特集 水産微生物のリアルタイムモニタリング

魚類病原性ビブリオ菌のモニタリング

澤 辺 智 雄,* 福 井 洋 平

北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物工学分野

Monitoring of fish-pathogenic vibrios

TOMOO SAWABE* AND YOUHEI FUKUI

Laboratory of Marine Biotechnology and Microbiology, Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido
041-8611, Japan

1. はじめに

1831年から1866年にかけて、4度にわたり、イギリスでコレラが流行し、死者は14万人に達した。^{1,2)} コレラの原因は、*Vibrio cholerae*である。John Snowによって描かれた「Broad streetの地図」に集約されている疫学手法^{1,2)}は、「病原体と病気の広がり方」を的確に判断したものであり、ビブリオ菌のモニタリングの原型をなすといってよい。これは、水産分野で問題となるビブリオ病の制圧においても、今なお、学ぶべきところが多い。我々の時代では、新しい細菌の特異検出技術が進展し、魚病の診断だけでなく、感染症を引き起こすビブリオ菌の環境での挙動を逐次把握することが可能となってきた。本稿では、水産分野で問題となっている魚類病原性ビブリオ菌のモニタリング研究の現状と課題を紹介する。

2. ビブリオ病原性細菌のモニタリングの現状

ビブリオ菌は、汽水域や沿岸海域及び海産動物の消化管に生息している。分類学的にはビブリオ科に属し、現在までに5属80種が知られている。³⁻⁵⁾ 魚介類に対して、ビブリオ病を引き起こすと報告されている種は *Photobacterium damsela* (*damsela* と *piscicida* の両亜種)、*V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. cholerae*, *V. fischeri*, *V. furnissii*, *V. harveyi*, *V. ichthyenteri*, *V. logei*, *V. mediterranei* (*V. shiloi*), *V. ordalii*, *V. pelagius*, *V. salmonicida*, *V. splendidus*, *V. vulnificus* 及び *V. penaeicida* である。^{6,7)} 産業被害が多いか、または表現形質や免疫反応などを行なっても近縁種との区別が困難なビブリオ菌、例えば *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. penaeicida*, *V. tapetis* では、遺伝子増幅技術を基礎とする特異検出法が構築されている(表1)。これらの特異検出法は、魚病診断や魚介類の病原菌保持状況のサーベイランスに使用される頻度が高い。しかし、環境中の菌数を定量的に測定した研究例は思ったより少ない。中でも、リアル

タイム定量PCR法が検討され、リアルタイムモニタリングが可能なビブリオ病原性細菌は、*V. penaeicida*⁷⁾ と *V. harveyi* (福井, 澤辺, 投稿中) の2種である。

3. アワビ養殖環境下に生息する *V. harveyi* モニタリング

V. harveyi は、様々な魚介類に病原性を示すことが知られている。⁸⁾ 特に、東南アジアや南米のエビ養殖場では、*V. harveyi* や発光性ビブリオ菌による大量死が観察され、エビ生産事業に経済的打撃を与えている。⁹⁻¹²⁾ また、日本の北海道内のエゾアワビ養殖施設では、1980年代以降、水温が20℃を超える高水温期に、*V. harveyi* 感染を原因とする大量死が発生している(澤辺ら, 投稿中)。この大量死は突発的に起きるため、アワビ養殖場における大量死の発生予測が難しい。アワビには抗生物質投与は認められていないため、この大量死発生の予兆を把握するためにも、*V. harveyi* 菌数の変化を感度良くモニタリングし、1日以内で解析できる迅速性を持ち合わせた簡易な手法の構築が望まれている。

筆者らは、*V. harveyi* の特異検出に有効なコロニーPCR法とリアルタイム定量PCR法を開発し、それらを養殖施設における *V. harveyi* の生態解明、さらには本疾病の発生予測に利用すべく研究を進めている。

コロニーPCR法では、一週間間隔で *V. harveyi* 菌数の変動を解析することが可能な方法の構築を目指した。¹³⁾ データベースに登録されている *V. harveyi* 標準株の16S rRNA遺伝子塩基配列には誤読領域があると報告されている。¹⁴⁾ この領域の一部をVHARF-VHARRプライマーセットの配列に用いた。このプライマーセットと特異検出のために至適化した条件下において、*V. harveyi* の培養菌体を直接PCRの鋳型としてもその特異性に変化はなく、環境試料中の細菌の培養から始めて、3日以内に *V. harveyi* を検出できるコロニーPCR法が完成した。本法を利用して、アワビ養殖環境水から分離

* Tel.: 81-138-40-5570. Fax: 81-138-40-5570. Email: sawabe@fish.hokudai.ac.jp

表1 ビブリオ病原菌の特異検出法とモニタリングへの応用例

標的種	感染動物	方 法	モニタリングへの応用例*	参考文献
<i>V. anguillarum</i> & <i>V. ordalii</i>	ウナギ・サケ・アユなど	Colony hybridization (16S rRNA)	あり	Martinez-Picado <i>et al.</i> , 1994 ¹⁷⁾ , 1996 ¹⁸⁾
<i>V. anguillarum</i> (ヘモリジン産生株)	サケ・アユなど	Multiplex-PCR (<i>hetoxR</i> , <i>tdh</i> , & <i>trh</i>)	なし	Rodkhun <i>et al.</i> , 2006 ¹⁹⁾
<i>V. harveyi</i>	サメ・ヒラメ・エビ・アワビなど	PCR (<i>toxR</i>)	なし	Pang <i>et al.</i> , 2006 ²⁰⁾
<i>V. harveyi</i>	サメ・ヒラメ・エビ・アワビなど	MPN-PCR (<i>gyrB</i>)	あり	Thaithongnum <i>et al.</i> , 2006 ²¹⁾
<i>V. harveyi</i>	サメ・ヒラメ・エビ・アワビなど	Colony-PCR (16S rRNA)	あり	Fukui & Sawabe, 2007 ¹³⁾
<i>V. harveyi</i>	サメ・ヒラメ・エビ・アワビなど	Real-time PCR (16S rRNA)	あり	福井, 澤辺, 投稿中
<i>V. mediterranei</i> (<i>V. shiloi</i>)	サンゴ	Hybridization (16S rRNA)	なし	Sussman <i>et al.</i> , 2003 ²²⁾
<i>V. parahaemolyticus</i>	ハタ・エビ・アワビなど	PCR (<i>toxR</i>)	なし	Kim <i>et al.</i> , 1999 ²³⁾
<i>V. parahaemolyticus</i> (病原株)	ハタ・エビ・アワビなど	Real-time PCR (<i>tdh</i>)	あり	Blackstone <i>et al.</i> , 2003 ²⁴⁾
<i>V. tapetis</i>	アサリ	PCR & Hybridization (16S rRNA)	あり	Paillard <i>et al.</i> , 2006 ²⁵⁾
<i>V. penaeicida</i>	エビ	Real-time PCR (16S rRNA)	あり	Saulnier <i>et al.</i> , 2000; Goarant & Merien, 2006 ²⁶⁾
<i>P. damsela</i>	ブリ・スズキなど	Multiplex-PCR (16S rRNA & <i>ureC</i>)	なし	Osorio <i>et al.</i> , 2000 ²⁷⁾

* 報告手法を用いて、環境中の細菌の定量解析がなされている場合、モニタリングへの応用例が「あり」とした。

された株は、複数のハウスキーピング遺伝子解析でも *V. harveyi* と同定され、本法の特異性の高さが証明された。水温の上昇とともに、沿岸域で *V. harveyi* 菌数が増加し、養殖場で使用されている飼育用水を介してアワビに感染する機会が増加していることも明らかになりはじめた。

一方、リアルタイム定量 PCR 法では、一日間隔で *V. harveyi* 菌数の変動解析が可能な手法の構築を目指した。リアルタイム定量 PCR 法のプライマー及びプローブには、*V. harveyi* に特異性の高い領域を新たに見だし、RTVHAF-RTVHAR プライマーセット及び RTVHA TaqMan プローブを設計した。このプローブとプライマーセットは、供試した 20 種のビブリオ属細菌の中で、*V. harveyi* を特異的に検出できた。

リアルタイム定量 PCR 法を用いたモニタリングを可能にするための重要なステップは、環境試料から鋳型 DNA を抽出するステップである。様々な生理状態の菌体から効率よく DNA を抽出でき、また短時間で処理が可能で、かつ操作段階は少ないことが求められる。そこで、自然海水から *V. harveyi* を高感度に検出できる DNA 抽出法を検討した。現場で多検体処理することも考慮し、鋳型 DNA を調製する出発材料は、1 mL の海水試料とした。*V. harveyi* の新鮮培養菌体を 10^6 から 10^0 CFU/mL になるよう滅菌海水に添加し、その 1 mL を遠心分離で集菌し、数種の抽出法を使い、鋳型 DNA を調製した。その結果、レジン法が 100 CFU/mL と高

い検出限界値を得ることが明らかとなった。レジン法は、DNA の分解を触媒する金属イオンを除去することから、PCR を阻害する物質を多く含む試料には効果があることが明らかにされており、¹⁵⁾ *V. vulnificus* のリアルタイム定量 PCR 検出の鋳型 DNA 調製でも適する方法であることが報告されている。¹⁾ なお、*V. penaeicida* のリアルタイム定量 PCR 法では、市販の簡易 DNA 精製キットが効果的であることも報告されている。¹⁵⁾

2005 年のアワビ養殖施設における大量死発生前後に、この定量的 PCR 法を用いて、菌数の変動を調べた。施設沿岸の海水、飼育用水、及び飼育水槽水を採用し、定量的 PCR に供試した。*V. harveyi* の培養計数値は、前述の *V. harveyi* 特異検出コロニー PCR 法により算出した結果、エゾアワビ大量死が発生した時に、飼育水槽水では約 10^2 CFU/mL の *V. harveyi* が検出された。この値は培養計数値とはほぼ同程度の菌数であった。

4. 今後の課題

脊椎動物から無脊椎動物まで幅広く海洋動物の大量死を引き起こすことが報告され、海洋動物病原ビブリオと認識され始めた *V. harveyi* を例として、コロニー PCR 法やリアルタイム定量 PCR 法を用いたビブリオ病原菌のモニタリングの可能性を紹介した。この方法を用いることにより、自然環境下のビブリオ菌の数を 5 時間以内に定量することが可能である。実際にこの方法を使い、2003 年から *V. harveyi* 菌数のモニタリングを行い、自然界でこの細菌が増加する環境条件や大量死の発

生を引き起こす菌数の閾値が解明されつつある。

Snow がコレラ菌で汚染された井戸の閉鎖を決断し、この措置がコレラの流行を終息に向かわせたような成果にまでは至っていないが、自然界のビブリオ病原菌の数を定量的に理解できるようにはなってきた。特に、本稿で紹介したリアルタイム定量 PCR 法は、試水がわずか 1 mL で済み、かつその検出限界は 10^2 CFU/mL である。これに供試する試料の調製は 1 時間以内であることから、現場対応 (On-Site) のリアルタイム定量 PCR に向いている。アワビ大量死が発生した時のように *V. harveyi* 菌数が 10^2 CFU/mL 程度にまで増加した水試料であれば、定量が可能である。今後は、大量死の発生前の *V. harveyi* 菌数の増加をモニタリングできるまで感度を上げることが課題である。将来、このようなモニタリング技術が、水温データロガーのように海域に設置しながら簡単に測定できるまで革新を遂げることを願いながら、技術精度の向上に配慮していかなければならない。

文 献

- 1) Snow SJ. Sutherland, Snow and water: the transmission of cholera in the nineteenth century. *Int. J. Epidemiol.* 2002; **31**: 908-911.
- 2) Collins CH. John Snow-'On the mode of communication of Cholera'. *Med. Sci. History* 2003; **19**: 12-19.
- 3) Park YD, Baik KS, Seong CN, Bae KS, Kim S, Chun J. *Photobacterium ganghwense* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from sea water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006; **56**: 745-749.
- 4) Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004; **68**: 403-431.
- 5) Thompson FL, Swings J. Taxonomy of the vibrios. In: Thompson FL, Austin B, Swings J. (eds). *The Biology of Vibrios*. ASM Press, Washington, D. C. 2006; 29-43.
- 6) Austin B, Austin DA. Characteristics of the pathogens: Gram-negative bacteria, Vibrionaceae representatives. In: Austin B, Austin DA. (eds). *Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish*, 3rd edition. Springer-Verlag, Berlin. 1999; 28-32.
- 7) Goarant C, Merien F. Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of syndrome 93 in New Caledonian shrimp, by real-time PCR using SYBR Green I chemistry. *J. Microbiol. Methods* 2006; **67**: 27-35.
- 8) Austin B, Zhang XH. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Let. Appl. Microbiol.* 2006; **43**: 119-124.
- 9) Alvarez JD, Austin B, Alvarez AM, Reyes H. *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. *J. Fish Dis.* 1998; **21**: 313-316.
- 10) Lavilla-Pitogo CR, Baticados MCL, Cruz-Lacierda ER, Pena LD. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture* 1990; **91**: 1-13.
- 11) Prayitno SB, Latchford JW. Experimental infection of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectivity. *Aquaculture* 1995; **132**: 105-112.
- 12) Robertson PAW, Xu HS, Austin B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Vibrio harveyi* in penaeid shrimp and water. *J. Microbiol. Methods* 1998; **34**: 31-39.
- 13) Fukui Y, Sawabe T. Improved one-step colony PCR detection of *Vibrio harveyi*. *Microb. Environ.* 2007; (In press).
- 14) Gauger, EJ, Gómez-Chiarri M. 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae*. *Dis. Aquat. Org.* 2002; **52**: 39-46.
- 15) Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotech.* 1991; **10**: 506-513.
- 16) Panicker G, Micheal ML, Bej AK. Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and gulf of Mexico water by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; **70**: 498-507.
- 17) Martinez-Picado J, Branch AR, Jofre J. Rapid detection and identification of *Vibrio anguillarum* by using a specific oligonucleotide probe complementary to 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; **60**: 732-737.
- 18) Martinez-Picado J, Alsina M, Branch AR, Cerda M, Jofre J. Species-specific detection of *Vibrio anguillarum* in marine aquaculture environments by selective culture and DNA hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; **62**: 443-449.
- 19) Rodkhun C, Hirano I, Crosa JH, Aoki T. Multiplex PCR for simultaneous detection of five virulence hemolysin genes in *Vibrio anguillarum*. *J. Microbiol. Methods* 2006; **65**: 612-618.
- 20) Pang L, Zhang XH, Zhong Y, Chen J, Li Y, Austin B. Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene. *Let. Appl. Microbiol.* 2006; **43**: 249-255.
- 21) Thaithongnum S, Ratanama P, Weeradechapol K, Sulhoom A, Vuddhakul V. Detection of *Vibrio harveyi* in shrimp postlarvae and hatchery tank water by most probable number technique with PCR. *Aquaculture* 2006; **261**: 1-9.
- 22) Sussman M, Loya Y, Fine M, Rosenberg E. The marine fireworm *Hermodice carunculata* is a winter reservoir and spring-summer vector for the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Environ. Microbiol.* 2003; **5**: 250-255.
- 23) Kim YB, Okuda J, Matumto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibuchi M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.* 1999; **37**: 1173-1177.
- 24) Blackstone GM, Nordstrom JL, Vickery MCL, Browen MD, Meyer RF, Depaola A. Development of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *J. Microbiol. Methods* 2003; **53**: 149-155.
- 25) Paillard C, Gausson S, Nicolas LJ, Pennec JP, Haras D. Molecular identification of *Vibrio tapetis*, the causative agent of the brown ring disease of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 2006; **253**: 25-38.
- 26) Saulnier D, Avarre JC, Moullac GL, Ansquer D, Levy P, Vonau V. Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of syndrome 93 in New Caledonia. *J. Microbiol. Methods* 2000; **40**: 109-115.
- 27) Osorio CR, Toranzo AE, Romalde JL, Barja JL. Multiplex PCR assay for *ureC* and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. *Dis. Aquat. Org.* 2000; **40**: 177-183.