

2種類のプライマーによる PCR を利用したニシキゴイの 穴あき病病原体 非定型 *Aeromonas salmonicida* の検出

的山 央人

Detection of atypical *Aeromonas salmonicida*, causal agent of ulcer disease,
in ornamental carp using two PCR primer sets

Hisato MATOYAMA

キーワード：ニシキゴイ，穴あき病，非定型 *Aeromonas salmonicida*

1996年頃から「新しいタイプの穴あき病」と称される疾病が大流行し、ニシキゴイ養殖業界に極めて大きな被害を与えている。的山ら¹⁾は新潟県内で発生した複数の池の病魚より、非定型 *Aeromonas salmonicida* を分離し、かつ単離した菌を用いた浸漬感染試験により、同様の病徴を再現できること、およびその薬剤感受性が現場での治療効果と一致することから、本菌が原因菌であることを示した。

本症の発生以来、新潟県内水面水産試験場では、県内で発生する穴あき病の病魚より菌分離を行い、分離された菌の性状試験や薬剤感受性試験等を行っている。しかし、本症の患部が環境水と接する体表等に形成されるため、水中や病巣に存在する多くの雑菌の中から本菌を分離しなければならず、発生当初から原因菌の分離成功率が低い状況にあった。さらに、加来ら²⁾は複数の分離培地における本菌の培養を試み、血液寒天培地等において発育促進効果を認めるものの、いずれの培地においても培養速度は極めて遅いことを示している。この結果、病魚から菌分離による診断を試みた場合、単離して同定するまでに1週間以上を要することが多く、このことが本症の迅速診断および確定診断における大きな問題となってきた。

現在、コイヘルペスウイルス (KHV) 病を初めとする多くの魚病病原体において、病魚からの迅速診断法、あるいは保菌魚からの高感度検出法として PCR 法が利用されている。*A. salmonicida* は魚病としてもっとも歴史の古い病気の一つであ

るサケ・マス類のせつそう病の原因菌でもあり、この菌を特異的に検出可能なプライマーも複数開発されている。Byers ら³⁾は様々な魚種より分離された *A. salmonicida* 308株を用いて、2種類のプライマーについて検討を行い、どちらのプライマーにも検出されない株はわずか0.6%であったことを示している。今回、この二つのプライマーについて、これまでに新潟県下で発生した穴あき病魚より分離され、凍結保存していた菌株を用いて特異性を確認すると同時に、2009年以降発生した穴あき病魚の診断時において、これらが利用可能かどうかについて検討を行ったので、ここに報告する。

材料と方法

県内発生穴あき病魚由来の保存菌株への特異性

1997年から2006年の間に新潟県下のニシキゴイ養魚場で発生した「穴あき病」の症例から分離し、-80℃で冷凍保存してあった7株(T83、T112、T153、T183、T1031、T061102、T061114 株)の菌株を供試した。菌株は解凍後、5%羊脱繊維血液を含むトリプトソイ寒天培地(栄研、以下5%血液添加TSA)上で20℃、48時間培養したものをを用いた。培養した菌を白金耳でかき取り、5 mg/mLの濃度になるように滅菌蒸留水中に懸濁した。菌懸濁液 1 mL を15,000rpm、5分、4℃で遠沈し、上清を取り除いたものを出発材料とし、Puregene (QIAGEN 社製)を用い、プロトコールは DNA

Purification from Gram-Negative Bacteria using the Genra Puregene Yeast/Bact.Kit に従って行った。

抽出した核酸は、PAAS プライマー：PAAS1 (CGTTGGATATGGCTCTTCCT)、PAAS2 (CTCAAAACGGCTGCGTACCA) および AP プライマー：AP1 (GGCTGATCTCTTCATCCTCA)、AP2 (CAGAGTGAAATCTACCAGCGGTGC) を用いて PCR で増幅した (O'Brien *et al.*⁴⁾、Gustafson *et al.*⁵⁾。PAAS の PCR の条件は、95°C で 30 秒加熱した後、94°C で 2 分、57°C で 30 秒、72°C で 30 秒の行程を 30 回繰り返し、最後に 72°C で 7 分保温した。AP の PCR 条件は、94°C で 30 秒加熱した後、94°C で 15 秒、57°C で 30 秒、72°C で 1 分 30 秒の行程を 30 回繰り返し、最後に 72°C で 3 分保温した。

検出限界

非定型 *A. salmonicida* T183 株を 5% 血液添加 TSA 培地上で 20°C、48 時間培養したものを用いた。培養した菌を白金耳でかき取り、5 mg/mL の濃度になるように滅菌蒸留水中に懸濁した。この菌原液を滅菌蒸留水で $10^1 \sim 10^6$ 倍までの希釈液を作製し、それぞれ 1 mL を 15,000rpm、5 分、4°C で遠沈し、上清を取り除いたものを出発材料とし、上述と同様の方法で核酸抽出を行った。菌原液の抽出核酸については、TE バッファーによって希釈し、分光光度計を用いて DNA 濃度を計測した。

PCR は抽出液 1 μ L をテンプレートとして、上述と同様の方法で両プライマーによって行った。菌培養液の生菌数については 5% 血液添加 TSA を用いて、ミスラ法によって計測した。

県内発生病魚からの PCR 検出および菌分離

2009 年から 2012 年に新潟県下のニシキゴイ養魚場で発生した「穴あき病」について、患部および鰓や臓器を一部切り出し、血液含有 TSA に播種すると同時に、組織からの核酸抽出を行った。核酸抽出は Puregene (QIAGEN 社製) を用い、プロトコールは DNA Purification from Tissue Using the Genra Puregene Tissue Kit に従って行った。それらについて AP あるいは PAAS プライマーによる PCR 検査を行い、菌の検出状況について比較を行った。また、菌分離に成功した場合は、保存株同様に培養後、核酸抽出を行い、両プライマーによる検査を行った。

実験感染生残魚からの PCR 検出

当場で生産したニシキゴイ当才魚 (平均体重 37.7g) 50 尾について、10 尾ずつ 5 区に分け、10 mg/L の濃度で 20°C、1 時間の浸漬感染後、60L 水槽内で経過を観察し、斃死直後に回収できた 18 尾および 30 日後の時点で生残していた 7 尾の計 25 尾について、体表に形成された患部 1 カ所と、鰓、腎臓について組織を切り出し、核酸抽出を行った。PCR 検査は PAAS プライマーのみ実施した。

結果

県内発生穴あき病魚由来の保存菌株への特異性

当場で保存していた 7 株の PCR 結果を図 1 に示す。PAAS プライマーは 7 株中 6 株、AP プライマーは 7 株全ての株が陽性となった。

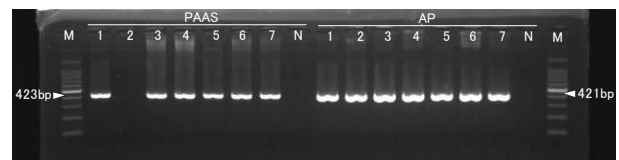


図 1 県内で発生した穴あき病魚より分離された非定型 *A. salmonicida* 7 株の PAAS および AP PCR 結果 (M:100bp DNA Ladder, 1:T83, 2:T112, 3:T153, 4:T183, 5:T1031, 6:T061102, 7:T061114)

検出限界

検出感度についての比較結果を図 2 に示す。PAAS プライマーは 9.5pg、AP プライマーは 95pg に相当する DNA 量まで検出された。

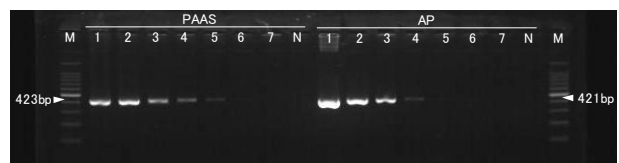


図 2 PAAS および AP PCR の検出限界 (M:100bp DNA Ladder, 1:T183 DNA 95ng, 2:9.5ng, 3:950pg, 4:95pg, 5:9.5pg, 6:950fg, 7:95fg)

県内発生病魚からの PCR 検出および菌分離

14 件の発生事例の 31 尾からの検出結果は表 1 に示す。どの発生事例についても、個体の複数の患

表1 県内で発生した穴あき病病魚からのPCR検出および菌分離状況

調査 年度	事例 (池)	供試魚 コード	患部				腎臓		鰓		
			検査 患部	PCR陽性数			菌分離 成功数	PCR 結果	菌分離 結果	PCR 結果	
				PAAS	AP	PAAS/AP					
2009	A	091	8	1		1	0	—	—	—	
	B	092	3	2	2	2	1	—	—		
	C	093	1	1		1	1	—	—		
		094	1	1		1	1	—	—		
	D	095	2	2	2	2	2	—	—	+	
2010	E	100	4	1	1	1	1	—	—	—	
		101	4	4	4	4	1	—	—	—	
	F	102	2	1		1	1	—	—	—	
	G	103	3	1		1	3	—	—	—	
	H	104	4	1	1	1	1	—	—		
		I	105	2		1	1	0	—	—	
	106		2		0	0	0	—	—		
	J	107	2		2	2	1	—	—		
		109	2	2	2	2	2	0	—	—	
	K	10A	2	2	2	2	2	1	—	—	
		10B	1	1	1	1	1	1	—	—	
		10C	1	1	1	1	1	1	—	—	
		10E	2	2	2	2	2	2	—	—	—
	L	10F	1	1	1	1	1	1	—	—	—
10G		1	1	1	1	0	—	—	—		
10H		1	1	1	1	0	—	—	—		
10I		1	1	1	1	1	—	—	—		
2011	L	111	1	0		0	0	—	—	—	
		112	2	0		0	0	—	—	—	
		113	2	1		1	0	—	—	—	
		114	2	2		2	0	—	—	—	
2012	M	120	2	2		2	2	—	—		
		121	2	1		1	1	—	—		
		122	1	1		1	1	—	—		
		123	3	3		3	0	—	—		
	N	124	8	3		3	1	—	—		
事例別			実施数	13	7	14	14				
			成功数	13	7	14	12				
			成功率	100%	100%	100%	86%				
-----			-----			-----			-----		
個別別			実施数	28	17	31	31	31	31	14	
			成功数	26	16	28	20	0	0	1	
			成功率	93%	94%	90%	65%	0%	0%	7%	
-----			-----			-----			-----		
患部別			実施数	67	35	73	73				
			成功数	40	25	43	25				
			成功率	60%	71%	59%	34%				

部のうちの一部あるいは全てにおいて本菌が検出された。個体ごとの検出率（陽性率）では PAAS で93%、AP で94%、患部ごとではそれぞれ60%と71%であった。一方、腎臓からの検出事例はなく、鰓での検出率も7%と低かった。なお、並行して行った菌分離については、発生事例ごとの検出率は86%、個体ごとで65%、患部ごとでは34%であった。また、菌分離に成功した12件について、分離された菌株を両プライマーによる検出を行ったところ、PAAS は12株中11株、AP は12株全てが陽性となった（図3）。

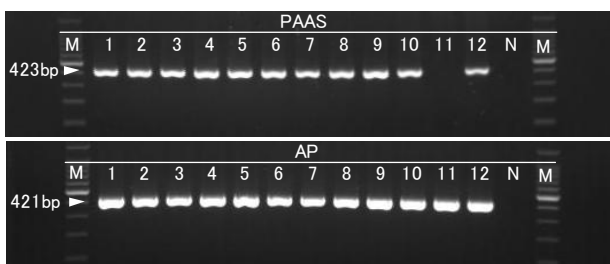


図3 2009年以降県内で発生した12件の穴あき病魚より分離された非定型 *A.salmonicida* の PAAS および AP PCR 結果 (M:100bp DNA Ladder, 1: B09001, 2: B09246, 3: B09321, 4: B09511, 5: B10711, 6: B10222, 7: B10432, 8: B10731, 9: B10A21, 10: B10E31, 11: B12451, 12: B12121)

実験感染生残魚からの PCR 検出

実験感染魚からの PCR 検出結果を表2に示す。

表2 実験感染魚からの PCR 検出結果

		PCR 結果		
		鰓	腎臓	患部
全個体	実施数	25	25	21
	陽性数	7	2	15
	陽性率	28%	8%	71%
斃死魚	実施数	18	18	14
	陽性数	6	2	11
	陽性率	33%	11%	79%
生残魚	実施数	7	7	7
	陽性数	1	0	4
	陽性率	14%	0%	57%

実験感染魚の患部からの検出率は71%であった。一方、鰓からの検出率は28%、腎臓からは8%であった。

考 察

今回、新潟県下で発生した穴あき病魚より分離された非定型 *A.salmonicida* に対する両プライマーの特異性を明らかにするため、1997～2006年までの発生事例の7株、および2009年以降の12件の発生事例の21株（うち12株のみ結果を提示）の計28株について検査を行った。その結果、PAAS プライマーは93%の株(26/28)において、APプライマーは全ての株(28/28)に対して反応した。このことは、Byers ら³⁾の報告に合致しており、穴あき病の診断における特異性については問題ないと判断した。

検出限界については、生菌数のわかっている菌液による濃度別の検出状況を調べたところ、PAAS については菌分離とほぼ同等であることがわかった。T183株で評価するかぎり、APはPAASよりも10倍程度感度が低く、T1031、B09511株での評価でも10～100倍程度感度が低かった（未掲載）。これらについても Byers ら³⁾の報告に合致する。この特性を加味し、基本的に初動検査では感度の高いPAASプライマーによって実施し、検出されなかった場合は、APプライマーによって確認検査を行うことが妥当であると考えられる。

2009年以降の県内での発生事例における病魚の診断時に、同じ魚の同じ患部について、菌分離とPCR検出を並行して実施した結果、最終的に穴あき病と診断した14件については、いずれもPCR法により *A.salmonicida* を検出したが、菌分離についてはうち2件において成功しなかった。一方、個体ごとの検出率では、PCR法で90%であったのに対し、菌分離は65%、患部ごとではPCR法が59%に対し、菌分離が34%ほどの検出率であった。いずれもPCR検出が菌分離を上回る結果となり、確定診断までに要する日数が、従来の菌分離法では1週間から10日程度であることを考慮しても、1～2日程度で確定診断可能な本法は、非

常に有効な手法であると考えられる。

一方で本法を用いても、県内発生魚の患部ごとの検出率は59%であり、実験感染魚の場合であっても71%程度であった。このことから、診断にあたっては、発生群の複数尾より検査を行うか、1尾あたりの検査患部数を複数にする等、検査数を増やすことにより、誤った陰性判定の回避に努める必要がある。

また、本症については、発生当初より、病魚の腎臓等の臓器から菌が分離されることはほとんどなく、人為的に高濃度の菌で浸漬感染させ、かつ斃死した個体であっても腎臓から菌が分離されることはほとんどなかった。このことから本症において生菌が血中に侵入し、敗血症を起こす可能性は極めて低いと推定されていた。今回、PCR法による県内発生病魚、実験感染魚の検査においても、腎臓からの検出率は、県内発生魚で0%、実験感染魚で8%と極めて低く、これまでの知見を支持する結果となった。鰓についても、県内発生魚で7%、実験感染魚で28%（生残魚：14%）と高くなく、保菌検査の標的器官となりえる検出率とはならなかった。本疾病が特定の標的器官を持たず、かつ明らかに本病によって形成された体表患部であってもPCR法における検出率は6～7割程度であることを考慮すると、本法の不顕性感染魚の保菌検査への利用は現時点では難しいと判断された。

要 約

県内で発生した穴あき病魚より分離した非定型 *Aeromonas salmonicida* 株を用いて PAAS、AP 両プライマーの検討を行ったところ、本疾病の迅速診断への使用にたえる特異性と検出率であると判断された。2009年以降の発生事例の12件において、PCR 検出と菌分離による検出を並行して試みた

ところ、PCR 法では100%、菌分離では83%の事例において検出に成功した。患部ごとでは PCR 法で59%、菌分離法で34%であった。このことから、事例においても PCR 法による検出が有効であることが実証された。実験感染魚での PCR 検出を行った場合、患部で71%であったのに対し、鰓では28%、腎臓では8%であった。この結果は県内で発生した際の事例によく一致し、診断に使用する際には体表に形成された複数の患部より検出を行う必要があると示唆された。

文 献

- 1) 的山央人, 星野正邦, 細谷久信. ニシキゴイの“新穴あき病”病魚から分離された非定型 *Aeromonas salmonicida* の病原性. 魚病研究. 1999 ; **34** : 189-193.
- 2) 加来佳子, 山田義行, 若林久嗣. 最近流行している穴あき病様疾病のコイから分離された非定型 *Aeromonas salmonicida* の性状. 魚病研究. 1999 ; **34** : 155-162.
- 3) Byers HK, Gudkovs N, Crane MStJ. PCR-based assays for the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. I. Evaluation of three PCR primer sets for detection and identification. *Dis. Aquat. Org.* 2002; **49**: 129-138.
- 4) O' Brien D, Mooney J, Ryan D, Powell E, Hiney M, Smith PR, Powell R. Detection of *Aeromonas salmonicida*, causal agent of furunculosis in salmonid fish, from the tank effluent of hatchery-reared Atlantic salmon smolts. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; **60**: 3874-3877.
- 5) Gustafson CE, Thomas CJ, Trust TJ. Detection of *Aeromonas salmonicida* from fish by using polymerase chain reaction amplification of the virulence surface array protein gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992; **58**: 3816-3825.