵のみでなく、近年SPF (specific pathogen free) 卵として需要が高まっている国内産ギンザケ卵も検査した (Lot # 10, 11)。その結果、日本国内で生産されたギンザケ卵からは *F. psychrophilum* が検出されず、改めてSPF卵としての国内産ギンザケ卵の価値が認められた。しかし、本研究で保菌検査した国内産ギンザケ卵は、わずか2ロット・6サンプルのみであるので、国内産ギンザケ卵のSPF卵としての本当の価値を確立するためには、今後の継続的な保菌検査が必要であると思われた。

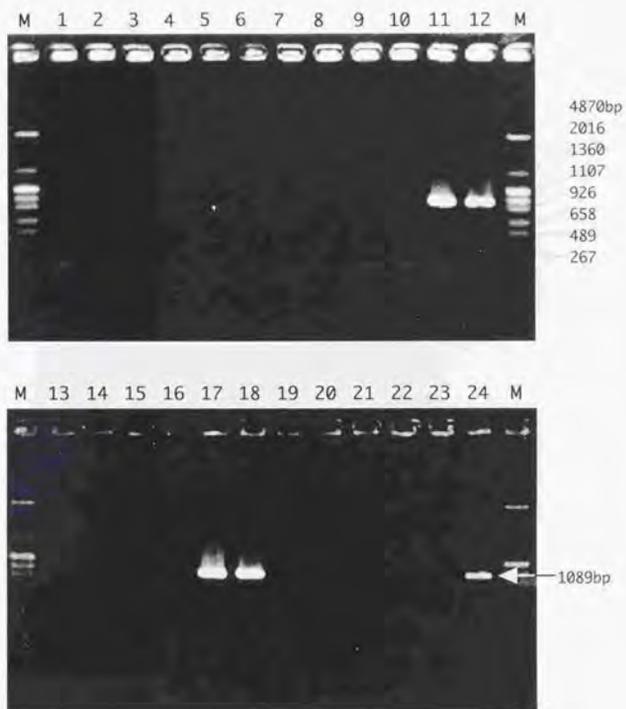


Fig. 2-2. Agarose gel electrophoresis of PCR products from DNA extracted from ayu fry (lot# 2).

Lane 1-24: sample# 1-24, Lane M: pHY marker



Fig. 2-3. Agarose gel electrophoresis of PCR products from DNA extracted from coho salmon eggs (lot# 23).

Lane 1-8 : sample# 1-8, Lane M : marker

Table 2-1. Inspection for *F. psychrophilum* from Ayu kidney homogenate¹ with PCR.

Lot #	Sampling date	Sampling Location	Average wt. of ayu(g)	Number of fish examined	Number of fish positive
1	950406	Shiga	2.20	5	1
2	950413	Adogawa	2.26	24	5
3	950419	Nakanushi	3.24	5	0
4	950420	Adogawa	3.48	5	3
5	950509	Shiga	4.30	5	0
6	950510	Kohoku	2.40	3	0
7	950510	Nakanushi	3.90	2	0
8	950511	Biwa	5.18	5	0
9 ¹	950523	Hikone	2.78	5	2
10 ¹	950523	Hikone	3.42	25	0
11	950609	Kohoku	2.88	5	0
12	950622	Hikone	8.46	5	3
13	950626	Biwa	8.30	5	3
14	950627	Makino	4.52	5	0
15	950628	Hikone	5.74	5	0
16	950629	Nakanushi	5.35	25	0
17	950712	Shiga	2.90	1	0
18	950713	Kohoku	5.82	5	0
19	950718	Biwa	6.00	1	0
20	950719	Nagahama	4.14	5	1
21 ¹	960112	Unknown	1.25	2	1
22	960319	Hikone	2.10	4	0
23	960422	Hikone	1.95	4	0
24	960529	Hikone	2.48	4	0
25	960627	Hikone	4.15	4	0
26	961203	Hikone	0.18	5	1
27	970128	Okishima	0.18	5	0
28	970226	Hikone	2.08	5	0

(Continued on following page)

Table 2-1. (continued)

Lot #	Sampling date	Sampling Location	Average wt. of ayu(g)	Number of fish examined	Number of fish positive
29	970226	Shiga	0.70	5	0
30	970305	Makino	0.74	5	1
31	970318	Hikone	1.64	5	0
32	970319	Shiga	2.84	5	1
33	970326	Kohoku	2.24	5	0
34	970403	Makino	1.04	5	1
35	970410	Shiga	1.68	5	1
36	970423	Adagawa	10.02	5	1
37	970425	Kohoku	2.58	5	3
38	970425	Hikone	4.96	5	0
39	970502	Makino	2.04	5	2
40	970509	Shiga	3.90	5	2
41	970513	Hikone	4.27	10	0
42	970521	Makino	7.51	10	0
43	970522	Kohoku	2.77	10	2
44	970523	Adagawa	6.86	10	5
45	970603	Shiga	6.10	10	4
46	970612	Hikone	3.97	10	0
47	970619	Makino	4.38	5	1
48	970625	Adagawa	4.30	5	2
49	970625	Makino	4.26	5	2
50	970711	Shiga	3.62	5	4
51	970711	Makino	4.50	5	0
	total		3.86	324	52

*The homogenates of the kidney tissue were examined for *F. psychrophilum* with PCR.

**Samples of Lot# 9 and 10 were sampled in the same day and place, but different lot each other.

**Ayu of Lot# 21 were diagnosed as BCWD by their disease sign before PCR inspection.

Table 2-2. Inspection of ayu for *F. psychrophilum* by PCR, Culture and IFAT¹.

Lot#	Sampling date	Average wt. of ayu(g)	Detection of <i>F. psychrophilum</i>		
			PCR	Culture	IFAT
2	950413	2.26	5/24 ²	0/24	0/24
6	950510	2.40	0/25	0/25	0/25
16	950629	5.35	0/25	0/25	0/25
Total		3.70	5/74(6.8%)	0/74	0/74

¹The homogenates of the kidney tissue were examined for *F. psychrophilum* with three different methods, i.e. PCR, culture, and IFAT.

²number of fish positive/number of fish examined.

Table 2-3. Comparison of PCR detection between gill and kidney.

Lot#	Sampling date	Average wt.(g)	Detection from		
			Gill homogenate	Gill washing	Kidney homogenate
21	960112	1.25	ND ¹	2/2 ²	1/2
22	960319	2.10	ND	0/4	0/4
23	960422	1.95	ND	0/4	0/4
24	960529	2.48	ND	2/4	0/4
25	960627	4.15	ND	0/4	0/4
41	970513	3.98	ND	2/5	0/5
42	970521	7.04	ND	2/5	0/5
43	970522	2.58	5/5	5/5	2/5
44	970523	6.26	4/5	5/5	3/5
45	970603	5.94	1/5	5/5	0/5
46	970612	4.36	4/5	5/5	0/5
total		4.08	14/20 (70%)	28/48 (58.3%)	6/48 (12.5%)

¹ Not done

² number of fish positive/number of fish examined

Table 2-4. Inspection for *F. psychrophilum* from Ayu gill washings with PCR.

Lot #	Sampling date	Sampling location	Average wt. of ayu(g)	Number of fish examined	Number of fish positive
6	950510	Kohoku	1.50	2	0
22	960319	Hikone	1.46	5	0
24	960529	Hikone	2.26	5	0
25	960627	Hikone	4.00	5	2
30	970305	Makino	0.86	5	1
32	970319	Shiga	2.68	5	2
34	970403	Makino	0.96	5	2
35	970410	Shiga	1.58	5	3
36	970423	Adogawa	9.72	5	2
38	970425	Hikone	3.94	5	1
39	970502	Makino	3.98	5	2
40	970509	Shiga	3.16	5	3
41	970513	Hikone	2.58	5	2
42	970521	Makino	7.04	5	2
43	970522	Kohoku	3.98	5	5
44	970523	Adogawa	6.26	5	5
45	970603	Shiga	5.94	5	5
46	970612	Hikone	4.36	5	5
47	970619	Makino	4.46	5	5
48	970625	Adogawa	4.70	5	0
49	970625	Makino	5.74	5	3
50	970711	Shiga	3.76	5	2
51	970711	Makino	4.46	5	3
total			3.95	112	55

Table 2-5. Inspection of eyed-eggs of coho salmon for *F. psychrophilum*

Lot#	Egg source	Year	Detection of <i>F. psychrophilum</i>		
			PCR	Culture	IFAT
1	USA (WS)	1995	23/24 ^a	5/24	7/24
2	USA (WS)	1995	24/24	1/24	0/24
3	USA (WS)	1995	24/24	0/24	0/24
4	USA (WS)	1995	3/3	+ ^b	+
5	USA (WS)	1995	2/3	+	+
6	USA (WS)	1995	0/3	-	-
7	USA (WS)	1995	0/3	-	-
8	USA (DS)	1995	0/3	-	-
9	USA (DS)	1995	0/3	-	-
10	Japan (DS)	1995	0/3	-	-
11	Japan (DS)	1995	0/3	-	-
12	USA (DS)	1996	0/5	0/5	ND
13	USA (DS)	1996	1/5	0/5	ND
14	USA (WS)	1996	0/5	0/5	ND
15	USA (DS)	1997	2/8	-	ND
16	USA (DS)	1997	1/8	-	ND
17	USA (DS)	1997	0/8	-	ND
18	USA (DS)	1997	0/8	-	ND
19	USA (DS)	1997	0/8	-	ND
20	USA (DS)	1997	0/8	-	ND
21	USA (DS)	1997	0/8	-	ND
22	USA (WS)	1997	0/8	-	ND
23	USA (DS)	1997	1/8	-	ND
Total			81/183(44.3%)		

DS:Domestic spawner, WS:Wild spawner, ND:Not determined

^aSample eggs were vigorously shaken with PBS by a tube mixer. The sediments collected from the PBS by centrifuge were examined for *F. psychrophilum* with three different methods, i.e. PCR, culture, and IFAT.

^bnumber of eggs positive/number of eggs examined

^cSeveral eggs were pooled and examined; + : detected, - : not detected.

Culture and IFAT data of Lot# 4-11 were kindly offered by A. Kumagai, Miyagi Prefectural Fisheries Experimental Station.

第3章

血清型による *Flavobacterium psychrophilum*の型別

序論

第2章の結果により、琵琶湖産養殖用アユはかなり高い保菌率であることが分かり、琵琶湖産養殖用アユが、全国のアユ養殖の種苗として広く用いられていることから、日本における冷水病が、きわめて深刻な事態であることが改めて浮き彫りとなった。また、同じく第2章の結果より、輸入ギンザケ発眼卵が、*F. psychrophilum*を保菌した状態で輸入されることも分かった。日本における冷水病が、古くから知られている欧米に比べ比較的近年になってから知られるようになったことを考えると、*F. psychrophilum*は、ギンザケやニジマスのように外国から移入された魚種とともに日本に持ち込まれたと考えることもできる。しかし、若林らによる吸収血清を用いた血清型の研究により、日本における*F. psychrophilum*は、ギンザケ由来株に多くみられる血清型のO-1とアユ由来株に多くみられる血清型のO-2に分けられ、日本のアユに発生している冷水病は均一なものではなく種内変異が存在することが知られている (Wakabayashi et al. 1994)。

そこで、本章では、若林らの追実験も兼ねて*F. psychrophilum*の血清型による型別を行った。また、若林らの研究の時点では*F. psychrophilum*の日本での分離例が少なく、実験に供試できた株数が少なかったこと、ニジマス由来株に血清型が不明の株が多く見られたことから、その後日本で分離された多くの菌株を供試し、新たに、ニジマス由来株の抗血清も作製して実験に使用した。

材料と方法

抗原液

F. psychrophilum 126株を抗原として使用した (Table 3-2)。各菌株はTYE液体培地で培養後、ホルマリンを添加し (0.4%) 一昼夜処理した。その後、PBS(-)で3回洗浄し、ホルマリン処理抗原とした。ホルマリン処理抗原を沸騰水中で30分間の加熱処理を行い再びPBS(-)で3回洗浄したものを加熱処理抗原とした。

抗血清

まず、上記のホルマリン処理抗原を使用し、ニジマス由来のFPC814、ギンザケ由来で*F. psychrophilum* 標準株のNCIMB1947^T、アユ由来のFPC840、の計3株に対する家兔血清を作製した。家兔は、日本白色のメス (2.5 kg) を使用した。アジュバントにはフロイントコンプリートアジュバント (Wako Cat.# 014-09541) を使用した。

抗NCIMB1947^T家兔血清はホルマリン処理したFPC840で、抗FPC840家兔血清はホルマリン処理したNCIMB1947^Tで吸収操作を行った。抗FPC814家兔血清はホルマリン処理したNCIMB1947^TとFPC840で吸収操作を行った。吸収操作は、他の二つの抗原液に対して各々の抗原液に特異的になるまで繰り返した。すなわち、抗NCIMB1947^T家兔血清は加熱処理したNCIMB1947^T、抗FPC840家兔血清は加熱処理したFPC840、抗FPC814家兔血清は加熱処理したFPC814の各抗原液に特異的に反応するようになるまで繰り返した。吸収後の抗血清は4℃で保存し、作製後速やかに実験に供試した。

抗体価測定

抗体価は96穴マイクロタイタープレートを用いたマイクロタイター法により測定した。抗血清の希釈と、陰性対照にPBS(-)を使用した。抗原液は、ホルマリン処理抗原、加熱処理抗原ともに5 mg/ml PBS(-)に調整したものをを用いた。

抗体価が4以下は陰性、16以上は陽性とし、3種類全ての吸収血清に陰性の株は血清型不明株 (ND) とした。また、自発凝集によって判定できない株は、結果に入れないことにした。

結果及び考察

各吸収血清はそれぞれの加熱抗原液に特異的であった。そこで、FPC840で吸収した抗NCIMB1947^T血清に特異的に反応するものをO-1、NCIMB1947^Tで吸収した抗FPC840血清に特異的に反応するものをO-2、NCIMB1947^TとFPC840で吸収した抗FPC814血清に特異的に反応するものをO-3とした (Table 3-1)。

次に、この3種類の吸収血清で様々な宿主由来の126菌株に対して、それぞれ同様に抗体価を測定した (Table 3-2)。その結果、自発凝集によって判定できない株をのぞいて、ギンザケ由来株12株のうちの半数以上の7株はO-1となり、残りの5株は血清型不明株となった。アユ由来株42株は、血清型判定不能の1株を除いて全てO-2となった。アユ由来株のほとんどがO-2で、アユ型のO-2と判定された株は、アユ由来株のみに見られたのが特徴的であった。このことからアユから分離される株は非常にアユに対する宿主特異性が高く、アユが日本在来種であることから日本に特異的であると言いうことができた。ニジマス由来株は36株中、O-1の株が1株、血清型不明株も2株見られたがほとんどの33株がO-3となった。これらのことから、ギンザケ由来株に多くみられる血清型、O-1、アユ由来株に多くみられる血清型O-2に加えて、新たにニジマス由来株に多くみられるO-3の血清型が存在することが明らかとなった。また、O-1、O-2、O-3の血清型がそれぞれギンザケ、アユ、ニジマスに対する宿主特異性の高い血清型であることが分かった。

オイカワ由来株については、血清型がO-2のものがあることが報告されている (Iida and Mizokami 1996) が、本研究の結果で供試したオイカワ由来株の血清型はO-2のものではなく、O-3のものがみられた。飯田らの研究時点では新しい血清型であるO-3は報告しておらず、本研究で供試した菌株とは異なるものの、いずれも広島県で分離された株であることを考えると、彼らの使用した菌株も血清型O-3のものであるかもしれない。オイカワは日本の天然水域では、はじめて冷水病の発生が報告された魚種であり、日本の冷水病が、現在養殖域のみならず天然水域で発生していることが大きな問題となっていることから、

オイカワ由来株については血清型も含め今後さらに検討を加えるべきだと思われる。

ギンザケ、アユ、ニジマス以外の魚種由来株には、ギンザケ型のO-1、ニジマス型のO-3と判定された株もあったが、血清型不明株が多く見られた。このことから、*F. psychrophilum*にはO-1、O-2、O-3以外にも宿主に依存する血清型が存在することが予想された。これらの未知の血清型の型別にはさらに多くの菌株に対する抗血清の作製や、あるいはモノクローナル抗体の作製等の必要があると思われた。

また、若林らの研究で用いた菌株は全て本研究でも使用したので、その結果を比較してみた。その結果、血清型不明のもの以外ではほとんどの株でおなじ結果となったが、ギンザケ由来CH8-80が、若林らの研究ではO-1であったのに対し、本研究では血清型不明であった。ニジマス由来のFPC806はO-2とされていたが、今回の研究ではO-3と判定された。しかし、血清型O-1、O-2においての若林らの結果と、本研究での結果の差は、抗血清を作製した家兎が異なること、吸収操作に用いた抗血清の種類が異なること、また、実験者の技術的な差異などを考慮すると、非常に小さなもので、血清型が*F. psychrophilum*の型別において再現性の高い方法であると思われた。また、血清型不明とされていたニジマス由来のFPC808、FPC814、FPC816は本研究でニジマス型のO-3と判定された (Table 3-4)。

Table 3-1. Agglutinin titers of rabbit anti-*Flavobacterium psychrophilum* sera after absorption

Antiserum	Absorbed with	Agglutinin titer for			Serotype
		NCIMB1947 ^T HK	FPC840 HK	FPC814 HK	
NCIMB1947 ^T (CS-USA)	FPC840 FK	32	<4	<4	0-1
FPC840 (AY-JPN)	NCIMB1947 ^T FK	<4	32	<4	0-2
FPC814 (RT-JPN)	NCIMB1947 ^T FK & FPC840 FK	<4	4	32	0-3

RT:Rainbow trout, CS:Coho salmon, AY:Ayu
 JPN:Japan, USA:United States of America
 FK:Formalin killed, HK:Heat killed

Table 3-2. Determination of the serotypes for heat-stable antigens of *F. psychrophilum* isolated from different fishes in different areas

Strain#	Location	Host	Agglutinin titer			Serotype
			Sera#1	Sera#2	Sera#3	
FPC817	Miyagi	CS	4	4	<4	ND
FPC818	Miyagi	CS	<4	<4	<4	ND
FPC820	Miyagi	CS	4	4	4	ND
FPC828	Miyagi	CS	32	<4	<4	0-1
FPC829	Miyagi	CS	32	4	<4	0-1
FPC830	Miyagi	CS	16	4	<4	0-1
FPC831	Miyagi	CS	4	<4	<4	ND
SH3-81	USA Oregon	CS	16	<4	4	0-1
CH8-80	USA Oregon	CS	4	4	<4	ND
NCIMB1947	USA Oregon	CS	32	<4	<4	0-1
FPC931	Hiroshima	AY	<4	16	4	0-2
KNA9402	Kanagawa	AY	<4	16	4	0-2
KNA9701	Kanagawa	AY	<4	32	<4	0-2
KNA9801	Kanagawa	AY	<4	32	<4	0-2
FPC928	Kyoto	AY	<4	16	<4	0-2
I-51	Nagano	AY	<4	32	<4	0-2
OKA9801	Okayama	AY	<4	16	<4	0-2
OKA9804	Okayama	AY	<4	32	4	0-2
OKA9805	Okayama	AY	<4	32	<4	0-2
OKA9806	Okayama	AY	<4	32	4	0-2
OKA9807	Okayama	AY	<4	16	<4	0-2
FPC955	Shiga	AY	<4	32	<4	0-2
FPC956	Shiga	AY	<4	32	<4	0-2
FPC957	Shiga	AY	<4	32	<4	0-2
I-33	Shiga	AY	<4	32	<4	0-2
I-35	Shiga	AY	<4	16	<4	0-2
I-58	Shiga	AY	<4	16	<4	0-2
SA95-01	Shiga	AY	<4	32	<4	0-2
SA96-01	Shiga	AY	<4	32	4	0-2
SA96-02	Shiga	AY	<4	<4	<4	ND
SA96-05	Shiga	AY	<4	32	<4	0-2
SA96-09	Shiga	AY	<4	32	<4	0-2
FPC837	Tokushima	AY	<4	32	4	0-2
FPC838	Tokushima	AY	<4	32	4	0-2
FPC839	Tokushima	AY	4	32	4	0-2
FPC840	Tokushima	AY	<4	16	4	0-2
FPC841	Tokushima	AY	<4	16	<4	0-2
FPC842	Tokushima	AY	<4	16	<4	0-2
FPC842	Tokushima	AY	<4	16	<4	0-2
PT97001	Tokushima	AY	<4	16	<4	0-2
PT97022	Tokushima	AY	<4	32	<4	0-2
PT97037	Tokushima	AY	<4	16	<4	0-2
PT97049	Tokushima	AY	<4	16	<4	0-2
PT98021	Tokushima	AY	<4	32	<4	0-2

(Continued on following page)

Table 3-2. (Continued)

Strain#	Location	Host	Agglutinin		titer		Serotype
			Sera#1	Sera#2	Sera#3	Sera#3	
PT98022	Tokushima	AY	4	32	<4		0-2
FPC924	Wakayama	AY	<4	32	<4		0-2
FPC925	Wakayama	AY	<4	32	4		0-2
FPC926	Wakayama	AY	<4	16	<4		0-2
FPC927	Wakayama	AY	<4	16	4		0-2
96-25	Yamanashi	AY	<4	16	<4		0-2
96-26	Yamanashi	AY	<4	16	4		0-2
96-9	Yamanashi	AY	<4	16	<4		0-2
AMR97B	Aomori	RT	<4	<4	32		0-3
AMR97C	Aomori	RT	<4	<4	32		0-3
KNR9706	Kanagawa	RT	4	<4	32		0-3
FPC806	Nagano	RT	<4	<4	32		0-3
FPC807	Nagano	RT	<4	<4	16		0-3
FPC808	Nagano	RT	<4	<4	16		0-3
I-44	Nagano	RT	<4	<4	32		0-3
I-45	Nagano	RT	<4	<4	32		0-3
I-46	Nagano	RT	<4	<4	32		0-3
I-46	Nagano	RT	<4	<4	32		0-3
I-47	Nagano	RT	<4	<4	32		0-3
OKR9801	Okayama	RT	<4	<4	16		0-3
OKR9802	Okayama	RT	<4	<4	16		0-3
OKR9804	Okayama	RT	<4	<4	32		0-3
FPC813	Tokyo	RT	<4	<4	16		0-3
FPC814	Tokyo	RT	<4	4	32		0-3
FPC816	Tokyo	RT	<4	<4	16		0-3
FPC827	Tokyo	RT	<4	<4	16		0-3
FPC938	Yamagata	RT	<4	4	16		0-3
FPC939	Yamagata	RT	<4	<4	16		0-3
FPC942	Yamagata	RT	<4	<4	32		0-3
FPC943	Yamagata	RT	<4	<4	16		0-3
FPC944	Yamagata	RT	<4	<4	16		0-3
95-14'	Yamanashi	RT	<4	<4	16		0-3
95-15'	Yamanashi	RT	4	4	32		0-3
95-16'	Yamanashi	RT	4	4	32		0-3
95-23	Yamanashi	RT	<4	<4	32		0-3
96-10	Yamanashi	RT	<4	4	16		0-3
96-21	Yamanashi	RT	4	4	32		0-3
96-29	Yamanashi	RT	<4	<4	<4		ND
96-7	Yamanashi	RT	32	<4	<4		0-1
96-8	Yamanashi	RT	4	4	32		0-3
FPC805	France	RT	<4	<4	<4		ND
13-17	Unknown	RT	4	4	16		0-3
13-55	Unknown	RT	<4	<4	32		0-3
P3-3/95	Unknown	RT	4	<4	16		0-3

(Continued on following page)

Table 3-2. (Continued)

Strain#	Location	Host	Agglutinin		titer		Serotype
			Sera#1	Sera#2	Sera#3	Sera#3	
OKM9801	Okayama	Amago	<4	4	4	ND	
OKM9802	Okayama	Amago	<4	<4	<4	ND	
FPC958	Tottori	Amago	<4	4	16	0-3	
95-13	Yamanashi	Amago	<4	<4	4	ND	
95-14	Yamanashi	Amago	<4	<4	4	ND	
95-15	Yamanashi	Amago	<4	4	4	ND	
95-16	Yamanashi	Amago	<4	4	<4	ND	
95-24	Yamanashi	Amago	4	<4	4	ND	
FPC811	Germany	Carp	32	<4	<4	0-1	
FPC947	Hiroshima	Carp	<4	<4	32	0-3	
126-H	Unknown	Grayling	32	<4	<4	0-1	
27-H	Unknown	Grayling	<4	<4	32	0-3	
96-5	Yamanashi	Iwana	<4	<4	4	ND	
FPC945	Hiroshima	Oikawa	<4	<4	32	0-3	
FPC946	Hiroshima	Oikawa	<4	<4	32	0-3	
FPC948	Hiroshima	Oikawa	<4	8	4	ND	
AMS97D	Aomori	Salmon	32	<4	4	0-1	
49-L	Unknown	Salmon	128	4	<4	0-1	
FPC810	Germany	Tench	<4	<4	4	ND	
FPC932	Hiroshima	Ugui	<4	4	16	0-3	
887	Unknown	Unknown	<4	<4	8	ND	
95-18	Yamanashi	Yamame	<4	<4	<4	ND	
95-19	Yamanashi	Yamame	<4	<4	<4	ND	
95-20	Yamanashi	Yamame	<4	<4	<4	ND	
96-4	Yamanashi	Yamame	16	<4	<4	0-1	

ND:Not determined

CS(Coho salmon):*Oncorhynchus kisutch*, AY(Ayu):*Plecoglossus altivelis*, RT(Rainbow trout):*Oncorhynchus mykiss*, Amago:*Oncorhynchus rhodurus*, Oikawa: *Zacco platypus*, Iwana(Yamame):*Salvelinus pluvius*, Ugui:*Tribolodon hakonensis hakonensis*, Carp: *Cyprinus carpio*

Sera#1: Rabbit anti-NCIMB1947 sera absorbed with FPC840FK, Sera#2: Rabbit anti-FPC840 sera absorbed with NCIMB1947FK, Sera#3: Rabbit anti-FPC814 sera absorbed with NCIMB1947FK and FPC840FK

Strains of FPC819(CS), 255/93(Unknown), 874(Unknown), 176-L(Salmon), I36(AY), PT96019(AY), PT96033(AY), SA9701(AY), KNA9702(AY), KNA9705(AY), 13-23(RT), P27-2/95(RT) and P30-1/95(RT) were auto-agglutinin.

Table 3-3. Relationship between host and serotype

Host	Serotype				Total
	0-1	0-2	0-3	ND	
CS	5	0	0	5	10
AY	0	42	0	1	43
RT	1	0	32	1	34
Amago	0	0	1	7	8
Iwana	0	0	1	0	1
Yamame	1	0	0	3	4
Oikawa	0	0	2	1	3
Carp	1	0	1	0	2
Grayling	1	0	1	0	2
Ugui	0	0	1	0	1
Tench	0	0	0	1	1
Salmon	2	0	0	0	2
Unknown	0	0	1	0	1
Total	11	42	39	20	112

CS:Coho salmon, AY:Ayu, RT:Rainbow trout
 ND:Not determined

Table 3-4. Determination of serotype by Wakabayashi *et al.*^{*1} and in this study.

Strain	Host	Location	Serotype determined by	
			this study	Wakabayashi ^{*1}
NCIMB1947 ^T	CS	USA Washington	0-1	0-1
SH3-81	CS	USA Oregon	0-1	0-1
CH8-80	CS	USA Oregon	ND	0-1
FPC828	CS	Miyagi	0-1	0-1
FPC829	CS	Miyagi	0-1	0-1
FPC830	CS	Miyagi	0-1	0-1
FPC839	AY	Tokushima	0-2	0-2
FPC840	AY	Tokushima	0-2	0-2
FPC924	AY	Wakayama	0-2	0-2
FPC925	AY	Wakayama	0-2	0-2
FPC926	AY	Wakayama	0-2	0-2
FPC806	RT	Nagano	0-3	0-2
FPC808	RT	Nagano	0-3	0-2?
FPC814	RT	Tokyo	0-3	0-2?
FPC816	RT	Tokyo	0-3	0-2?

*1 Wakabayashi, H., T. Toyama and T. Iida (1994): A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan. *Fish Pathol.*, 29, 101-104
 RT:Rainbow trout, CS:Coho salmon, AY:Ayu
 USA:United States of America

第4章

*gyrB*を標的としたPCR-RFLPによる *Flavobacterium psychrophilum*の型別

序論

第3章の結果より、*F. psychrophilum*には宿主魚種と強く相関する複数の血清型が存在することがあらためて明らかとなり、血清型という表現型において*F. psychrophilum*の種内変異が示唆された。そこで、本章では*F. psychrophilum*の遺伝子型による多型性を調べることを目的に、PCR-RFLPを用いて*F. psychrophilum*種内における型別を試みた。PCR-RFLPはPCR産物を用いてRFLP (restriction fragment length polymorphism, 制限酵素断片長多型)を検出し、遺伝子の変異や多型を検出に利用されている方法である (Selander *et al.* 1986, Navarro *et al.* 1992, Jantusch and Hull 1996)。本章では、PCR産物としてDNA ジャイレース (gyrase) の遺伝子領域 (以下*gyrB*領域) を標的としたRFLPによって*F. psychrophilum*種内の型別を行った。

DNA ジャイレースは二本鎖DNAの両鎖を切断再結合する酵素で、DNAの複製に必須な酵素である。このため*gyrB*領域は全ての細菌種に存在していると考えられ、また、細菌の系統分類に広く用いられるss rRNA (small subunit ribosomal RNA) 遺伝子よりも速い分子進化を行うとされている遺伝子である (Kranz *et al.* 1992, Yamamoto and Harayama 1995, 1996)。

材料と方法

細菌

F. psychrophilum 全146株を使用した (Table 4-1)。フリーズストックをTYE寒天培地に接種し、18℃で24~36時間培養したものを使用した。

テンプレートDNAの抽出法

テンプレートDNAの抽出には第1章以降で用いているChelex100を使用する方法を応用した。すなわちTYE寒天培地上に発育した1白金耳分の*F. psychrophilum*を1.5 mlエッペンドルフチューブに取り、5% Chelex 100 溶液を300 μ lを加え、56℃で30分インキュベートし、約10秒激しく攪拌し、さらに100℃で20分インキュベートし、15000 rpm、4℃で10分遠心分離した上清をテンプレートとした。テンプレートは4℃で保存した。

*gyrB*ユニバーサルプライマーの設計

Bacillus subtilis (accession # P05652)、*Escherichia coli* (accession # P06982) そして *Pseudomonas putida* (accession # P13364) のDNAジャイレースBサブユニットの既知のアミノ酸配列を基にGYR-2: 5' CAYGCNNGGNGGNAART-TYGA 3'、GYR-1R: 5' CCRTCNACRTCNGCRTCNGT 3'の*gyrB*領域のユニバーサルプライマーペアを設計した (Fig. 4-1)。

*F. psychrophilum*の*gyrB*領域の塩基配列決定

*F. psychrophilum*の*gyrB*領域に特異的なプライマーの設計のためギンザケ由来のFPC828とアユ由来のFPC840の2株の*gyrB*領域のユニバーサルプライマーで増幅したPCR産物をサブクローニングしその部分塩基配列を決定した。クローニングベクターはpT7Blue T-Vector (Novagen Cat. # 69820-1) を、PCR産物

とクローニングベクターのライゲーションにはTakara DNA Ligation Kit Ver.2 (Takara Cat. # 6022) を、大腸菌は*Escherichia coli* JM109 Competent Cells (Takara Cat. # 9022 または Toyobo Cat. # DNA-900) を用いた。塩基配列の決定にはDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Cat. # 402079) と、ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer) を使用した。

*F. psychrophilum*のgyrB領域に特異的プライマーの設計

ギンザケ由来のFPC828とアユ由来のFPC840の2株のgyrB領域の部分塩基配列を基に*F. psychrophilum*のgyrB領域に特異的なプライマーペア PSY-G1F : 5'TGCAGGAAATCTTACACTCG 3', PSY-G1R : 5' GTTGCAAATTA-CAATGTTGT 3' を設計した (Fig. 4-4)。

PCR条件

使用機器、試薬及び電気泳動条件は、第1章以降の方法とおなじ方法を用いた。ただし、PCRサイクルの条件はdenaturation 94 °C、60秒、annealing 56 °C、2分、extension 72 °C、2分を35サイクル、さらにfirst denaturation 94 °C、5分、last extension 72 °C、5分とした。反応液量は20 µlとし、そのうちの8 µlを電気泳動してPCR産物の増幅を確認した後、残りの12 µlを制限酵素処理に使用した。

制限酵素処理

PCR産物12 µl、制限酵素 (2.5 Unit/µl) 1.5 µl、制限酵素指定のバッファー 1.5 µlを制限酵素処理に使用した。制限酵素はRsa I、Msp I、Sau3A I、Hha I、HaeIII、MboII、Hpa I、Dde I、Hinf I、Pst Iの主に4塩基認識のものを10種類用いた。

制限酵素処理済みサンプルの電気泳動

サブマリン型アガロースゲル電気泳動装置Gel Mate (Toyobo Cat. # GEP 102) を電気泳動槽として用いた。電気泳動用ゲルには4% NuSieve 3:1 agarose (FMC BioProduct Cat. # 50090) TAEを用いた。泳動条件は50 V、150分間、4℃とした。マーカーとしてSuperladder-Lowマーカー (Funakoshi Cat. # GU-0110-00) を使用した。

結果及び考察

*gyrB*領域のユニバーサルプライマーペアGYR-2, GYR-IR を用いてPCRを行った結果、予想された塩基数 (約1212 bp) のPCR産物以外に約290 bpのPCR産物も得られた (Fig. 4-2)。これは*gyrB*領域ではない非特異的なPCR産物であると思われたが、全ての菌株で同様に増幅が確認されたので、RFLPによる型別の妨げにならないと判断し、そのままRFLPを行った。その結果、*Hin*I を用いてRFLPを行ったとき、2つのRFLPパターン、A, Bがみられた (Fig. 4-3)。アユ由来の68株中、50株がRFLPパターンAで残りの18株中16株はRFLPパターンBとなり、RFLPパターンA, Bどちらも判定できない株が2株であった。アユ由来以外の株ではすべてがRFLPパターンBとなり、パターンAはアユ由来菌株のみにみられたのが特徴的であるといえた。

F. psychrophilum の*gyrB*領域に特異的なプライマーペアPSY-G1F, PSY-G1R を用いてPCRを行った結果、予想された1017 bpの単一のPCR産物が得られ、これは*gyrB*領域のPCR産物であると思われた (Fig. 4-5)。そこで、このPCR産物を用いてRFLPを行った結果、*Rsa*I で処理したとき2つのRFLPパターンR, Sが認められた (Fig. 4-6)。ニジマス由来株では、38株中のほとんどである33株がRFLPパターンRであった。それに対し、アユ由来株68株中では、RFLPパターンRのものが8株、RFLPパターンSのものが60株で、RFLPパターンSのものが多かった。ギンザケ由来株ではRFLPパターンR, S両方のものが同じ割合で見られた。またギンザケ、ニジマス以外のサケ科魚類およびその他の魚種由来の菌株のほとんどでは、ニジマスと異なり、RFLPパターンSを示した。このことから、ニジマス由来株でほとんどがRFLPパターンRとなるのが特徴的であると言えた。これらのことから、PCR-RFLPを用いた*F. psychrophilum* 種内の型別も、血清型による型別と同様、宿主魚種に強く相関すると思われた。

本研究では*gyrB*領域を標的とするPCR-RFLPを行ったが、これに先立ち16S-rDNA領域、ITS (Internal Transcribed Spacer) 領域を標的としたPCR-RFLPも行った。その結果両領域を標的としたPCR-RFLPパターンには菌株間に有効な

差異が認められず、*F. psychrophilum*の型別には利用できなかった (Fig. 4-7)。

16S-rDNA領域については近縁の生物間ではその塩基配列はほとんど同じであることが知られており、属以上の系統分類に利用されることが多いことから、*F. psychrophilum*種内にRFLPパターンの差異が認められなかったのは当然の結果であると思われた (Forsman *et al.* 1994, N. Leblond-Bourget *et al.* 1996)。また、16S-rDNA領域に比べて塩基置換頻度が10倍以上とされているITS領域も、本研究の結果*F. psychrophilum*種内においては非常に保存されている領域であると思われた (Gurtler 1993, 1995, Guertler and Stanisich 1996)。

また、*gyrB*領域のユニバーサルプライマーペアGYR-2、GYR-1Rを用いたPCR-RFLPで2つのRFLPパターン、A、Bが確認されたが、これは、その後この*gyrB*領域ではない約290 bp非特異なPCR産物の塩基配列を決定した結果、この非特異な領域に由来するもので、*gyrB*領域の塩基配列の差異に由来するものではないことが分かった。このことから、*gyrB*領域における遺伝学的な多型はニジマス由来菌株に特異的であることが分かった。

sense primer

Bacillus subtilis 1:EVIMTYLHAGGKFDGSGYKVSGLHGVSVMNALSTELDVTVHRDGIHRQTYKRGVPV 60
Escherichia coli 1:EVIMTYLHAGGKFDNSYKVSGLHGVSVMNALSQKLELVIQREGKIHRQIYEHGVPQ 60
Pseudomonas putida 1:EVIMTYLHAGGKFDNSYKVSGLHGVSVMNALSEKLVLTVRRSGKIWEQTYVHGVPQ 60
 ***** * * * * *

Bacillus subtilis 61:TDLEIIGETDHTGTTTHFVDPPEIFSETTEYDYDL LANRVRELAFLTKGVNITIEDKREG 120
Escherichia coli 61:APLAVTGETEKTGTMRVFWPSLETFTNVTEFEYELAKRLELSFLNSGVSLRLRDKRDG 120
Pseudomonas putida 61:APMAVGESETTGTTHIFKPSAETFKNI-HFSWDILAKRIRELSFLNSGVGILLKDERSG 119
 * * * * * * * * * *

Bacillus subtilis 121:QERKNEYHYEGGIKSYVEYLNRSKEVHPEPI-YIEGKDGITVEALQYNSYTSNIYS 179
Escherichia coli 121:KE--DHFHYEGGIKAFVEYLNKNKTPIHPNIFYFSTEK-DGIGVEVALQWDDGFQENIYC 177
Pseudomonas putida 120:KE--EFFHYEGGLRAFVEYLTNKTTPVNSQVHFHSVQREDGVGVEVALQWDSFNENLLC 177
 * **** * * * * * * * * *

Bacillus subtilis 180:FTNNINTYEGGTHEAGFKTGLTRVINDYARKKGLIKENDPNLSGDDVREGLTAIISIKHP 239
Escherichia coli 178:FTNNIPQRDGGTHLAGFRAAMRTL NAYMDKEGYSKAKVASATGDAREGLI AVVSVKVP 237
Pseudomonas putida 178:FTNNIPQRDGGTHLVGRSSLTRLSNYSIEQELAKKNKVVATGDAREGLTAIISVVKP 237
 ***** * * * * * * * * *

Bacillus subtilis 240:DPQFEGQTKTKLGNSEARTITDTLFSAMETFMLENPDAAKKIVDKGLMAARARMAAKKA 299
Escherichia coli 238:DPKFSSQTKDKLVSSVEKSAVEQQMELLAEYLENPTDAKIVVGKIIDAARAREAARRA 297
Pseudomonas putida 238:DPKFSSQTKDKLVSSVEKTAVEQEMNKYFSDFLLENPNEAKAVVGKIDAARAREAARKA 297
 * * * * * * * * * *

Bacillus subtilis 300:RELTRRKSAL EISNLPGKLADCSSKDP SISELYIVEGDSAGGSAKQGRDRHFQAILPLRG 359
Escherichia coli 298:REMTRRKGALDLAGLPGKLADCCQERDPALSELYVEGDSAGGSAKQGGNRKNQAILPLKG 357
Pseudomonas putida 298:REMTRRKGALDIAGLPGKLADCCQEKDPALSELYVEGDSAGGSAKQGRNRRTQAILPLKG 357
 ***** * * * * * * * * *

antisense primer

Bacillus subtilis 360:KILNVEKARLDKILSNNEVRSMITALGTGIG-EDFNLEKARYHKVIMTDADVDGAHIRT 418
Escherichia coli 358:KILNVEKARFDKMLSSQEVATLITALGCGIGRDEYNPKLRYHSIIIMTDADVDGSHIRT 417
Pseudomonas putida 358:KILNVEKARFDKMISSQEVGTLITALGCGIGREEYNIDKLRHYHIIIMTDADVDGSHIRT 417
 ***** * * * * * * * * *

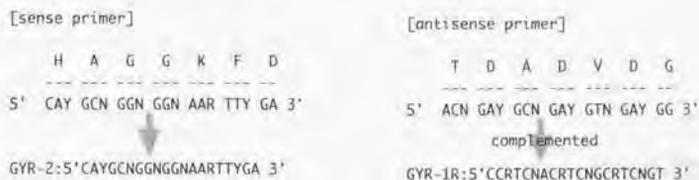


Fig. 4-1. Design of universal primers for the PCR amplification of *gyrB*

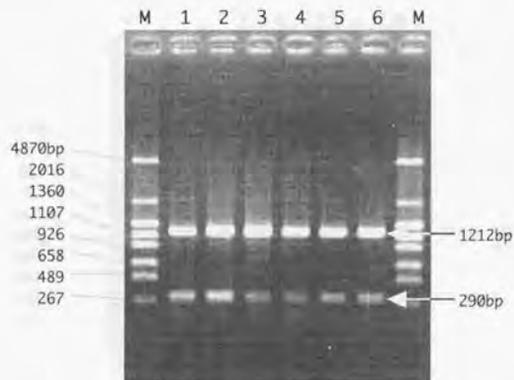


Fig. 4-2. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified with universal primers for *gyrB*

Lane1:SH3-81(CS), Lane2:FPC828(CS), Lane3:FPC840(AY),
 Lane4:FPC924(AY), Lane5:FPC808(RT), Lane6:FPC814(RT),
 LaneM:pHY marker

CS:Coho Salmon, AY:Ayu, RT:Rainbow Trout

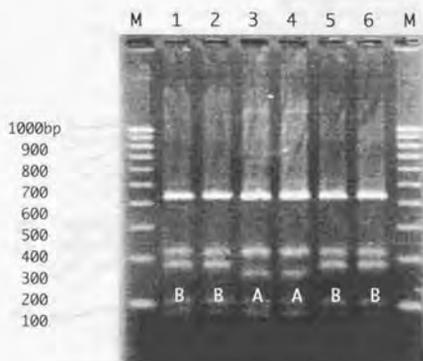


Fig. 4-3. Agarose gel electrophoresis of RFLP of *gyrB* PCR products amplified with *gyrB* universal primer pair (*Hinf* I digested)

Lane1:SH3-81(CS), Lane2:FPC828(CS), Lane3:FPC840(AY),
 Lane4:FPC924(AY), Lane5:FPC808(RT), Lane6:FPC814(RT),
 LaneM:100bp ladder marker
 CS:Coho Salmon, AY:Ayu, RT:Rainbow Trout

```

FPC828 1:CATGCCGGCGGGAAGTTCGACTCGAAAGCCTTAAAAAATCAGTAGGACTAAATGGGGTT 60
FPC840 1:CATGCCGGTGGGAAGTTCGACTCGAAAGCCTTAAAAAATCAGTAGGACTAAATGGGGTT 60
*****

FPC828 61:GGTACCAAAGCAGTAAATGCACCTTCTCATTATTTTCGTGTAGAATCTGTTTCGTGATAAC 120
FPC840 61:GGTACCAAAGCAGTAAATGCACCTTCTCATTATTTTCGTGTAGAATCTGTTTCGTGATAAC 120
*****

sense primer
FPC828 121:CAACAAAAAGCGGCCGAATTTCTGCAGGAAATCTTACACTCGAAGAAGATATTATTGAA 180
FPC840 121:CAACAAAAAGCGGCCGAATTTCTGCAGGAAATCTTACACTCGAAGAAGATATTATTGAA 180
*****

FPC828 181:AGCACAAAACGTAAAGGCACAAAAGTTTCCTTTATTGCCGATGAAGTCATTTTTAAAAAC 240
FPC840 181:AGCACAAAACGTAAAGGCACAAAAGTTTCCTTTATTGCCGATGAAGTCATTTTTAAAAAC 240
*****

FPC828 1021:TTGCGTGGTAAGCCTCTAAATTCCTACGGAATGTCGAAGAAAATCGTGACGAAAACGAA 1080
FPC840 1021:TTGCGTGGTAAGCCTCTAAATTCCTACGGAATGTCGAAGAAAATCGTGACGAAAACGAA 1080
*****

FPC828 1081:GAATTTAATTTATTACAAGCGGCTTAAATATCGAAGAAAGTATGGAAGATTTGCGTTAC 1140
FPC840 1081:GAATTTAATTTATTACAAGCGGCTTAAATATCGAAGAAAGTATGGAAGATTTGCGTTAC 1140
*****

antisense primer
FPC828 1141:AACAACATTGTAATTGCAACCGATGCAGACGTGGATGG 1178
FPC840 1141:GACAACATTGTAATTGCAACCGATGCCGATGTCGACGG 1178
*****

```

[sense primer]

PSY-G1F:5'TGCAGGAAATCTTACACTCG 3'

[antisense primer]

5' ACAACATTGTAATTGCAAC 3'
 complemented

PSY-G1R:5'GTTGCAATTACAATGTTGT 3'

Fig. 4-4. Design of specific primers for PCR amplification of *F. psychrophilum gyrB*

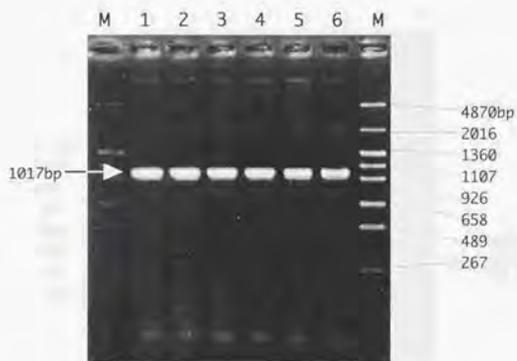


Fig. 4-5. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified with specific primers for *gyrB*

Lane1:SH3-81(CS), Lane2:FPC828(CS), Lane3:FPC840(AY),
Lane4:FPC924(AY), Lane5:FPC808(RT), Lane6:FPC814(RT),
LaneM:PHY marker

CS:Coho Salmon, AY:Ayu, RT:Rainbow Trout

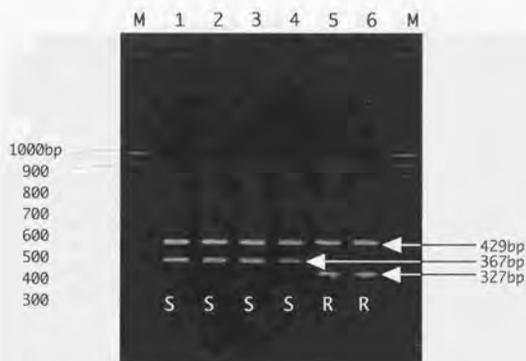


Fig. 4-6. Agarose gel electrophoresis of RFLP of *gyrB* PCR products amplified with *gyrB* specific primer pair (*Rsa*I digested)

Lane1:SH3-81(CS), Lane2:FPC828(CS), Lane3:FPC840(AY),
Lane4:FPC924(AY), Lane5:FPC808(RT), Lane6:FPC814(RT),
LaneM:100bp ladder marker

CS:Coho Salmon, AY:Ayu, RT:Rainbow Trout

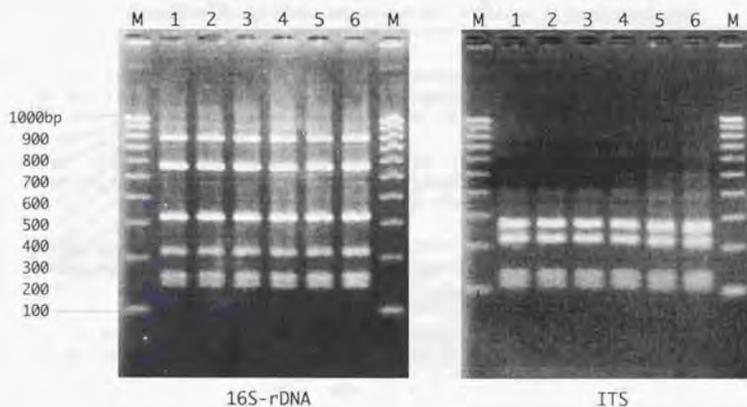


Fig. 4-7. Agarose gel electrophoresis of RFLP of 16S-rDNA and ITS region PCR products(*Hinf* I digested)

Lane1:SH3-81(CS), Lane2:FPC828(CS), Lane3:FPC840(AY),
Lane4:FPC924(AY), Lane5:FPC808(RT), Lane6:FPC814(RT),
LaneM:100bp ladder marker

CS:Coho Salmon, AY:Ayu, RT:Rainbow Trout



GYR-2

FPC828 1: CATGCTGGCGGCAAGTTCGACAAGGCAAAATTTAACGAAGCATTACTATCGCTAAAAAAA 60
 FPC840 1: CATGCAAGGGGCAAGTTCGACAAGGCAAAATTTAACGAAGCATTACTATCGCTAAAAAAA 60

FPC828 61: GGTAGCCAGAGCAATGGGAAAATGGTTAGAAGACGAAAAAGAATCATGCAAAAGTACT 120
 FPC840 61: GGTAGCCAGAGCAATGGGAAAATGGTTAGAAGACGAAAAAGAATCATGCAAAAGTACT 120

FPC828 121: AAAGAACAATGTACAGTACCATGATACAGTCAGGTTTTATACCACACAAGCAGAAGCA 180
 FPC840 121: AAAGAACAATGTACAGTACCATGATACAGTCAGGTTTTATACCACACAAGCAGAAGCA 180

FPC828 181: AAGTTTAACTACGAATTAGAAAAATAACAAAGTTACCTTCGATGTGGTTCTGTGCCATAT 240
 FPC840 181: AAGTTTAACTACGAATTAGAAAAATAACAAAGTTACCTTCGATGTAGTTCTGTGCCATAT 240



GYR-1R

FPC828 241: TCAACTATCGAAGACAAAAAAGTAGAACCTACGGATGCCGACGTAGACGG 290
 FPC840 241: TCAACTATCGAAGACAAAAAAGTAGAATCTACCGATGCCGACGTAGACGG 290

*Hinf*I

Fig. 4-8. Sequences of non-specific PCR products amplified with *gyrB* universal primer pair

Table 4-1. Relationship between host and PCR-RFLP, amplified with *gyrB* universal primer pair and digested with *Hinf* I

Host	RFLP type			Total
	A	B	ND	
CS	0	11	0	11
AY	50	16	2	68
RT	0	38	0	38
Amago	0	8	0	8
Iwana	0	1	0	1
Yamame	0	4	0	4
Oikawa	0	3	0	3
Carp	0	2	0	2
Grayling	0	2	0	2
Ugui	0	1	0	1
Tench	0	2	0	2
Salmon	0	3	0	3
Unknown	0	3	0	3
Total	50	94	2	146

CS:Coho salmon, AY:Ayu, RT:Rainbow trout
 ND:Not determined

Table 4-2. Relationship between host and PCR-RFLP, amplified with *F. psychrophilum gyrB* specific primer pair and digested with *RsaI*

Host	RFLP type			Total
	R	S	ND	
CS	5	5	1	11
AY	8	58	2	68
RT	33	3	2	38
Amago	0	8	0	8
Iwana	0	1	0	1
Yamame	0	4	0	4
Oikawa	0	3	0	3
Carp	0	2	0	2
Grayling	1	1	0	2
Ugui	0	1	0	1
Tench	0	2	0	2
Salmon	1	2	0	3
Unknown	3	0	0	3
Total	51	90	5	146

CS:Coho salmon, AY:Ayu, RT:Rainbow trout
 ND:Not determined

Table 4-3. Relationship between host and RFLP-profile

Host	RFLP type									Total
	A			B			ND			
	R	S	ND	R	S	ND	R	S	ND	
CS	0	0	0	5	5	1	0	0	0	11
AY	6	44	0	2	14	0	0	2	0	68
RT	0	0	0	33	3	2	0	0	0	38
Amago	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8
Iwana	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Yamame	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4
Oikawa	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3
Carp	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
Grayling	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2
Ugui	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Tench	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
Salmon	0	0	0	1	2	0	0	0	0	3
Unknown	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3
Total	6	44	0	45	46	3	0	2	0	146

CS:Coho salmon, AY:Ayu, RT:Rainbow trout
 ND:Not determined

第5章

プラスミドプロファイルによる *Flavobacterium psychrophilum*の型別

序論

かねてより *F. psychrophilum* には概ねの塩基数によって分類できる複数のプラスミドが存在することが知られていた。Chakroun *et al.* (1998)によるとヨーロッパのニジマス由来株の多くが約3.5 kbpのプラスミドを持つとされており、このニジマス由来株に特異的なプラスミドは、ニジマスに対する病原性ととの間に相関があることも示唆されているが、このプラスミドの塩基配列およびその機能は未知のままである。また、同じくChakrounらによるとアユ由来株に特異的なプラスミドが存在することも確認されているが、彼らの使用した株が徳島県で同時期に分離された4株のみに限られており、このアユ特異的なプラスミドについてもその塩基配列および機能は未知のままである。

そこで、本研究ではニジマス由来株とアユ由来株についてそれぞれ特異的なプラスミドの塩基配列を求め、これに基づいて特異的なプライマーペアを設計することにより、プラスミドを抽出することなくPCRによるプラスミドの型別方法を確立し、これを用いて、より多くのアユ由来株を含む、日本で様々な魚種から分離された *F. psychrophilum* のプラスミド型別を試みた。

材料と方法

細菌

プラスミド抽出用の菌株は200 ml TYE液体培地で18℃、24~36時間培養し、PBS(-)で3回洗浄後プラスミドの抽出に供試した。PCRのテンプレート用の菌株は*F. psychrophilum* 133株を使用した。フリーズストックをTYE寒天培地で18℃、24~36時間培養しテンプレートDNAの抽出に供試した。

プラスミド抽出

プラスミドの抽出には大腸菌を用いたDNAクローニング等で一般的に用いられているプラスミドの抽出方法を応用した (Kado and Liu 1981)。200 ml TYE液体培地で培養した*F. psychrophilum*のペレットに200 μ l lysozyme (SIGMA Cat. # L-6876) solution (5 mg/ml FET buffer (50 mM fructose, 25 mM Tris [pH 8.0], 10 mM EDTA [pH 8.0])) を加え、室温に5分間おいた後、400 μ l 0.2 N NaOH, 1% SDS を加えた。氷上で5分間おいた後、氷冷した300 μ l の 3 M NaAc [pH 5.2]を加え、中和した。再び氷上で5分間おいた後、10000 rpmで5分間遠心分離し、上清を新しいチューブに移した。上清に900 μ l の phenol/chloroformを加え、10000 rpmで2分間遠心分離し、上清を新しいチューブに移した。上清に900 μ l の2-propanolを加え、室温に5分間おいた後、10000 rpmで5分間遠心分離し、上清を新しいチューブに移した。上清に1 ml の70% EtOHを加え、10000 rpmで2分間遠心分離し、上清を廃棄し5分間真空乾燥した。乾燥後のペレットに300 μ l のTEと15 μ l のRNaseA (1 mg/ml) を加え、37℃で20分間インキュベートした。300 μ l の phenol/chloroformを加え、10000 rpmで2分間遠心分離し、上清を新しいチューブに移した。300 μ l のCHCl₃を加え10000 rpmで30秒間遠心分離し、上清を新しいチューブに移した。6 μ l の5M NaCl と600 μ l の-20℃に冷やした EtOHを加え-80℃で20分以上おいた後10000 rpmで10分間遠心分離し、上清を廃棄した後5分間真空乾燥したものを100 μ l のTEに溶かした。100 μ l の1.6 M NaCl を含む13% (w/v) PEG (Wako Poly-

ethylene Glycol 6000 Cat. # 169-09125) を加え15000 rpmで10分間遠心分離し、上清を廃棄した後5 μ lの5 M NaClと200 μ lの EtOHを加え10000 rpmで10分間遠心分離し、上清を廃棄した後5分間真空乾燥したものを100 μ lの1/10 TE に溶かした。

プラスミドの電気泳動

抽出した *F. psychrophilum* のプラスミドは1%アガロースゲル電気泳動により、プラスミドの有無、およびそのおおよその塩基数を確認した。使用機器などは第1章のPCR産物の電気泳動と同じものを使用した。ただし、泳動条件は50V、90分間で、マーカーとしてSupercoiled DNA Ladder marker (GIBCO BRL Cat. # 15622-012) を使用した (Rochelle *et al.* 1985)。

PCR用テンプレートDNAの抽出法

テンプレートDNAの抽出には第1章以降で用いているChelex100を使用する方法を応用した。すなわちTYE寒天培地上に発育した *F. psychrophilum* を1白金耳1.5 ml エッペンドルフチューブに取り、5% Chelex 100 溶液を300 μ lを加え、56 $^{\circ}$ Cで30分インキュベートし、約10秒激しく攪拌し、さらに100 $^{\circ}$ Cで20分インキュベートし、15000 rpm、4 $^{\circ}$ Cで10分遠心分離した上清をテンプレートとした。テンプレートは4 $^{\circ}$ Cで保存された。

プラスミドの塩基配列決定

ニジマス由来株のFPC814とアユ由来株のFPC840のプラスミドの塩基配列を決定した。プラスミドのサブクローニングは第4章でのPCR産物のサブクローニングで用いた方法と同様とした。FPC814株は *Hind* III と *Hinc* II で制限酵素処理したDNA断片をサブクローニングし、FPC840株は *Hind* III と *Eco* R I で制限酵素処理したDNA断片をサブクローニングした。クローニングベクターには

pUC19 (Takara Cat. #3219) を用い、pUC19の脱リン酸化処理にはTakara Alkaline Phosphatase (Takara Cat. # 2120) を用いた。制限酵素処理は第4章のPCR-RFLPで用いた方法と同様の方法を用い、脱リン酸化処理は、製品に添付の説明書などを参考に一般的な方法に従った。すなわち、制限酵素処理したクローニングベクターpUC19、10 μ l、 $\times 10$ Buffer 5 μ l、BAP (0.3-0.6 unit/ μ l) 2 μ lに滅菌超純水で50 μ lまでメスアップした溶液を37 $^{\circ}$ C、30分の反応温度と時間で反応させ、その後、フェノールクロロフォルム処理によって精製した。塩基配列の決定には第4章と同じくDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Cat. # 402079) と、ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer) を使用した。

プライマーの設計

FPC814株のプラスミドの塩基配列を基にニジマス由来株に特異的なプライマーペアp814-4とp814-5を設計した (Fig. 5-2, 3)。それぞれの塩基配列は、p814-4が5'-CCGATGATTATACTCGGATTAATTCGCG-3'、p814-5が5'-GAATTTA-TAATAATTAATTCGGAAGC-3'とした。

FPC840株のプラスミドの塩基配列を基にアユ由来株に特異的な2組のプライマーペアp814&840-3、p840-6とp840-8、p840-10を設計した (Fig. 5-6, 7)。それぞれの塩基配列は、p814&840-3が5'-GAACTATCGCTTTGCGTCGTTCCC-3'、p840-6が5'-GATTTGAATTAGATTATTTGAAACCC-3'、p840-8が5'-CA-GAGAACATCGTATCGTTT-3'、p840-10が5'-CTCAAAGTCAAAAATAAAAAT-CAGGCAATT-3'、とした。

また、これらのプラスミドによる型別に用いたプライマー以外に、FPC814株のプラスミド、FPC840株のプラスミドの塩基配列の決定のためにp814-1、p814-3、p814&840-4、p840-5、p840-9のプライマーを用いた (Fig. 5-3, 7)。

PCR条件

使用機器、試薬及び電気泳動条件は、第1章以降の方法とおなじ方法を用いた。ただし、PCRサイクルの条件はdenaturation 94℃、30秒、annealing 51℃、60秒、extension 72℃、2分を30サイクル、さらにfirst denaturation 94℃、5分、last extension 72℃、5分とした。

結果及び考察

PCRを用いたプラスミド型別法の確立

主に日本で分離されたニジマス由来株11株からプラスミドを抽出し電気泳動によりその概ねの塩基数を確認した。その結果、10株で約3.5 kbpのプラスミドが確認され、日本のニジマス由来株にも約3.5 kbpのプラスミドを持つものが多いと思われた (Fig. 5-1)。そこで、その中のFPC814株のプラスミドをpFPC814とし、その全長の塩基配列を決定した。その結果、実際の塩基数は3409 bpであった (Fig. 5-2)。この塩基配列を基にp814-4とp814-5のプライマーペアを設計しPCRに使用した (Fig. 5-3)。その結果、ニジマス由来株に多いと思われた約3.5 kbpのプラスミドは、p814-4とp814-5のプライマーペアによる1回のPCRで全ての約3.5 kbpのプラスミドを持つとおもわれる菌株から予想された673 bpの塩基数のPCR産物の増幅が確認できた (Fig. 5-4)。

同様にアユ由来株12株からプラスミドを抽出し電気泳動した結果、9株で約4.1 kbpのプラスミドが確認され、アユ由来株には約4.1 kbpのプラスミドを持つものが多いと思われた (Fig. 5-5)。そこで、その中のFPC840株のプラスミドをpFPC840とし、その塩基配列の一部 (pFPC840/1) を決定した (Fig. 5-6)。この塩基配列を基にp814&840-3、p840-6と、p840-8、p840-10、の2組のプライマーペアを設計しPCRに使用した (Fig. 5-7)。その結果、アユ由来株に多いと思われた約4.1 kbpのプラスミドは、p840-8、p840-10のプライマーペアによる1回のPCRでは、約4.1 kbpのプラスミドを持つことが分かっている菌株からのPCR産物の増幅が確認できないものがあったので、p814&840-3、p840-6のプライマーペアで第1段階のPCRを行い、p840-8、p840-10のプライマーペアで第2段階のPCRを行うnested-PCRで、全ての約4.1 kbpのプラスミドを持つとおもわれる菌株からPCR産物の増幅が確認できた (Fig. 5-8)。

これらのことから、ニジマス由来株に多いと思われた約3.5 kbpのプラスミドとアユ由来株に多いと思われた約4.1 kbpのプラスミドはそれぞれ1回のPCRとnested PCRによって煩雑なプラスミド抽出を行うことなくその存在が確認できることがわかった。

アユ由来株のFPC840から抽出されたプラスミドに関しては、ChakrounらがおなじFPC840が約3.7 kbpのプラスミドを持っていることを報告している(Chakroun *et al.* 1998)。しかし本研究では約3.7 kbpのプラスミドは抽出されず約4.1 kbpのプラスミドが抽出された。FPC840株のプラスミド断片であるPFPC840/1の塩基配列を基に設計したアユ由来株に特異的な2組のプライマーペアp840-8、p840-10によって増幅されたPCR産物が約2.1 kbpであり、p840-8、p840-10のポジションがそれぞれPFPC840/1上で80-99と2132-2159に位置することから、アユ由来株のFPC840がやはり約4.1 kbpのプラスミドを持っていることは間違いないと思われた。

PCRを用いたプラスミドの型別

これらのプライマーペアを用いてPCRによる*F. psychrophilum* 162株のプラスミドタイピングを行った。

その結果、供試したアユ由来株77株中、約4.1 kbpのプラスミドを持つものはおよそ半数の36株で、約3.5 kbpのプラスミドを持つ株はみられなかった。また、約4.1 kbp、約3.5 kbpのプラスミドの両方を持たない株は41株であった。このことから、やはりアユ由来株中には約4.1 kbpのプラスミドを持つ株が多いと思われた。

ニジマス由来株40株中、約4.1 kbpのプラスミドを持つものは4株で約3.5 kbpのプラスミドを持つ株は27株であった。また、約4.1 kbp、約3.5 kbpのプラスミドの両方を持たない株は4株で、両方を持つと思われた株が1株存在した。

ギンザケ由来株11株中、アユ由来株に多いと思われた約4.1 kbpのプラスミドを持つものはなく、ニジマス由来株に多いと思われた約3.5 kbpのプラスミドを持つ株は1株であった。また、約4.1 kbp、約3.5 kbpのプラスミドの両方を持たない株は10株であった。

その他の魚種由来株ではアマゴ由来の13株中約4.1 kbpのプラスミドを持つものが4株みられたのが特徴的で、その他の株では約4.1 kbp、約3.5 kbpのプラスミドの両方を持たない株が多かった (Table 5-1)。

これらのことから、プラスミドによる型別も、宿主魚種との相関性が高いこ

とが分かった。

日本のニジマス由来株の多くから抽出された約3.5 kbpのプラスミドは、その塩基数からChakrounらがヨーロッパのニジマス由来株から抽出したものと同じものであることが考えられた。また、Lorenzenらによるとデンマークのニジマス由来株の多くが約3.2 kbpのプラスミドを持つとされているが、本研究ではニジマス由来株からは約3.2 kbpのプラスミドは抽出されなかった。これはChakrounらが指摘するとおり、Lorenzenらが電気泳動によりその塩基数を推定するときの誤差だと思われた (Lorenzen et al. 1997)。また、ニジマス由来株の多くにはChakrounやLorenzenらが指摘するとおり、約20 kbpと思われる大きなサイズのプラスミドが存在しており、アユ由来株にも4.1 kbpのプラスミドと、それより少し小さいサイズのプラスミドを共有していると思われる株もみられた (Fig. 5-1, 5-5)。今後、これらのプラスミドの塩基配列も明らかにすることにより、より詳細なPCRによるタイピングが行えるものと思われた。

今回の研究で分かったpFPC814とPFPC840/1の塩基配列を基に、インターネットの遺伝子データベースとの相同性検索を行ったが、既知の病原遺伝子あるいは薬剤耐性遺伝子との相同性のある配列は見つからず、その機能は現時点では不明のままである。また、pFPC814とPFPC840/1の塩基配列中には約98%と高い相同性を持つ配列が確認されており、このことが示す意義については今後の検討課題であった。

また、アユ由来株に多いと思われた約4.1 kbpのプラスミドは1回のPCRで検出できないものがあったが、これは、*F. psychrophilum*内の約4.1 kbpのプラスミドのコピー数が少ないためかもしれない。

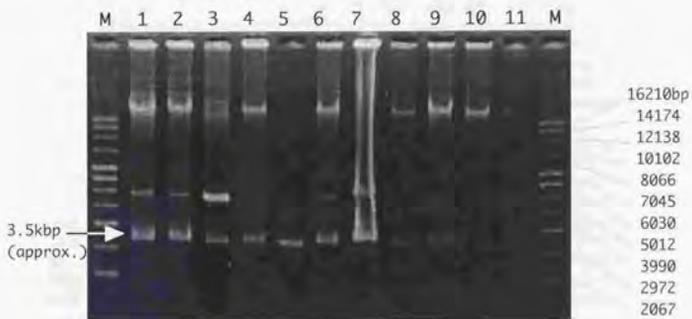


Fig. 5-1. Agarose gel electrophoresis of purified plasmid from *F. psychrophilum* isolated from rainbow trout

Lane1-11: FPC805, FPC807, FPC808, FPC813, FPC814, FPC939, FPC942, FPC944, 95-14', 96-29, I-46 LaneM: Supercoiled DNA Ladder

1' ATGAAAATACTGAAAGAAATATAAATAAATCGAAGATTGAAATAGATATTTGAAAC
 61' CCATAAATGTAATAATGTTGATGTACATAAAAATTCGATGATGATTTAACGATGAAA
 121' ACAACTCTAAAGTAATATCTAATATTAAGGGAATTCAGCAATAGAAAACCTCAATTTAC
 181' AAAACATTGAGGAAAATAAAAAATTAATGAAACAATAAATAAACAAGAAAATGCAATAA
 241' AATTTGGAAAGAAACAAAATGAAATTTAGAAAAAGAAAAAAGAAATATCATAGATGTA
 301' TGGAAAAATTAACCGTAATATGAAAGTGGAAAAAATCTTAATGGCAAAAAACCTACA
 361' TAAATTTATCAGTTGAAGAAACGAAAAACTATTTATTTAATACCTTAATATTTTAT
 421' AATCTCGTGCGACCTGCCGTGGGGCGACTCAAAAATAAAAATAAAACCCCTCTAATTTA
 481' GATACAAATAGAGTGGGTTTTATTTATTTTGGATTAATCTAAATAGTTTTTTGATG
 541' TAAATCGTCTTCAATTTATCGGAATAATCGAGTATAATCATCGGACACATTAATAA
 601' TAAATCATTTAAAATATTATAAAGGGGAAAAGCCTCGTGATATTAAAGGGAAGTTTTATA
 661' CTTTTTTTTAGCATCAAAATAAATTTATTTTTACGAAATGTTTTTTGTTTTGAAAGCAT
 721' CGCATCGGCTACATCGTAGGCAATCGAACGATATTATTTTATEATTTGACCCAAGGGAGC
 781' TGGTAGGTCATATACCTGTTCTAATAATCTTGACGCTGCGTTAATGGTGTGAGCATCAA
 841' TTTAATTTCTACTTTCATACACCCAACCTTTTTTATAAAAACACCTCTTAAATAGCTT
 901' GGTATATCTTTAGTAAGTGTATTTTTATTTGTCGAATACCTCAAGCAAGTATTTTTT
 961' TCGGCTCAAAATCTTTATAAATTTAAGCGCCATAAATGTCGAATTCAGGAGATAAT
 1021' CCGAAGCTTCAATAGCTTTATCTCTTTGCAATTTGGGGTAAATCGGAAAATAGGG
 1081' ACATCACTCGCAACAATTTAATTTGCTAGGTTTAAAGAATCAATAACAATAAGG
 1141' GTATTGTAAGACGCTGAGCGAACCTTGGTAACTATAATCAAAACGAATATCTGATTTT
 1201' TCATTTATTTGTTTTGGCAACATCAAAAATTTTTTTAAGCGCTGTTGCATTTTCG
 1261' TAGGTATCTTTCCATCTTATCAATTAATCAAGCATTTTTTAAATTCATCTAAAGGC
 1321' ATTTGGGTTAAATTTCAATTTGATATGACAAAGCAACTACTGTAGAGTCTTTGGCATAT
 1381' TTAGAAGTACAATCAAACTGATTTAATTTAAGGAGGTAATAATCTCTTTAATCT
 1441' AAAAAAATATGCTTTGCTATTTGATTAATCAACACTCCGAAAGCCCTGTATTTAGATA
 1501' GTATTTCAACCTTTGACCAAAAGCAAAATTTGTTTTAACTCTTTTCTGCTGCTTTCAA
 1561' CATTCTACACCAAAATCTTGGTAGACTCTTAATTTGATAGTTCCACTTTTCTT
 1621' AGTTAGAGCTCTATATCTAAGGCACTAATGATATATCTTTATCTACGGCATCATCTT
 1681' TTCGAGAGAACTTAACAACATAAATAGTATATCTAAGTCAAGCGGTTACGTCAAATCT
 1741' ACCTGAAATAGAAATTAATCTCATCAATTTTTTTTCCGCACTAACATCTAATAAATC
 1801' CATAACAGATATTAATTTGTTTTACAAATTTACTAAAAAATTTCCAAAAATAAACAT
 1861' CTTTAAATAAACTTCTTTTTCGCTATAAAAACTTCTTTTCGCTATAAAAACTTCTT
 1921' TCGCTTATAAAAACTTCTTTTTCGCTATAAAAACTTCTTTTCGCTCGTAACCTGCTG
 1981' ATTTTCAATAGCTGTACCCCTTAAATAAAGAAATAAAGAAATAAGAAAAACAGTAGC
 2041' GCGAAGATTTGTTTTTTCGGTTTTTATTTGGTTGAAATCCCAAAAATTCGTTCCAGAA
 2101' AAAAAATCCAAAAAGAAAAACAATAAAAAAATAAAAAAGAAAGATTGAAAGTAAACAGGG
 2161' GCGGGCGGGGGGTTTTTGTATGCTTTTTAAAGCTTTTTTGTATTTTAAAGGTTTTG
 2221' AGTAAAAATATAAGTCTAAAAAACAAGCTTTAAACGCTTTAAATGCTTTTAAAGTA
 2281' AATTAATAAACTTCTTTGGACTTTTTTCTAATAATGCCATAAGCAGACAGAAACAATA
 2341' ACGGTTACAGTATTCGTTAATCTATAAACGATACGATGTTCTGTTTATCTCTT
 2401' GAAAAAGTTCTTCGGAATAGTGTATTAGTATTCTAGTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 2461' TGTTCGGAAGCTGCTCAAAAAGAGATTTAATTTTTTTAAACAGACTATCGCCTGAT
 2521' TTTTTAAGAAATAGCAATATCGGTTCTGCTTGAGCAGAAAAATCTATAATAAATCTATA
 2581' AACCTAAAAAATCTTTAAATCTCTTTTGAATTTCTGTAACCTGCCATTTTGGACTT
 2641' GTTCGATGGAATTAATCAATTTTTGCGTAAAAATTCAGCTCTGTCATCAGCGTATCATCT
 2701' CTAACACAGGAACATAATTTATAGCTTTTTATTTTACCTCTTGAAAGATTACTGTCGAT
 2761' TGGTATCTTATAAATCAAAATATTTTTTGTATGATCTCAAAATCTCTACTACTAATAA
 2821' CTATCATAACTTTTATTTTTGTGACCAAAATGGTACAAAATATATGAAATTAGTAAAAATA
 2881' AAAGACTTAAAAATAATTTCTTTTTCGATGAATGAAAGGGCATTATAAGCTCTTTT
 2941' TCGGACTTTTTCTGAATATTTTTTGTCTTTTTGAACTTTTTGGGAGAAATGTAAGT
 3001' AGAAGCAAGAGGGGAACGACGCAAAAGCGATGTTCAATTTATAAAGTCTGATATTTAGT
 3061' GTTTAGTTTTTTGCTATTTTATAAATATCTCTTAAAAAGGTAACCTTTTATTAATAT
 3121' TTTTTAAAACTCATAATATCAATATTTATATTTTATTTTGGGGATAAATAAAAAAGATAA
 3181' TTATGCTTGAAATTTAAAAATAACAAGGAATCTAAAAACGGCTTAGAATGGCTTAAAA
 3241' AAAATTAATCTTTTAACTATATAGCATTGCAATTTGATACGCAATCCAAATTTTTAAAA
 3301' AATAAATATTTCCCAAGAGAAAGAAATTTATAAATAATTTTCGGAAGCAATTTAAT
 3361' TTAATAAATGAATGTTTTAAAAATAGATGAATTTGAAAAAAGAAA

Fig. 5-2. The nucleotide sequence of pFPC814.

pFPC814 is cloned from pFPC814(RT specific plasmid) of *F. psychrophilum*. The nucleotide sequences of the primers are highlighted.

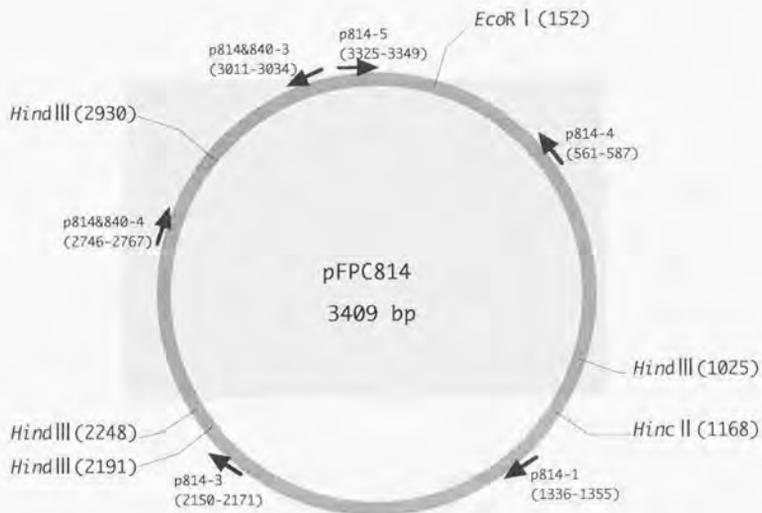


Fig. 5-3. Map of pFPC814 (RT specific plasmid).

Primers of p814-1, p814-3, p814&840-3 and p814&840-4 were used for determination of pFPC814 sequence.

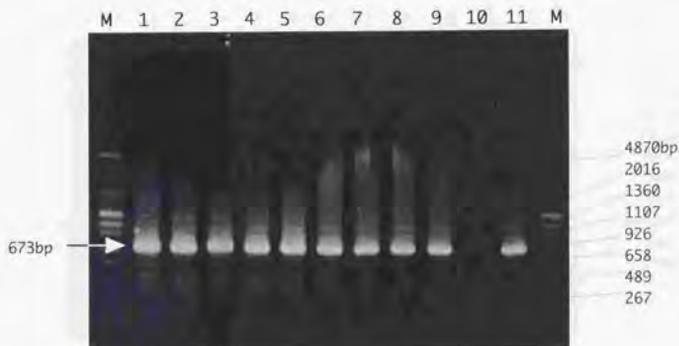


Fig. 5-4. Agarose gel electrophoresis of PCR products from *F. psychrophilum* isolated from rainbow trout

Lane1-11: FPC805, FPC807, FPC808, FPC813, FPC814, FPC939, FPC942, FPC944, 95-14', 96-29, I-46 LaneM: λ-DNA marker

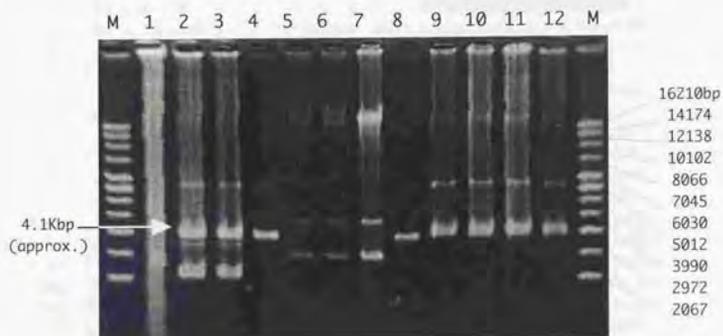


Fig. 5-5. Agarose gel electrophoresis of purified plasmid from *F. psychrophilum* isolated from ayu

Lane1-12:FPC837, FPC838, FPC839, FPC840, FPC841, FPC842, FPC955, FPC956, SA9501, SA9601, PT97022, PT97025, LaneM:PHY marker

1' CTTTGTGGACTTTTATTTTAAATAATGCCATAAGCAGACAAAACCAAAACGGTAC
 61' GTATTCGTGAATTCATTAACGATACCATGTTCTCTTTTATTCTCCTTGAAAAAGTT
 121' TCCTCGGAATAGTGTTTAGTATTTCTAGTTGCTCTGTTCTGTGCGTGGGTGTTCCGAA
 181' AGCTCGCTAAAAGAGATTTTAAATTTTTTAAAAACAGCCTTATCGCCTGATTTTTAAGA
 241' ATAGCAATATCCGTTTCTGCTTGAGCAGAAAAATCTATATGATAACTCATAACTAAAA
 301' AACTTTTTAAATCTTCTTTGCAATTCTCGTAACCTGCCATTTTGGCTGTTCGATGG
 361' ATTTATCAATTTTGGCGTAAAATTCAGCTTCTGTCATCAGCGTATCATCTCTAATACAG
 421' GAACTAATTTATAGCTTTTATTTTACCTCTTTGAAATGATACCTGCTCATGGTATTA
 481' TTAATCAAAAATTTTTTTGATGATCTCTAAATCTCTACTGCTAATTAATCATATAA
 541' CTTTTATTTTTGTGACCAATTTGGTACAAAATATGAAAATTAGTAAAAATAAAGACTTA
 601' AAAAAAATTTCTTTTTGATGAATGAAAGGCCATTATTAAGCTTCTTTTTCGGACTTT
 661' TTTCTGAATTTTTTTGCTTTTTTGAACTTTTGGGCAGAATGAGAAAAAGCAAG
 721' AGCGAAGCGCCAAAGCGATAGTTGATTTTTATAAAGTCTGATTTTGTAGCTTTAATTT
 781' TTTTGTATTTTATAAATATCTTAAAAAGGATAATTTTTTATTAATTTTTTAAAA
 841' CTCATAATATCAATATTTTACATTTTTTGGGGATAATAAAAAAGGATAATTAATGCTT
 901' AAAATTTAAAAATAACAAAGGAATCTAAAAACGGCTTAGAATGGCTTAAAAAATTTAT
 961' CTTTAAACCTTATAGCAATGCAATGATACTGCAATCCAATTTTTAAAAATAATAATA
 1021' TTTCCCAAGAGAAAAGAAATTTAATAAATTTTGGAAAGCAATTTAATTTTTAAAAATG
 1081' AATTTGTTTTTAAAATAGATGAATTTGAAAAAAAAGAAAATGAAAATCTGAAAGATAA
 1141' TTAATTAATCGAAATTTGAATAGATTTTGAACCCATAAATGTAATTTGTTTG
 1201' ATGTACATAAAAATTCGATTGATGATTTTAAACGATAAAAACAACCTAAAGTAATATCTA
 1261' ATATTATAGGGAATTCAGCAATAGAAACCTCCAATTTCAAAAACATTGAGGAAAAATAAA
 1321' AATTAATGAAACAATAAATAAACAGAAAAATGCAATAAATTTTTGAAAGAACAAAATG
 1381' AAATTTAGAAAAAGAAAAAAGAAATATCATAGATGATGGAAAAATTAACCGTAATA
 1441' TGAAGGTGAAAAAATTTAATGGGCAAAAACCTACATAAATTTATCAGTTGAAGAAA
 1501' CGGAAAAACTATTTTATTAATACCTAATATTTTTATAATCTCGTGCACCTGGCTG
 1561' GGGCGGACTCAAAAATAAAAATAAACCCCTCAATTTAGATACAAAATAGAGGGGGTTT
 1621' TATTTTATTTTTGAGTGAATTTCTAAATAGTCTTTTGTGTAATCAGCTTCAATTTAT
 1681' CGAGAATTTTATAAATTTAAAAAGGAGGGAACCTTTTTTGTAAAAATTCATCAA
 1741' ATCAATTTGATTTTATATATAAATTTCAACAGTACTTATTTATATTTTACAAAAACG
 1801' CTTATAAACTTCTACTTCTGTTTCAAGCAACTATAAACCTCATCATCCATTGGCGAAAA
 1861' TCTGCTTTACGAAATCTCYAAGCTGTCTAGTAAAAAATTTCAACATTTTTTTTCT
 1921' TCAACACCTCATCTATTCACCCACATCTCCATAACTATATTTTTTATTTTTGACAAG
 1981' CCTAAAATCTTATCCATAGCATCTTAAAGCACTCTTTTTAGGTTTTTTACAGTTACT
 2041' TTTTTCGAATTTTTCTCTGCAAGCATTTTTTCAAGCATTAATTAATAGCCCTTAGGG
 2101' TTCGATTTTTTTGAAGCGAGTACACGCAATTTACTCAAGTCAAAAATAAATCAGGCAAT
 2161' TCTTTTGGACATTGCTTAAATAAACGAGATGTTTTTATTTTCAGATCTGAAAAAATATA
 2221' ATTTTCTTGAGATAATTTATATCATCAAATCTAAATCCCAACGTAAGAAACATTTCT
 2281' TTTTAAATGCAAGCTCTAAAACAGGGTCTCTGTTGCGGGTNTGCAACTGGATAAAA
 2341' AT

Fig. 5-6. The nucleotide sequence of PFPC840/1

PFPC840/1 is cloned from pPFPC840(AY specific plasmid) of *F. psychrophilum*. The nucleotide sequences of the primers are highlighted.

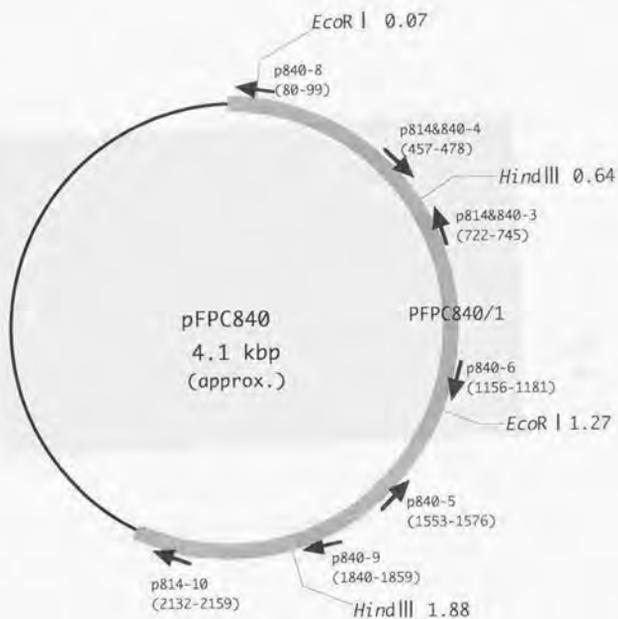


Fig. 5-7. Map of pFPC840 (AY specific plasmid)

Primers of p840-5, p840-9 and p8148840-4 were used for determination of pFPC814 sequence.

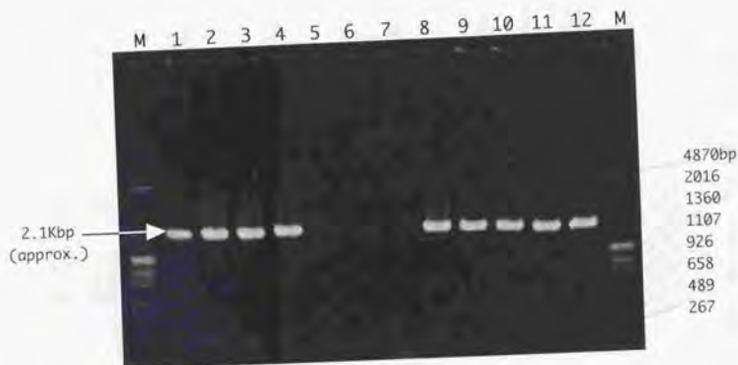


Fig. 5-8. Agarose gel electrophoresis of PCR products from *F. psychrophilum* isolated from ayu

Lane1-12: FPC837, FPC838, FPC839, FPC840, FPC841, FPC842, FPC955, FPC956, SA9501, SA9601, PT97022, PT97025, LaneM: PHY marker

pPFC814 pPFC840-1	2290' CTCTTTGGACTTTTATTTATTAATGCCATAAGCCAGCAAGCAAAAACGGTACAA 1' ..-T-G.....T.....A..C.....	pPFC814 pPFC840-1	3190' AAAATTTAAATTAACAAGGAACTTAAMACGGCTTAGAATGGCTTAAAAAATTTAT 901'
pPFC814 pPFC840-1	2350' GATCTCGCTTAATCGATMAAGCAGACAGATCTCTGTTATCTCGTGGAAAGTT 61'G.....	pPFC814 pPFC840-1	3250' CTTTAAACACTATAGCATGGCAATGATCACTGCACTCAATTTTAAATAATAATA 961'
pPFC814 pPFC840-1	2410' TCTTCGGATAGTGTATAGTATTTCTAGTGTCTGTCTGTGGTGGTTCGAA 121'	pPFC814 pPFC840-1	3310' TTCTCCCAAGAGAAAGAAATTAATAATTTTGGGAAGCAATATTTATTTAAAAATG 1821'
pPFC814 pPFC840-1	2470' ACCTGCTTAAAGAGATTTAAATTTTTTAAACAGACTATGGCTGATTTTTAAGA 181'	pPFC814 pPFC840-1	3370' AATTGTTTTAAATTAGATGAATTCGAAAAAAGAAATGAAATCTGAAAGATAA 1881'
pPFC814 pPFC840-1	2530' ATAGCAATCTGCTTCTGCTTGGGCAAAATCTATATTAATCAATCAATCAAAA 241'	pPFC814 pPFC840-1	3431' TTAATTAATGGAGATTTGATGATTTTGAAACCCGATAATGTAAATTTGGT 1141'
pPFC814 pPFC840-1	2590' AATCTTTAAATCTCTTTTGGCAATCTGCACTGGCACTTTTGGACTTGTGATG 301' ..CT.....G.....	pPFC814 pPFC840-1	3491' ATGACATAAAATTTGATTTGATGATTTTAAAGCAAACTCTAAAGTATATCTA 1201'
pPFC814 pPFC840-1	2650' ATTATCAATTTTGGTAAATTCAGCTCTGTCAATCAGGCTATCATCTTCAACAG 361'	pPFC814 pPFC840-1	3551' ATATATAGGAAATTCAGCAATAGAAACCTCAATTTACAAAATTTAGGAAATATAA 1261'
pPFC814 pPFC840-1	2710' CAACTAATTAAGCTTTATTTTAACTCTTGGACGATACCTGCTGATTTGATCTA 421'	pPFC814 pPFC840-1	3611' AATTAATGACATTAATTAACAGAGAAATGGCAATAAATTTGGAAAGACAAATG 1321'
pPFC814 pPFC840-1	2770' TTAATCAAAATATTTTTTGGATGCTCAAACTCTACTACTAATTAATCAATA 481'	pPFC814 pPFC840-1	3671' AATTTTACAAAAAGAAAAAAGAAATATCATAGATGTATGGAAAAATTAACCGTAA 1381'
pPFC814 pPFC840-1	2830' CTTTATTTTTTGTACCAATTTGGTACAAATATATGAATTAATGAATAAAGACTTA 541'	pPFC814 pPFC840-1	3731' TGAAGTGGAAAAAACTTTAATGGCAAAAACCTACATAAATTTACAGTTGAAGAA 1441'
pPFC814 pPFC840-1	2890' AAAAAATATCTTTTTCGAATGAAAGGAGGCAATTAATAGCTCTTTTTCCGACTTT 601'	pPFC814 pPFC840-1	3791' CGAAAAACTTTTTTATTAACCTTAATTTTTTAAATCTGTGGCACTGGCTGCTC 1501'
pPFC814 pPFC840-1	2950' TTCTCGAATATTTTTTGTCTTTTGAACCTTTTGGCAGAAATGATAGTAGCAAG 661'GAA..A..	pPFC814 pPFC840-1	3851' GGCGCACTCAAAATAAATAAATAAACCCTCAATTTAGATACAAATAGAGTGGGTTT 1561'
pPFC814 pPFC840-1	3010' AGGAAGCAAGCAAGGATGCTTATTTAAAGTCTGATATTAAGTGTGTTAGTTT 721'	pPFC814 pPFC840-1	3911' TATTTATTTTGGTAAATCTAAATAGTTTTTGAATGTAATTCGTTCTTCAATTTAT 1621'C.....AG..
pPFC814 pPFC840-1	3070' TTTTGTATTTAATATCTCTAAAGAGATACCTTTTATATATTTTTTAAAA 781'	pPFC814 pPFC840-1	3971' CGAGAAATAT 1681'
pPFC814 pPFC840-1	3130' CTAATATCAATTTATATATATTTTTTGGGATTAATAAAGGATATATGCTG 841'		

Fig. 5-9. Alignment of homological sequences between pPFC814 and pPFC840/1

Table 5-1. Relationship between plasmid-type and host

Host	Plasmid type				Total
	4.1 kbp plasmid	3.5 kbp plasmid	4.1 and 3.5 kbp plasmid	None	
CS	0	1	0	10	11
AY	36	0	0	41	77
RT	4	27	1	8	40
Amago	4	1	1	7	13
Iwana	0	0	0	1	1
Yamame	0	0	0	4	4
Oikawa	0	0	0	3	3
Carp	0	1	0	1	2
Grayling	0	1	0	1	2
Ugui	0	1	0	0	1
Tench	0	0	0	2	2
Salmon	0	0	0	3	3
Unknown	0	2	0	1	3
Total	44	34	2	82	162

ND:Not determined

CS:Coho Salmon, AY:Ayu, RT:Rainbow Trout

終章

総合考察

日本の冷水病はその発生が徳島県のアユ養殖場ではじめて確認されてから10年以上が経つ。この10年間でその発生による経済的損失、被害地域および宿主域は拡大の一途をたどり、現在では湖や河川といった天然の水系でも発生が報告されるなど、生物環境的な被害の面でも大きな問題となっている。ワクチン開発、抗生物質・抗菌剤開発技術の発達した現代においては、単一の感染症がこれほどの長い期間、その猛威を振るうことは稀である。以前、アユでその被害が甚大であったピブリオ病の流行も、有効なワクチンの開発などにより、冷水病に比べると短期間で終息し、いまではほとんどその発生が知られていないことを考えると冷水病がきわめて異例の細菌性魚類疾病であるといえる (Kawano et al. 1983)。

一般に冷水病のような感染症対策として、感染成立の3要因、感染源・感染経路・宿主感受性への対応措置が必要であることが知られている。宿主感受性への対応措置とは、主にワクチネーションによる個体集団の防御能力の増強である。これまでいくつかの冷水病ワクチンの開発研究がなされているものの、冷水病が摂餌を開始する前の前期仔魚期でも発症することから経口ワクチンには使用できず、浸漬ワクチンもいまだ有効なものは実用化されていない。

そこで、残る2つの要因、つまり感染源・感染経路への対応措置の一環として、本研究の第1のテーマである「冷水病原因菌 *F. psychrophilum* の検出」を行った。すなわち、アユ養殖などにおいて、感染源の一つである *F. psychrophilum* 保菌種苗を早期に診断・検出することにより、保菌種苗への投棄、加温といった治療、あるいは保菌種苗の除去といった早期対策に利用できること、そして、日本への感染経路における対策、つまりギンザケ種卵などの輸入時における海港、空港での検疫に利用できることを目的とした。

本研究では、*F. psychrophilum* の保菌検出法に、DNA鑑定、医学生物学における臨床診断や法医学鑑定などに盛んに用いられているPCRを利用した。その結果、従来の寒天平板を用いた分離培養や、抗血清を用いた診断法に比べ、簡便で信頼性の高い方法が開発でき、今後の冷水病対策に有効利用できると期待された。また、PCRを行う際に必要なサンプルからのDNA抽出には、研究室レベルで頻繁に使用されている一般的な有機溶媒を使用した方法は、実際の養

殖現場のサンプルを大量に扱う保菌検査では簡便性に欠けると思われたので、本研究ではより簡便なキレート樹脂を用いた方法を採用した。このことにより、PCRの簡便性がさらに際だったものになった。このPCRによる検出法を用い、実際に輸入ギンザケ卵の検査を行った結果、かなり高い割合で*F. psychrophilum*の保菌が確認され、日本のギンザケ養殖のほとんどが北米からの輸入卵に依存していることから、日本のギンザケ養殖場で発生した冷水病は輸入ギンザケ卵が起源であると思われた。また、アユ種苗の保菌調査を行った結果、琵琶湖産アユがかなり高い割合で不顕性感染していることが分かり、琵琶湖が最大のアユ種苗供給源であることから、琵琶湖産種苗アユが、冷水病保菌状態のまま出荷され、その後全国のアユ養殖場で発病している可能性が高いと考えられた。このことは、*F. psychrophilum*が環境水常在性の細菌であることから、琵琶湖全体がアユの冷水病の感染巣(reservoir)の一つである可能性も示唆しており、魚類防疫上の観点から非常に重大な意義を持つと思われた。

しかし、琵琶湖がアユの冷水病の感染巣の一つである、と言うことが、短絡的に日本のアユの冷水病が琵琶湖を起源とするものである、と言うことにはつながらない。琵琶湖のアユの冷水病も、他から持ち込まれた可能性が十分考えられるからである。実際、この10年間の冷水病の日本での爆発的な流行は、輸入ギンザケ卵から*F. psychrophilum*が検出されたこと、欧米に比べると日本では比較的近年になってから知られるようになった病気であること等の事実からも、冷水病が外来の伝染病であることを示唆しているように見える。

しかし、若林らの吸収血清を使用した血清型の研究、ChakrounらのRAPID (Randomly amplified polymorphic DNA)、リボタイピングによる型別、Bertoliniらのプロテアーゼを用いた型別などにより、日本のアユ由来株が、欧米で分離された株と異なることが知られている(Wakabayashi *et al.* 1994, Chakroun *et al.* 1997, 1998, Bertolini *et al.* 1994)。このことから、アユの冷水病が日本に特異的なものであることが示唆されている。

従って、現在でも、アユの冷水病の起源は不明のままであり、まして、日本でアユ以外のアマゴ、オイカワ、ウグイ、ヤマメといった魚種から分離された*F. psychrophilum*については、そのほとんどが血清型すら知られておらず、し

たがって、大きな問題となっている天然水系での冷水病の由来も不明である。

本研究の第2のテーマである「冷水病原因菌*F. psychrophilum*の型別」は、これらの不明点を解明するために疫学的な追跡調査が必要であるとの考えから行った。疫学マーカーとして血清型、PCR-RFLPそしてプラスミドを利用し、*F. psychrophilum*種内における型別を試みた。

供試した*F. psychrophilum*は、これまでに海外で分離された株を含む、主に各都道府県の水産試験場あるいは関係機関から分与された種々の魚種由来の株を用いた。

血清型においては、若林らの血清型の研究と同じ吸収血清を使用する方法を用いたが、新たにニジマス由来株に対する抗血清も用いた。PCR-RFLPにおいては、*gyrB*領域のユニバーサルプライマーと*F. psychrophilum*に特異的なプライマーを設計し、それを用いた。プラスミド型においてはニジマス、アユ両宿主由来株にそれぞれ特異的と思われる塩基数の異なる二つのプラスミドの塩基配列を決定し、それを基にプライマーを作製することにより、煩雑なプラスミド抽出を行うことなくPCRによって簡便に型別を行った。

その結果、血清型による型別ではO-1、O-2、O-3の3つの血清型が確認され、PCR-RFLPではAR、AS、BR、BSの4つのRFLPプロファイルが確認された。そしてプラスミドによる型別では、3.5 kbpのプラスミドと4.1 kbpのプラスミドを持つグループと、その両方を持たないと思われる3つのグループが確認された。そして、これらの型別の結果は、いずれも由来魚種と強く相関し、*F. psychrophilum*は、発生年代、地域に関係なく、その宿主に対して特異的ないくつかのタイプが存在すると考えられた(Table D-1)。

ギンザケではO-1・BR(あるいはBS)・プラスミドなし、のプロファイルを持つものが多く、また、日本のギンザケ由来株と、ギンザケ発眼卵の輸出国であるUSA株と同じプロファイルのものが複数みられたことから、輸入ギンザケ卵を用いたギンザケ養殖場で発生した冷水病は、やはり海外から持ち込まれたものであると思われた。

アユではO-2・AR(あるいはAS)・4.1 kbpのプラスミド(あるいはプラスミドなし)、のプロファイルを持つものが多く、アユでみられたプロファイルは海外

のものを含めて他の魚種由来株では全くみられないことから、アユ由来株は日本とアユに非常に特異的で、アユで発生した冷水病は少なくとも海外由来のものではなく、日本を起源とするものである可能性が高いと考察された。また、アユ由来株間のプロファイルにも発生年代、地域による大きな差異はなく、アユ由来株の日本での起源については不明のままであった。ただし、山梨県で分離されたアユ由来株3株に共通のPCR-RFLPプロファイルとして認められるBRは他の県のアユ由来株ではみられなかった。

ニジマスではO-3・BR・3.5 kbpのプラスミド、のプロファイルを持つものが多く、このプロファイルがギンザケ同様海外のニジマス由来株にも多くみられたことから、ニジマスで発生した冷水病も、やはり海外から持ち込まれたものであると思われた。また、アユに多いと思われた4.1 kbpのプラスミドを持つ株が複数みられ、この中には海外の株も存在した。これは、一般的にプラスミドは細菌個体間における接合などでその遺伝子の移入がたやすく行われることから、この4.1 kbpのプラスミドが海外由来である可能性を示唆しており、非常に興味深いと思われた。

アマゴでは血清型不明・BS・4.1 kbpのプラスミド、ヤマメでは血清型不明・BS・プラスミドなし、のプロファイルを持つものが多く、これらのプロファイルはそれぞれの魚種に特異的であると思われ、アユやギンザケ、ニジマスといったこれまでに大きな被害を出している魚種由来の*F. psychrophilum*が水平伝播したものが起源となっているとは考えられなかった。

天然水域での発生が問題となっているオイカワではO-3・BS・プラスミドなし、ウグイではO-3・BS・3.5 kbpのプラスミド、のプロファイルを持つものが多く、これらのプロファイルを持つ株は、ニジマス株に数株みられることから、天然水域で発生している冷水病はニジマス由来株が起源である可能性も示唆された。

今後は、日本国外でははじめてのアユ由来株であり、Leeらによって報告されている、韓国産アユ由来株も含め、さらに多くの魚種、地域由来の*F. psychrophilum*を本研究で用いた型別法に供試するとともに、これまでに報告

されている、RAPD、リボタイピングあるいはプロテアーゼを用いた*P. psychrophilum*の型別法などもとり入れ、日本における冷水病の感染起源と伝播経路をより明らかにしていくことが課題である。

また、本研究では、それぞれの型別の価値を並列に考えたが、実際これらの型別には分子進化における時間軸的なパラメーターと相関する順序が存在すると思われる。すなわち分子系統学的に言うところの分子進化の速度をこれらの型別がある程度反映していることが考えられる。

もちろん、一般的にプラスミドは細菌個体間における接合などでその遺伝子の移入がたやすく行われること、継代培養を繰り返すことによって本来持っていたプラスミドを持たない変異株になることがよく知られることから、*P. psychrophilum*のプラスミドによる型別は、最も時間軸的な価値は低いか、あるいは進化の速度とは無関係と思われる。

しかし、疫学的な見地からみると、プラスミドは薬剤耐性遺伝子など、病原性に大きく関わる遺伝子を持っていることが多く、分子系統分類学的にはよく用いられる分子進化を反映する型別が、必ずしも疫学的追跡調査を目的とした型別に有益であるとは言えない。なぜなら、保菌魚の輸送による病原体の拡散や過度の投薬による薬剤耐性菌の出現など、人為的な要素に多大な影響を受けるとされる病原菌の伝播経路の疫学的な追跡調査には、進化の速度以外の価値も重要視する必要があると思われるからである。

今後も、病原性を含め、疫学的調査における表現型、遺伝子型による型別が陸上の家畜と異なり、水という環境を持ち、より野生種に近い種を用いる水産増養殖における疫学マーカーとしてもつ意義について慎重に検討しながら同様の調査を行うことが重要であると思われる。

Table D-1. Determination of the serotypes, RFLP-types and plasmid-types of *F. psychrophilum* isolated from different fishes in different locations

Strain#	Host	Location	Date	Serotype	RFLP type	Plasmid	
FPC819	CS	Miyagi	1991.07.16	AA	B	R	N
FPC817	CS	Miyagi	1991.07.16	ND	B	R	N
FPC818	CS	Miyagi	1991.07.16	ND	B	R	N
FPC820	CS	Miyagi	1991.07.16	ND	B	R	N
FPC829	CS	Miyagi	1990.02	O-1	B	S	N
FPC830	CS	Miyagi	1990.03	O-1	B	S	N
FPC828	CS	Miyagi	1990.03	O-1	B	S	N
FPC831	CS	Miyagi		ND	B	R	RP
NCIMB1947	CS	USA Oregon		O-1	B	S	N
FPC825	CS	USA Oregon	1981	O-1	B	S	N
FPC826	CS	USA Oregon	1980	ND	B	ND	N
FPC936	AY	Hiroshima	1993				N
FPC931	AY	Hiroshima	1993.04	O-2	A	S	AP
KNA9402	AY	Kanagawa	1994.05.17	O-2	ND	S	N
KNA9801	AY	Kanagawa	1997.01.16	O-2	A	S	N
KNA9701	AY	Kanagawa	1997.04.24	O-2	B	S	N
KNA9702	AY	Kanagawa	1997.05.31	AA	B	S	N
KNA9705	AY	Kanagawa	1997.07.24	AA	B	S	N
FPC928	AY	Kyoto	1993.05.07	O-2	A	S	AP
FPC930	AY	Kyoto	1993.05.12				N
FPC929	AY	Kyoto	1993.05.12				N
I51	AY	Nagano	1994.03.07	O-2	B	S	N
OKA9804	AY	Okayama	1998.04.07	O-2	A	S	AP
OKA9805	AY	Okayama	1998.05.21	O-2	A	S	N
OKA9806	AY	Okayama	1998.06.01	O-2	A	S	AP
OKA9808	AY	Okayama	1998.06.05				AP
OKA9811	AY	Okayama	1998.06.10				N
OKA9807	AY	Okayama	1998.06.11	O-2	A	S	N
OKA9809	AY	Okayama	1998.06.12				N
OKA9810	AY	Okayama	1998.06.16				N
OKA9812	AY	Okayama	1998.06.23				N
OKA9813	AY	Okayama	1998.07.14				AP
OKA9801	AY	Okayama	1998.07.21	O-2	A	S	N
OKA9802	AY	Okayama	1998.09.10	O-2	A	S	N
OKA9803	AY	Okayama	1998.09.10	O-2	A	S	N

(Continued on following page)

Table D-1.(continued)

Strain#	Host	Location	Date	Serotype	RFLP type	Plasmid
I33	AY	Shiga	1994.03.03	0-2	B S	N
FPC955	AY	Shiga	1994.03.09	0-2	B S	N
I36	AY	Shiga	1994.04.13	AA	A S	AP
FPC956	AY	Shiga	1994.04.15	0-2	A S	AP
I35	AY	Shiga	1994.04.27	0-2	B S	N
I39	AY	Shiga	1994.05.02		A S	AP
FPC957	AY	Shiga	1994.05.13	0-2	B S	N
SA9501	AY	Shiga	1995.12.11	0-2	A S	AP
SA9601	AY	Shiga	1996.01.05	0-2	A S	AP
SA9602	AY	Shiga	1996.01.18	ND	ND S	N
SA9603	AY	Shiga	1996.01.26		A S	AP
SA9604	AY	Shiga	1996.03.18		A S	AP
SA9605	AY	Shiga	1996.04.11	0-2	A S	AP
SA9606	AY	Shiga	1996.05.01		A S	AP
SA9607	AY	Shiga	1996.06.07		A S	AP
SA9608	AY	Shiga	1996.06.24		A S	AP
SA9609	AY	Shiga	1996.10.15	0-2	A S	AP
SA9701	AY	Shiga	1997.02.07	AA	A S	AP
SA9702	AY	Shiga	1997.03.24		A S	AP
I58	AY	Shiga		0-2	A R	N
PT96019	AY	Tokushima	1996.04.26	AA	A S	AP
PT96033	AY	Tokushima	1996.12.04	AA	A S	AP
PT97001	AY	Tokushima	1997.01.07	0-2	A R	N
PT97003	AY	Tokushima	1997.01.08		A S	AP
PT97012	AY	Tokushima	1997.01.27		B S	N
PT97023	AY	Tokushima	1997.03.28		A S	AP
PT97022	AY	Tokushima	1997.03.31	0-2	A S	AP
PT97025	AY	Tokushima	1997.04.18		A S	AP
PT97027	AY	Tokushima	1997.05.13		A S	AP
PT97030	AY	Tokushima	1997.05.26		A S	AP
PT97031	AY	Tokushima	1997.05.27		A R	N
PT97037	AY	Tokushima	1997.09.01	0-2	A S	N
PT97043	AY	Tokushima	1997.09.27		A S	N
PT97049	AY	Tokushima	1997.12.04	0-2	A R	N
PT97050	AY	Tokushima	1997.12.04		A R	N
PT97051	AY	Tokushima	1997.12.16		A S	AP
PT98021	AY	Tokushima	1998.02.02	0-2	B S	N
PT98022	AY	Tokushima	1998.02.05	0-2	A S	AP
PT98026	AY	Tokushima	1998.02.09		A S	N

(Continued on following page)

Table D-1.(continued)

Strain#	Host	Location	Date	Serotype	RFLP	type	Plasmid
FPC842	AY	Tokushima	1987	0-2	B	S	N
FPC839	AY	Tokushima	1987	0-2	A	S	AP
FPC841	AY	Tokushima	1987	0-2	B	S	N
FPC840	AY	Tokushima	1987	0-2	A	S	AP
FPC837	AY	Tokushima	1988	0-2	A	S	AP
FPC838	AY	Tokushima	1988	0-2	A	S	AP
PT98025	AY	Tokushima	1998.02.09		A	S	AP
FPC924	AY	Wakayama	1992.04.23	0-2	A	S	N
FPC925	AY	Wakayama	1992.06.26	0-2	B	S	N
FPC926	AY	Wakayama	1993.03.29	0-2	A	S	N
FPC927	AY	Wakayama	1993.05.25	0-2	B	S	N
96-9	AY	Yamanashi	1996.05.23	0-2	B	R	AP
96-26	AY	Yamanashi	1996.07.10	0-2	B	R	N
96-25	AY	Yamanashi	1996.07.10	0-2	A	R	N
AMR97C	RT	Aomori	1997.02.05	0-3	B	R	N
AMR97B	RT	Aomori	1997.08.29	0-3	B	R	RP
FPC805	RT	France	1988	ND	B	R	RP
FKR9801	RT	Fukui	1998				RP
KNR9706	RT	Kanagawa	1997.03.12	0-3	B	R	RP
I44	RT	Nagano	1994.04.13	0-3	B	R	RP
I45	RT	Nagano	1994.04.13	0-3	B	R	RP
I46	RT	Nagano	1994.04.13	0-3	B	S	RP
I47	RT	Nagano	1994.04.13	0-3	B	R	N
FPC808	RT	Nagano	1992.04	0-3	B	R	RP
FPC807	RT	Nagano	1992.04	0-3	B	R	RP
FPC806	RT	Nagano	1992.04	0-3	B	R	N
OKR9803	RT	Okayama	1998.06.11				RP
OKR9801	RT	Okayama	1998.09.09	0-3	B	ND	N
OKR9802	RT	Okayama	1998.09.09	0-3	B	ND	N
OKR9804	RT	Okayama	1998.11.05	0-3	B	S	AR
FPC814	RT	Tokyo	1991	0-3	B	R	RP
FPC816	RT	Tokyo	1991	0-3	B	R	N
FPC813	RT	Tokyo	1991	0-3	B	R	RP
FPC827	RT	Tokyo	1991	0-3	B	R	AP
FPC815	RT	Tokyo	1991				
FPC939	RT	Yamagata	1994.01.12	0-3	B	R	RP
FPC942	RT	Yamagata	1994.01.12	0-3	B	R	RP
FPC943	RT	Yamagata	1994.01.12	0-3	B	R	RP
FPC938	RT	Yamagata	1994.01.12	0-3	B	R	RP

(Continued on following page)

Table D-1.(continued)

Strain#	Host	Location	Date	Serotype	RFLP	type	Plasmid
FPC944	RT	Yamagata	1994.01.12	0-3	B	R	RP
95-15'	RT	Yamanashi	1996.02.29	0-3	B	R	RP
95-14'	RT	Yamanashi	1996.02.29	0-3	B	R	RP
95-16'	RT	Yamanashi	1996.02.29	0-3	B	R	RP
95-23	RT	Yamanashi	1996.03.27	0-3	B	R	AP
96-7	RT	Yamanashi	1996.05.20	0-1	B	R	N
96-8	RT	Yamanashi	1996.05.21	0-3	B	R	RP
96-10	RT	Yamanashi	1996.05.22	0-3	B	R	AP
96-21	RT	Yamanashi	1996.06.28	0-3	B	S	RP
96-29	RT	Yamanashi	1996.07.12	ND	B	R	N
13-23	RT		1991.07.17	AA	B	R	RP
13-17	RT		1993.10.23	0-3	B	R	RP
13-55	RT		1995.03.01	0-3	B	R	AP
P27-2/95	RT		1995.11.03	AA	B	R	RP
P30-1/95	RT		1995.12.08	AA	B	R	RP
P3-3/95	RT		1996.02.26	0-3	B	R	RP
FKM9801	Amago	Fukui	1998				N
OKM9801	Amago	Okayama	1998.05.18	ND	B	S	AR
OKM9802	Amago	Okayama	1998.06.04	ND	B	S	AP
OKM9803	Amago	Okayama	1998.06.09				AP
OKM9804	Amago	Okayama	1998.06.17				AP
OKM9805	Amago	Okayama	1998.06.18				RP
OKM9806	Amago	Okayama	1998.08.10				N
FPC958	Amago	Tottori	1994.07.14	0-3	B	S	AP
95-16	Amago	Yamanashi	1996.01.11	ND	B	S	N
95-15	Amago	Yamanashi	1996.01.11	ND	B	S	N
95-14	Amago	Yamanashi	1996.01.11	ND	B	S	N
95-13	Amago	Yamanashi	1996.01.11	ND	B	S	N
95-24	Amago	Yamanashi	1996	ND	B	S	N
96-5	Iwana	Yamanashi	1996.05.15	ND	B	S	N
95-20	Yamame	Yamanashi	1996.03.18	ND	B	S	N
95-19	Yamame	Yamanashi	1996.03.18	ND	B	S	N
95-18	Yamame	Yamanashi	1996.03.18	ND	B	S	N
96-4	Yamame	Yamanashi	1996.05.14	0-1	B	S	N
FPC945	Oikawa	Hiroshima	1993.09.16	0-3	B	S	N
FPC946	Oikawa	Hiroshima	1994.01.11	0-3	B	S	N
FPC948	Oikawa	Hiroshima	1994.02.23	ND	B	S	N
FPC811	Carp	Germany	1990	0-1	B	S	N
FPC947	Carp	Hiroshima	1994.01.04	0-3	B	S	RP

(Continued on following page)

Table D-1.(continued)

Strain#	Host	Location	Date	Serotype	RFLP type	Plasmid
27-H	Grayling			0-3	B R	RP
126-H	Grayling			0-1	B S	N
FPC932	Ugui	Hiroshima	1993.05	0-3	B S	RP
FPC809	Tench	Germany	1990		B S	N
FPC810	Tench	Germany	1990	ND	B S	N
AMS97D	Salmon	Aomori	1997.03.12	0-1	B S	N
176-L	Salmon			AA	B R	N
49-L	Salmon			0-1	B S	N
887				0-3	B R	N
255/93				AA	B R	RP
874				AA	B R	RP

ND:Not determined, AA:Auto-agglutinin, Blank:Unknown or Not done

RP:approximately 3.5kbp plasmid, AP:approximately 4.1kbp plasmid, AR:approximately 3.5kbp and 4.1kbp plasmid, N:Neither 3.5kbp nor 4.1kbp plasmid

Locations of strain number 13-23, 13-17, 13-55, P27-2/95, P30-1/95, P3-3/95, 27-H, 126-H, 176-L, 49-L, 887, 255/93, 874 are unknown but not Japan.

CS(Coho salmon):*Oncorhynchus kisutch*, AY(Ayu):*Plecoglossus altivelis*, RT(Rainbow trout):*Oncorhynchus mykiss*, Amago:*Oncorhynchus rhodurus*, Oikawa: *Zacco platypus*, Iwana(Yamame):*Salvelinus pluvius*, Ugui:*Tribolodon hakonensis hakonensis*, Carp: *Cyprinus carpio*

謝辞

この修士論文作成に当たり、あらゆる面で御指導頂いた東京大学大学院農学生命科学研究科魚病学研究室 若林久嗣教授に深く感謝いたします。また、多くの有益な御助言とご協力を頂いた同研究室、小川和夫助教授、横山博助手、宮崎大学農学部、飯田貴次教授に深く感謝いたします。

卒業論文作成時以来、サンプリング毎に御世話していただき、また貴重な試料を提供していただいた、滋賀県水産試験場の二宮氏をはじめとする同試験場の諸氏に深謝いたします。

また、快く冷水病原菌を分与していただいた、広島県、神奈川県、長野県、岡山県、徳島県、和歌山県、山梨県、青森県、東京都、山形県、宮城県、鳥取県、の各水産試験場の魚病担当諸氏に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- Aoki, T., D. Ikeda, T. Katagiri and I. Hirono (1997): Rapid detection of the fish-pathogenic bacterium *Pasteurella piscicida* by polymerase chain reaction targetting nucleotide sequences of the species-specific plasmid pZP1. *Fish Pathology*, 32, 143-151
- Argenton, F., S. d. Mas, C. Malocco, L. D. Valle, G. Giorgetti and L. Colombo (1996): Use of random DNA amplification to generate specific molecular probes for hybridization tests and PCR-based diagnosis of *Yersinia ruckeri*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 24, 121-127
- Bernardet, J. F. and P. A. D. Grimont (1989): DNA relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* new species revived name *Flexibacter psychrophilus* new species revived name and *Flexibacter Maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 346-354
- Bernardet, J. F., P. Segers, M. Vancanneyt, F. Berthe, K. Kersters and P. Vandamme (1996): Cutting a gordian knot: Emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 128-148
- Bertolini, J. M., H. Wakabayashi, V. G. Watral, M. J. Whipple and J. S. Rohovec (1994): Electrophoretic detection of proteases from selected strains of *Flexibacter psychrophilus* and assessment of their variability. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6, 224-233
- Boondeekhun, H. S., V. Gurtler, M. L. Odd, V. A. Wilson and B. C. Mayall (1993): Detection of *Clostridium difficile* enterotoxin gene in clinical specimens by the polymerase chain reaction. *Journal of Medical Microbiology*, 38, 384-387
- Borg, A. F. (1960): Studies on myxobacteria associated with diseases in salmonid fishes. *Wildlife Disease*, 8, 1-85

Brown, L. L., G. K. Iwama, T. P. T. Evelyn, W. S. Nelson and R. P. Levine (1994): Use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect DNA from *Renibacterium salmoninarum* within individual salmonid eggs. *Diseases of Aquatic Organisms*, 18, 165-171

Brown, L. L., T. P. T. Evelyn, G. K. Iwama, W. S. Nelson and R. P. Levine (1995): Bacterial species other than *Renibacterium salmoninarum* cross-react with antisera against *R. salmoninarum* but are negative for the p57 gene of *R. salmoninarum* as detected by the polymerase chain reaction (PCR). *Diseases of Aquatic Organisms*, 21, 227-231

Brown, L. L., W. T. Cox and R. P. Levine (1997): Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29, 213-218

Chakroun, C., M. C. Urdaci, D. Faure, F. Grimont and J. F. Bernardet (1997): Random amplified polymorphic DNA analysis provides rapid differentiation among isolates of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* and among *Flavobacterium* species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 31, 187-196

Chakroun, C., F. Grimont, M. C. Urdaci and J. F. Bernardet (1998): Fingerprinting of *Flavobacterium psychrophilum* isolates by ribotyping and plasmid profiling. *Diseases of Aquatic Organisms*, 33, 167-177

Cipriano, R. C., L. S. Ford and J. D. Teska (1995): Association of *Cytophaga psychrophila* with mortality among eyed eggs of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Wildlife Disease*, 31, 166-171

Cipriano, R. C., W. B. Schill, J. D. Teska and L. A. Ford (1996): Epizootiological study of bacterial cold-water disease in Pacific salmon and further characterization of the etiologic agent, *Flexibacter psychrophila*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8, 28-36

Cousin, K. K., G. L. Gall, B. Despres, M. Kaghad, P. Legoux, D. Shire and E. Mialhe (1993): Genomic DNA cloning of rickettsia-like organisms (RLO) of Saint-Jacques scallop *Pecten maximus*: Evaluation of prokaryote diagnosis by hybridization with a non-isotopically labelled probe and by polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*, 15, 145-152

Crouse, C. A., J. D. Ban and J. K. D'Alessio (1993): Extraction of DNA from forensic-type sexual assault specimens using simple, rapid sonication procedures. *Biotechniques*, 15, 641-648

Crouse, C. and V. Vincek (1995): Identification of ABO alleles on forensic-type specimens using rapid-ABO genotyping. *Biotechniques*, 18, 478-483

Dalsgaard, I. (1993): Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other Cytophaga-like bacteria pathogenic for fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 127-144

Erb, R. W. and I. Wagner-Dobler (1993): Detection of polychlorinated biphenyl degradation genes in polluted sediments by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 4065-4073

Evensen, O. and E. Lorenzen (1996): An immunohistochemical study of *Flexibacter psychrophilus* infection in experimentally and naturally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* fry). *Diseases of Aquatic Organisms*, 25, 53-61

Evensen, O. and E. Lorenzen (1997): Simultaneous demonstration of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and *Flavobacterium psychrophilum* in paraffin-embedded specimens of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry by use of paired immunohistochemistry. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29, 227-232

Forsman, M., G. Sandstrom and A. Sjostedt (1994): Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of Francisella strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 38-46

Guertler, V. and V. A. Stanisich (1996): New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 3-16

Gurtler, V. (1993): Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions. *Journal of General Microbiology*, 139, 3089-3097

Gurtler, V. and H. D. Barrie (1995): Typing of *Staphylococcus aureus* strains by PCR-amplification of variable-length 16S-23S rDNA spacer regions: Characterization of spacer sequences. *Microbiology*, 1255-1265

Hiraishi, A. (1992): Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. *Letters in Applied Microbiology*, 15, 210-213

Hiraishi, A. and M. Kaneko (1994): Use of polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA gene sequences to identify pink-pigmented bacteria found in a potable water treatment system. *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology*, 9, 55-65

Holt, R. A., J. S. Rohovec and J. L. Fryer (1993): Bacterial cold-water disease. Hykin, P. G., K. Tobal, G. McIntyre, M. M. Matheson, H. M. A. Towler and S. L. Lightman (1994): The diagnosis of delayed post-operative endophthalmitis by polymerase chain reaction of bacterial DNA in vitreous samples. *Journal of Medical Microbiology*, 40, 408-415

Iida, Y. and A. Mizokami (1996): Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. *Fish Pathology*, 31, 157-164

Izumi, S. and H. Wakabayashi (1997): Use of PCR to detect *Cytophaga psychrophila* from apparently healthy juvenile ayu and coho salmon eggs. *Fish Pathology*, 32, 169-173

Jantausch, B. A. and A. I. Hull (1996): Restriction fragment length polymorphism of PCR amplified *papE* gene products is correlated with complete serotype among uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Microbial Pathogenesis*, 20, 351-360

Kado, C. I. and S. T. Liu (1981): Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmid. *Journal of Bacteriology*, 144, 1365-1373

Kawano, K., A. Aoki and T. Kitao (1983): Immersion vaccination and water-bone challenge of Ayu (*Plecoglossus altivelis*) against Vibriosis. *Fish Pathology*, 18, 143-149

- Kent, M. L., J. M. Groff, J. K. Morrison, W. T. Yasutake and R. A. Holt (1989): Spiral swimming behavior due to cranial and vertebral lesions associated with *Cytophaga psychrophila* infection in salmonid fishes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 6, 11-16
- Kolk, A. H. J., A. R. J. Schuitema, S. Kuijper, J. V. Leeuwen, P. W. M. Hermans, J. D. A. V. Embden and R. A. Hartskeerl (1992): Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 2567-2575
- Kranz, R. G., D. L. Beckman and D. Foster-Hartnett (1992): DNA gyrase activities from *Rhodobacter capsulatus*: analysis of target(s) of coumarins and cloning of the *gyrB* locus. *FEMS Microbiology Letters*, 93, 25-32
- Kumagai, A. and K. Takahashi (1997): Imported eggs responsible for the outbreaks of cold-water disease among cultured coho salmon in Japan. *Fish Pathology*, 32, 231-232
- Lamblerie, X. d., C. Zandotti, C. Vignoli, C. Bollet and P. d. Micco (1992): A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex 100" suitable for gene amplification. *Research in Microbiology*, 143, 785-790
- Leblond Bourget, N., H. Philippe, I. Mangin and B. Decaris (1996): 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 102-111 *LHM: Owned by the Agricultural Library.
- Lee, E. G. H. and M. R. Gordon (1987): Immunofluorescence screening of *Renibacterium salmoninarum* in the tissues and eggs of farmed chinook salmon spawners. *Aquaculture*, 65, 7-14
- Lee, K. B. and G. J. Heo (1998): First isolation and identification of *Cytophaga psychrophila* from cultured ayu in Korea. *Fish Pathology*, 33, 37-38
- Lehmann, J., D. Mock, F. J. Sturenberg and J. F. Bernardet (1991): First isolation of *Cytophaga psychrophila* from a systemic disease in eel and cyprinids. *Diseases of Aquatic Organisms*, 10, 217-20

Leon, G., N. Maulen, J. Figueroa, J. Villanueva, C. Rodriguez, M. I. Vera and M. Krauskopf (1994): A PCR-based assay for the identification of the fish pathogen *Renibacterium salmoninarum*. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Letters*, 115, 131-136

Lorenzen, E. and N. Karas (1992): Detection of *Flexibacter psychrophilus* by immunofluorescence in fish suffering from fry mortality syndrome: A rapid diagnostic method. *Diseases of Aquatic Organisms*, 13, 231-234

Lorenzen, E. and N. J. Olesen (1997): Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome II: serological studies. *Diseases of Aquatic Organisms*, 31, 209-220

Lorenzen, E., I. Dalsgaard and J. F. Bernardet (1997): Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome I: phenotypic and genomic studies. *Diseases of Aquatic Organisms*, 31, 197-208

Lumsden, J. S., V. E. Ostland and H. W. Ferguson (1996): Necrotic myositis in cage cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), caused by *Flexibacter psychrophilus*. *Journal of Fish Diseases*, 19, 113-119

Minsavage, G. V., C. M. Thompson, D. L. Hopkins, R. M. V. B. C. Leite and R. E. Stall (1994): Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*, 84, 456-461

Myers, T. W. and D. H. Gelfand (1991): Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*, 30, 7661-7666

Navarro, E., P. Simonet, P. Normand and R. Bardin (1992): Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. *Archives of Microbiology*, 157, 107-115

Nishizawa, T., K. Mori, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga (1994): Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 18, 103-107

Obach, A. and F. B. Laurencin (1991): Vaccination of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* against the visceral form of coldwater disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12, 13-16

Reichenbach, H. (1989): Genus I. *Cytophaga* In "Bergeys Manual of Systematic Bacteriology" (ed. by J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig and J. G. Holt). The Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 2015-2050

Rochelle, P. A., J. C. Fry, M. J. Day and M. J. Bale (1985): An Accurate Method for Estimating Sizes of Small and Large Plasmids and DNA Fragments by Gel Electrophoresis. *Journal of General Microbiology*, 132, 53-59

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491

Schmidtke, L. M. and J. Carson (1995): Characteristics of *Flexibacter psychrophilus* isolated from Atlantic salmon in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 21, 157-161

Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour and T. S. Whittam (1986): Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology*, 51, 873-884

Steffan, R. J. and R. M. Atlas (1988): DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2185-2191

Toyama, T., T. K. Kita and H. Wakabayashi (1994): Identification of *Cytophaga psychrophila* by PCR targeted 16S ribosomal RNA. *Fish Pathology*, 29, 271-275

Toyama, T., K. K. Tsukamoto and H. Wakabayashi (1996): Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. *Fish Pathology*, 31, 25-31

Vignoli, C., X. D. Lamballerie, C. Zandotti, C. Tamalet and P. D. Micco (1995): Advantage of a rapid extraction method of HIV1 DNA suitable for polymerase chain reaction. *Research in Virology*, 146, 159-162

Wakabayashi, H., M. Horinouchi, T. Bunya and G. Hoshiai (1991): Outbreaks of cold-water disease in coho salmon in Japan. *Fish Pathology*, 26, 211-212

Wakabayashi, H., T. Toyama and T. Iida (1994): A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan. *Fish Pathology*, 29, 101-104

Walsh, P. S., D. A. Metzger and R. Higuchi (1991): Chelex100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10, 507-513

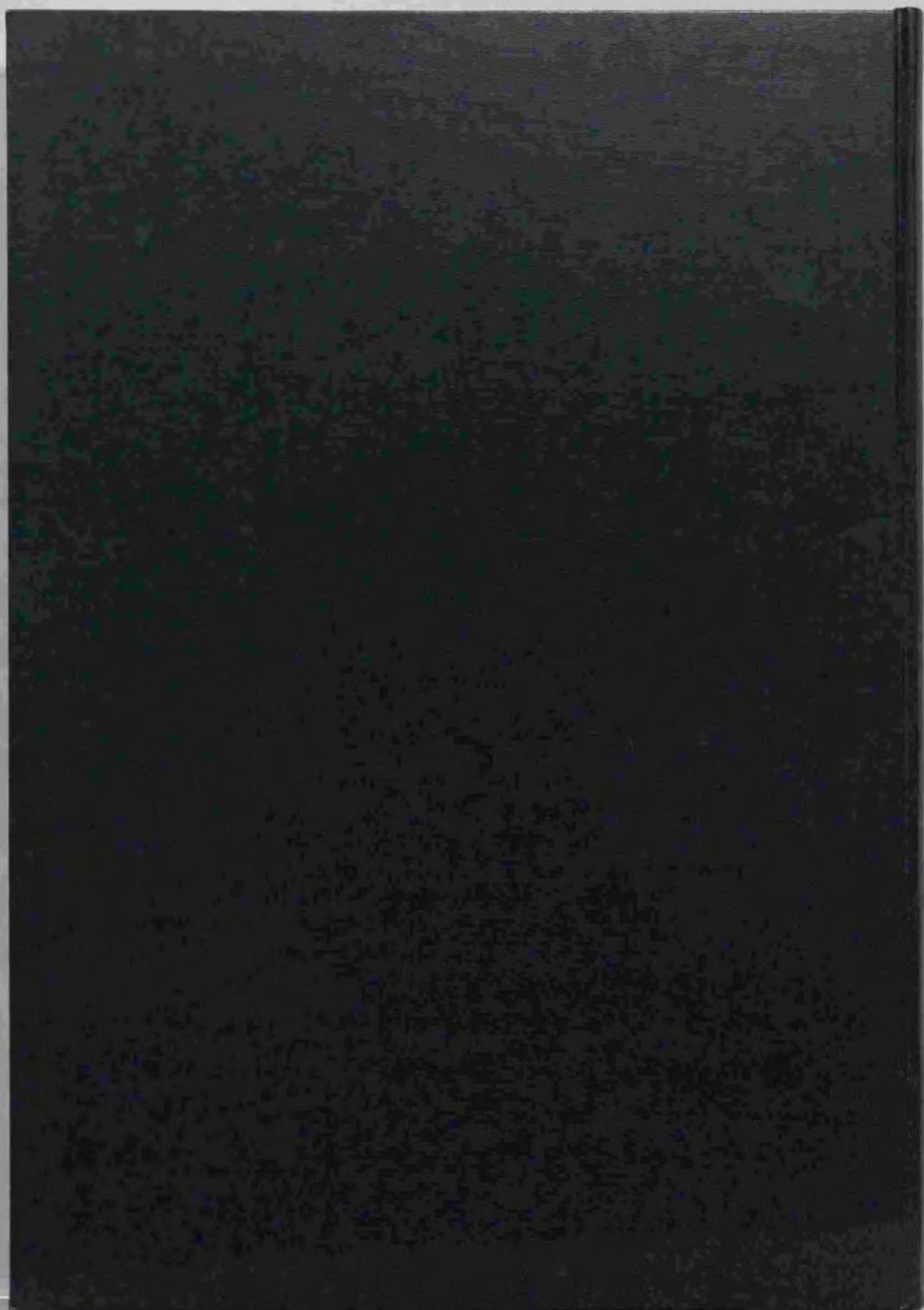
Wang, J. T., J. T. Lin, J. C. Sheu, J. C. Yang, D. S. Chen and T. H. Wang (1993): Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy tissue by polymerase chain reaction. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 12, 367-371

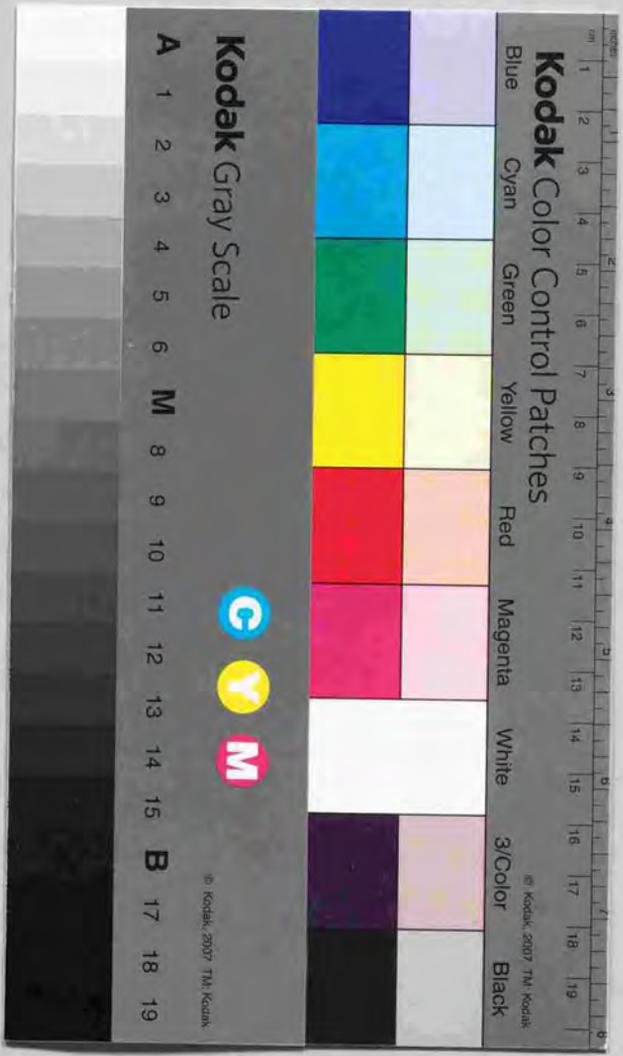
Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 697-703

Wiedmann, M., R. Brandon, P. Wagner, E. J. Dubovi and C. A. Batt (1993): Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 44, 129-140

Yamamoto, S. and S. Harayama (1995): PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1104-1109

Yamamoto, S. and S. Harayama (1996): Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 506-511





Kodak Color Control Patches

Blue 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

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



© Kodak, 2007 TM, Kodak