

39) PCR法による *Pseudomonas plecoglossicida* の同定

山本充孝

【目的】

アユの細菌性出血性腹水病原因菌の同定はポリクローナル抗体を用いたスライド凝集試験によって実施されている。この方法による本菌の同定は魚病診断時においては問題なく同定が可能であるが、魚体以外の例えば、環境から分離された菌において同定する際には交叉反応を示す可能性があり、適切でない場合がある。そこで、本試験では本菌に *gyrB* 領域の特異的なプライマーを用いた PCR 法によって同定が可能であるかを検討した。

【方法】

供試菌： *Pseudomonas plecoglossicida* 20 株 (表 2) および *Pseudomonas plecoglossicida* 以外の菌種の明確な細菌 6 株を供した (表 3)。また、2003 年 4 月～2004 年 1 月に天然河川および 7 つのアユ飼育施設の水中から分離され、スライド凝集試験で凝集が認められなかった未同定の細菌 88 株を任意に用いた。

PCRによる同定検査：

①DNA抽出：DNA抽出は 200 μ L の滅菌 PBS に供試菌を懸濁させて、アユ冷水病申し合わせ事項に記載されている Chelex100 を用いた加熱処理法で行った。

②PCR条件：20 μ L の PCR 反応液 [TaKaRa Ex taq 0.5U, 1 \times PCR buffer; 200 μ M dNTP, 1.5mM MgCl₂, 0.1 μ M プライマー, テンプレート DNA 1 μ L] を調製し、サーマルサイクラー (Applied Biosystems, CA, USA) ABI Gene Amp PCR System 9700 を使用し、PCR を行った。プライマーには GBPA-F、GBPA-R を用いた (表 1)。増幅条件は 94 $^{\circ}$ C \cdot 10 分、94 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒間、68 $^{\circ}$ C \cdot 1 分間、サイクル数 50 回とした。

最後に標的 DNA の増幅を 1.0%アガロース電気泳動後、臭化エチジウム染色して 244bp の位置のバンド有無によって判断した。

【結果および考察】

GBPA-F と GBPA-R のプライマーペアを用いた PCR 法により、増幅が期待される 244bp の産物は供試した *Pseudomonas plecoglossicida* 全 20 株で認められた (表 4)。一方、菌種が特定されている *Pseudomonas plecoglossicida* 以外の既知細菌では全株で認められなかった。また、天然河川およびアユ飼育施設の水中から分離された細菌の中で抗血清に対して凝集反応を示さない本菌とは異なる未同定菌 88 株についても何れも増幅は認められなかった。

このことから、GBPA-F と GBPA-R を用いた PCR 法は、本菌のみに特異的にバンドが認められたことから、分離された菌が *Pseudomonas plecoglossicida* であるか否かの菌種の鑑別に有効な方法であり、菌の同定に用いることができると考えられた。

表1. *Pseudomonas plecoglossicida*のgyrB領域に特異的なプライマーの塩基配列

プライマー名	塩基配列	塩基数
GBPA-F	5' -CCTGCTGAAGGACGAGCGTTCG -3'	22
GBPA-R	5' -AACCAGGTGAGTACCACCGTCG -3'	22

表2. *Pseudomonas plecoglossicida*供試菌株

菌株名	分離年	分離場所	PCR結果
FPC941	1994	Shiga	+
SG941219A	1994	Shiga	+
SG940926	1994	Shiga	+
SG941028	1994	Shiga	+
SG950106	1995	Shiga	+
SG950330	1995	Shiga	+
SG960729A	1996	Shiga	+
SG970718	1997	Shiga	+
SG990810A	1999	Shiga	+
SG000621	2000	Shiga	+
SG010806	2001	Shiga	+
SG020710	2002	Shiga	+
SG030107	2003	Shiga	+
H3-16	1991	Wakayama	+
93P1-0225	1993	Wakayama	+
94P1-0104	1994	Wakayama	+
PT86022	1986	Tokushima	+
PT99026	1999	Tokushima	+
PT99027	1999	Tokushima	+
PH-9501	1995	Hiroshima	+

表3. *Pseudomonas plecoglossicida*以外の既知細菌の供試菌株

菌種	菌株名	PCR結果
Vibrio anguillarum	PT479	-
Flavobacterium	SG990302	-
Flavobacterium	NCIMB 1947	-
Bacillus subtilis	ATCC6633	-
Bacillus cereus	ATCC11778	-
Micrococcus luteus	ATCC9341	-

表4. *Pseudomonas plecoglossicida*のgyrB領域に特異的なプライマーを用いた遺伝子検出結果

菌種	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	菌種特定株	菌種非特定株
陽性株数	20	0	0
検査株数	20	6	88

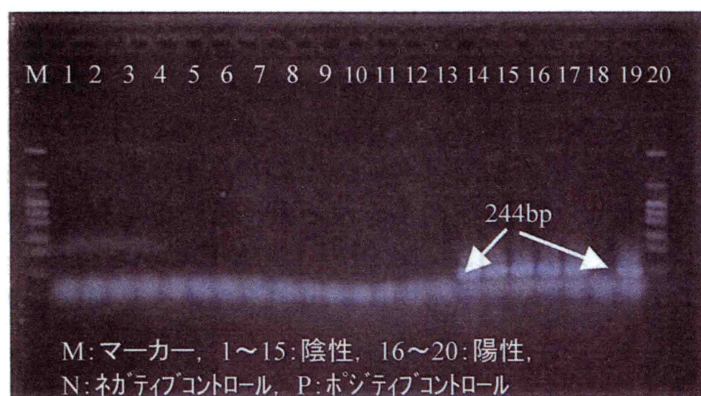


図1. *Pseudomonas plecoglossicida*同定のためのPCR検査結果