

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 10 年度博士課程 進学

スケンダ

氏名 Sukenda

指導教官 若林久嗣

論文題目 Studies on *Pseudomonas plecoglossicida* infection in ayu (*Plecoglossus altivelis*)
(アユの *Pseudomonas plecoglossicida* 感染症に関する研究)

内容

細菌性出血性腹水病は *Pseudomonas plecoglossicida* Nishimori, Kita-Tsukamoto and Wakabayashi 2000 を原因とする新しい病気で 1995 年頃から養殖アユに大きな被害を与えるようになった。病魚は本菌を含む血液混じりの腹水を貯留することを特徴とするが、感染や発病の機序については未だ殆ど研究されていない。そこで、筆者は、*P. plecoglossicida* の分離菌株を用いてアユに対する感染実験を行い、感染門戸、感染後の菌の動態、ワクチンの効果を調べた。これに先立ち、感染後のアユの各部位の菌数変化を経時的に定量するために *P. plecoglossicida* の定量 PCR 法を確立した。また、*P. plecoglossicida* に緑色蛍光蛋白遺伝子を組み込み、アユ体表面への本菌の付着部位の観察を容易にした。概要は以下の通りである

1. アユに対する *P. plecoglossicida* の感染実験

分離菌株のアユに対する病原性と症状の再現性を確認するために浸漬法と注射法による感染実験を行った。菌株 FPC941 の 10 倍希釈系列菌液 ($3 \times 10^3 \sim 3 \times 10^7$ CFU/mL) に実験魚 (体重約 7g) を 15 分間浸漬した後、流水に戻して感染死亡を観察した結果、浸漬法による LD₅₀ は 4.3×10^6 CFU/mL であった。また、同菌株を実験魚に腹腔内注射 (接種量 $3 \times 10^3 \sim 3 \times 10^7$ CFU/100g 体重) および筋肉内注射 (接種量 $3 \times 10^2 \sim 3 \times 10^7$ CFU/100g 体重) して LD₅₀ を求めたところ、そ

れぞれ 9.5×10^3 および 4.5×10^2 CFU/100g 体重であった。さらに、浸漬感染 (3×10^7 CFU/mL、15 分間) させたアユ体内の感染菌の分布を調べたところ、攻撃 2 日後には肝臓、脾臓、腎臓および血液に菌の存在が確認された。

2. *P. plecoglossicida* 不活化ワクチンによるアユの浸漬免疫実験

P. plecoglossicida はアユに承認された医薬品のみならず殆どの抗菌剤に耐性であることから、ワクチンの開発が望まれている。そこで、*P. plecoglossicida* 不活化ワクチンによる浸漬免疫実験を行った。ホルマリンで不活化した FPC941 菌液 (7×10^8 CFU/mL) に 30 分間浸漬する方法で免疫した実験アユ (体重約 7 g) を 2 週間後に二分し、片方を同じ方法で追加浸漬免疫した。実験魚および対照魚に対して最初の浸漬免疫から 2、4、6 週間後に浸漬攻撃試験 (3×10^7 CFU/mL、15 分間) を行い、1、2、3 日後に各試験区から 3 尾ずつ抜き取り感染菌の魚体内分布を調べ、また、10 日後までの死亡率を求めた。

攻撃試験における免疫魚群の死亡率はいずれの試験区においても対照魚群よりも低かった。また、初回免疫の 4 週間後の攻撃試験における一回免疫魚群と二回免疫魚群の死亡率はフィッシャーの直接確率で対照魚群よりも有意に低かったが、6 週間後の攻撃においては二回免疫魚群の死亡率は有意に低かったが、一回免疫魚群のそれは有意ではなかった。これらの結果から、浸漬免疫の有効性と追加浸漬免疫の免疫持続効果が示された。

初回免疫 6 週間後の浸漬攻撃 1、2、3 日後の各試験区からの抜き取り検査の結果、二回免疫魚の肝臓、脾臓、腎臓、血液のいずれからも菌は検出されなかったが、一回免疫魚では 1、2、3 日後にいずれも 3 尾中 1 尾の臓器の一部ないしは全てから菌が検出された。また、対照魚では 1、2 日後は 3 尾中の 2 尾、3 日後は 3 尾中 3 尾の臓器の一部ないしは全てから菌が検出された。この実験によって免疫の度合いに個体差のあること、とくに一回免疫では十分に免疫されない個体がかかり在ることが明らかになった。

3. 浸漬実験感染魚体内における *P. plecoglossicida* の動態の定量 PCR 法による追跡

P. plecoglossicida に実験感染させたアユの体内における菌の動態を追跡する際、培養法 (プレートカウント) では試料採取後直ちに計測作業をしなければならず、また、作業時間も長いので、短い時間間隔で多数の試料を計測することができない。そこで、試料の保存ができ、試料採取後にまとめて計測作業が可能な定量 PCR 法による *P. plecoglossicida* の定量法を確立した。つぎに実験アユを *P. plecoglossicida* で浸漬攻撃 (3×10^7 CFU/mL、15 分間) したのち、24°C の流水槽に収容し、攻撃後 1、3、6、12、24、48、72 時間後に 5 尾ずつ抜き取り、皮膚、鰓、肝臓、脾

臓、腎臓、および血液の中の菌量を定量 PCR 法によって計測した。

皮膚からは 1 時間後、鰓からは 3 時間後に菌が検出され、皮膚あるいは両者が浸入門戸であることが示唆された。6 時間後には肝臓、脾臓および腎臓からも菌が検出されるようになり、このことから菌と接触後 6 時間で感染が成立したと推定された。また、48 時間後、それまで検出されなかった血液に多量の菌が出現し、このことから 24 時間から 48 時間の間に敗血症に転帰したことが明らかになった。

4. 緑色蛍光蛋白遺伝子の *P. plecoglossicida* への組み込み

実験感染魚の体表面や体内における供試菌の観察を容易にするために、クラゲ (*Aequorea victoria*) 由来の緑色蛍光蛋白 (GFP) 遺伝子を組み込んで *P. plecoglossicida* を分子標識した。すなわち、市販の GFP ベクターの pGFPuv では *P. plecoglossicida* に GFP 遺伝子を組み込めなかったため、pGFPuv を *gfp* cDNA 源として、宿主範囲の広いプラスミド pME4510 を基に *P. plecoglossicida* に移入できる *gfp* 発現ベクターとしてプラスミド pSKL01、pSKT03、pSKN04 を新たに構築した。*Escherichia coli* JM109 を用いて定法によりプラスミドを増幅し、エレクトロポレーションにより *P. plecoglossicida* に移入した。これらのプラスミドを持つ菌株と持たない菌株の LB 培地での発育速度に差は無く、3 つのプラスミドのうち pSKT03 あるいは pSKN04 を持つ菌株は非選択培地上においても安定であった。pSKT03 を持つ菌株が最も多量の GFP を産生しことから感染実験には pSKT03 をもつ菌株を採用した。体重約 3 g のアユを供試菌液 (約 10^7 CFU/mL) に 15 分間浸漬して感染させ、感染 3 日後に血液塗抹標本および主要臓器の凍結切片標本を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、pSKT03 で標識された菌株は対照の無標識菌株と変わらない感染力を示し、感染魚の組織中の *P. plecoglossicida* の所在は緑色蛍光色素を指標として容易に検出することができた。

5. アユの皮膚への *P. plecoglossicida* の付着

前述の浸漬実験感染魚における *P. plecoglossicida* の動態の追跡実験により皮膚が主要な感染門戸であることが示唆されたことから、GFP 遺伝子の組み込みによって蛍光標識された菌株を利用してアユの皮膚への菌の付着の仕方を明らかにした。すなわち、次の 7 つの実験区を設け、各区 5 尾づつのアユを供試した。① 直径約 1 ミクロンの蛍光標識ラテックスビーズ懸濁液 (約 10^6 粒/mL) に実験魚を 15 分間浸漬し、さらにトリパンブルー液 (0.05%) に 10 分間浸漬した後、約 5 分間流水に収容した区、② GFP 遺伝子の組み込みによって蛍光標識された *E. coli* (約 10^7 CFU/mL) 懸濁液と上記の蛍光標識ビーズ懸濁液との混合液に実験魚を 15 分間浸漬し、

さらにトリパンプルー液（0.05%）に10分間浸漬した後、約5分間流水に収容した区、③②の蛍光標識 *E. coli* を蛍光標識 *P. plecoglossicida* に置き換えた区、④②と同様に蛍光標識 *E. coli* と蛍光標識ビーズの懸濁液に実験魚を浸漬するが、トリパンプルー液には浸漬しない区、⑤③と同様に蛍光標識 *P. plecoglossicida* と蛍光標識ビーズの懸濁液に実験魚を浸漬するが、トリパンプルー液には浸漬しない区、⑥ 蛍光標識していない *P. plecoglossicida*（野生株）と蛍光標識ビーズの懸濁液に実験魚を浸漬した区、⑦ 蛍光標識 *P. plecoglossicida* のみの懸濁液に実験魚を浸漬した区。各実験区から採取した実験魚の皮膚を剥ぎ、また鰭を切除して、その表面に付着する菌およびビーズを位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡で観察した。

皮膚や鰭に付着している蛍光標識 *P. plecoglossicida* は蛍光顕微鏡下で容易に検出された。蛍光標識 *P. plecoglossicida* の付着している箇所は、蛍光標識 *E. coli* および蛍光標識ビーズの付着箇所とほぼ一致していた。また、蛍光標識ビーズの付着箇所はトリパンプルーの染色箇所と一致し、このことは既に桐生（1999）によって報告されており、皮膚の微細損傷がトリパンプルーに染色されることが組織学的に証明されている。なお、トリパンプルーで皮膚や鰭の試料を染色すると蛍光標識された *P. plecoglossicida* あるいは *E. coli* が付着していてもその蛍光色はトリパンプルー色素に覆われて殆ど観察できなくなった。そこで、蛍光標識ビーズを蛍光標識細菌と混ぜて浸漬感染実験を行い、トリパンプルー染色をせずに、蛍光標識ビーズの付着する箇所を微細損傷箇所と判定することとした。これらの実験結果から、*P. plecoglossicida* には健全な皮膚に付着する特別な機能は備わっておらず、非病原菌である *E. coli* や非生物であるラテックスビーズと同じく皮膚の損傷部位に専ら付着することが判明した。このことから、*P. plecoglossicida* の病原細菌としての特性は付着機能には存在せず、付着後の宿主の防御反応に対して発揮されるものと推察された。

以上、本研究を通して、*P. plecoglossicida* はアユに感染する際、付着を有利にするような特別な機能はもたず、他の水中懸濁微粒子と同様に体表面のスレ（微細損傷部）に主に付着し、付着部位における魚側の防御に打ち勝って体内に侵入し、水温 24℃では6時間後までに肝臓、脾臓、腎臓などの臓器で増殖し始め、24～48時間後に敗血症になることが浸漬感染実験により明らかとなった。また、浸漬ワクチンにより免疫が付与され、追加免疫に免疫持続効果のあることが分かった。これらの成果は、アユの細菌性腹水病の防除対策に基礎的知見を提供すると思われる。