

ウニ病害原因菌 *Vibrio* spp. の同定のための 16S rRNA 遺伝子を 標的にした特異的 PCR の開発

曾我部陽子, 田島研一,* 田中礼士, 澤辺智雄, 絵面良男

(2001年3月23日受付, 2001年10月17日受理)

北海道大学大学院水産科学研究科

Development of 16S rRNA targeted PCR for the identification of *Vibrio* spp.,
the causative bacteria of the disease in cultured sea urchin
Strongylocentrotus intermedius occurring at low water temperatures

YOKO SOGABE, KENICHI TAJIMA,* REIJI TANAKA, TOMOO SAWABE AND YOSHIO EZURA

Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-0821, Japan

The causative bacteria, *Vibrio* spp., have been isolated from the diseased sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* at low water temperatures. To develop a specific identification method for the pathogens, species-specific nucleotide sequences in the 16S rRNA of *Vibrio* spp., were determined. We designed two PCR primers, DA2F and SK1F, based on the nucleotide sequences: DA2F forward primer (nucleotide numbers 456 to 476 in *Escherichia coli* 16S rRNA) for Date isolates and Sk1F forward primer (nucleotide numbers 455 to 478 in *E. coli* 16S rRNA) for Shiriuchi and Shikabe isolates.

The PCR product with about 1kbp was obtained in all causative bacteria from Date, Shiriuchi, Shikabe Breeding Centers and some of *Vibrio* reference strains by amplification with DA2F-1540R primer set, however, those from three Breeding Centers differed from the reference strains in the case of growth at 30°C. PCR amplification with SK1F-1540R primer set was able to differentiate the causative bacteria from Date and those from Shiriuchi and Shikabe. These results indicate that PCR amplification with two primers is useful for identification of *Vibrio* spp., which are the pathogens of cultured sea urchin.

キーワード：エゾバフンウニ, 低水温期病害, *Vibrio* spp., 16S rRNA, PCR

1994~5年に道南地方の伊達, 知内および鹿部のエゾバフンウニ種苗センターにおいて, 5~6月の低水温(11°Cから13°C)期に行なわれる選別作業後に大量死が見られ始めた。各種苗センターで原因菌として分離された菌は, 血清学的には異なるものの性状および発症個体の症状が酷似していたことから, *Vibrio* 属の同一菌種と考えられた。¹⁾しかし, その後のDNA-DNA相同性の検討結果から, 伊達由来原因菌と知内・鹿部由来原因菌とは異なる菌種であることが判明している。²⁾1995年以降, 知内・鹿部原因菌による本疾病が規模の大小はあるものの毎年のように発生している。最近1, 2年にはこれらの地域以外の種苗生産センターでも発生が見られるようになった。ウニ種苗センターで本疾病が発生した際には施設内外の種々の試料から原因菌の検出が行な

われるが, このような調査では原因菌の簡易同定手段として簡単な性状検査と原因菌多価抗血清が用いられてきた。しかし, 多価抗血清による凝集反応には類属反応があり, より信頼性の高い同定法の開発が望まれている。そこで本研究では, 性状検査や多価抗血清による凝集反応によらない原因菌の同定を検討するために, *Vibrio* 属並びにその近縁属菌と伊達および知内・鹿部由来の両原因菌の16S rRNA 遺伝子塩基配列の比較検討から, 原因菌に特異的な配列を forward primer に用いた PCR による同定を試みた。

材料と方法

供試菌株 伊達由来原因菌 *Vibrio* sp. (Da1~Da5 株) 5株, 知内由来原因菌 *Vibrio* sp. Sr1~Sr5 株) 5株, 鹿

* Tel : 81-138-40-5571. Fax : 81-138-40-5569. Email : ktajima@fish.hokudai.ac.jp

部由来原因菌 *Vibrio* sp. (Sk1~Sk5 株) 5 株, 当研究室保存の *Vibrio* 属对照株 34 株, *Alteromonas* 属, *Deleya* 属, *Marinomonas* 属, *Photobacterium* 属, *Pseudoalteromonas* 属 *Pseudomonas* 属および *Shewanella* 属对照株の計 29 株, 鹿部種苗センター飼育海水から分離した *Alteromonas* 属菌株 (H8 株, No. 14 株と No. 27 株) 3 株, *Pseudomonas* 属菌株 (No. 12 株と No. 15 株) と *Vibrio* 属菌株 (No. 3 株と No. 26 株) 各 2 株, 正常ウニ腸管から分離した *Vibrio* sp. (Ua1 株と Ug1 株)³⁾ 2 株およびハナサキガニ消化管白濁症原因菌 *Vibrio* sp. V365 株,⁴⁾ また下北半島沿岸域の海水から分離した *Alteromonas* 属菌株 (OM529 1-5 株, OM529 1-16 株,

OM918 2-16 株, OM918 2-17 株) 4 株, *Pseudomonas* 属菌株 (OM529 1-9 株と OM529 1-14 株) 2 株を供試した。さらに, 伊達種苗センターで病気が発生した際にウニ個体から分離した病原性のない *Vibrio* sp. No. 19 株と No. 36 株の総計 97 株を供試した (Table 1)。供試菌は海水寒天培地⁵⁾で継代並びに保存した。

DNA の抽出 DNA の抽出は Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いて行った。供試菌株を約 8 mL の海水液体培地に接種し 20°C で一晩振とう培養した後, 遠心分離 (14,000 rpm, 2 min) して集菌した。得られた菌体を Nuclei Lysis Solution に懸濁後, 80°C で 5 分間反応させ室温に放置冷却した。その後,

Table 1. Bacterial strains used in this study

| Strain | Strain No./Source | Strain | Strain No./Source |
|----------------------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| <i>Vibrio aestuarianus</i> | LMG 7909 ^T | <i>Vibrio</i> sp. | No. 3, 26, 19, 36, V365 |
| <i>V. adaptatus</i> | LMG 7889 ^T | | P-2P44, Ua1, Ug1 |
| <i>V. alginolyticus</i> | LMG 4409 ^T | <i>Photobacterium leiognathi</i> | NCMB 391 |
| <i>V. alginolyticus</i> | V-447 | <i>Alteromonas macleodii</i> | IAM 12920 ^T |
| <i>V. anguillarum</i> | NCMB 6 ^T | <i>Alteromonas</i> sp. | OM918 2-16, 918 2-17 |
| <i>V. ordalii</i> | ATCC 33509 ^T | | OM529 1-5, 529 1-16 |
| <i>V. campbellii</i> | ATCC 25920 ^T | | H8, No. 14, No. 27 |
| <i>V. cincinnatiensis</i> | LMG 7891 ^T | <i>Deleya aquamarina</i> | IAM 12550 |
| <i>V. costicolus</i> | NCMB 701 | <i>Marinomonas communis</i> | IAM 12914 |
| <i>V. damsela</i> | ATCC 33539 | <i>M. vaga</i> | IAM 12923 ^T |
| <i>V. diazotrophicus</i> | ATCC 33466 | <i>Pseudoalteromonas antarctica</i> | CECT 4664 ^T |
| <i>V. fisheri</i> | ATCC 7744 | <i>P. atlantica</i> | NCIMB 301 ^T |
| <i>V. fluvialis</i> | LMG 7894 ^T | <i>P. aurantia</i> | MCIMB 2033 |
| <i>V. furnissii</i> | LMG 7910 ^T | <i>P. aurantia</i> | DSM 6057 ^T |
| <i>V. harveyi</i> | NCMB 1280 | <i>P. carrageenovora</i> | MCIMB 302 |
| <i>V. harveyi</i> | LMG 7890 | <i>P. citrea</i> | KMM 216 |
| <i>V. hollisae</i> | JCM 1283 | <i>P. citrea</i> | ATCC 29719 ^T |
| <i>V. logei</i> | LMG 14011 | <i>P. elyakovii</i> | KMM162 ^T |
| <i>V. mediterranei</i> | LMG 11258 ^T | <i>P. elyakovii</i> | IAM 14594 |
| <i>V. metschnikovii</i> | LMG 11664 ^T | <i>P. elyakovii</i> | O21, O22 |
| <i>V. mytili</i> | LMG 16865 | <i>P. espejane</i> | IAM 12640 ^T |
| <i>V. natriegens</i> | ATCC 14048 | <i>P. espejane</i> | O17 |
| <i>V. navarrensis</i> | LMG 15976 ^T | <i>P. haloplanktis</i> | IAM 12915 ^T |
| <i>V. nereis</i> | ATCC 25917 | <i>P. nigrifaciens</i> | IAM 13010 ^T |
| <i>V. nigripulchritubo</i> | LMG 3896 ^T | <i>P. piscicida</i> | NCIMB 645 |
| <i>V. orientallis</i> | LMG 7897 ^T | <i>P. prydzensis</i> | ACAM 620 ^T |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | HO5 | <i>P. rubra</i> | ATCC 29570 ^T |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | LMG 2850 ^T | <i>P. tetraodonis</i> | IAM 14160 ^T |
| <i>V. pelagius</i> | ATCC 25916 | <i>P. tetraodonis</i> | KMM 458 |
| <i>V. proteolyticus</i> | NCMB 1326 | <i>P. undina</i> | IAM 12922 ^T |
| <i>V. salmonicida</i> | ATCC 43839 | <i>Pseudomonas</i> sp. | KMM 636 |
| <i>V. splendidus</i> | ATCC 33125 | | OM529 1-9, 529 1-14 |
| <i>V. tubiashii</i> | LMG 10936 ^T | | No. 12, No. 15 |
| <i>V. vulnificus</i> | LMG 13545 ^T | <i>Shewanella hanedai</i> | IAM 12641 ^T |
| <i>Vibrio</i> sp. | Da1-5, Sr1-5, Sk1-5 | <i>Shewanella</i> sp. | KMM 3299 |

LMS: Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent, Gent, Belgium.

JCM: Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japan.

IAM: IAM Culture Collection, Tokyo, Japan.

KMM: Collection of Marine Microorganisms, Vladivostok, Russia.

NCMIB: National Collection of Industrial Marine Bacteria, Aberdeen, Scotland.

ATCC: American Type Culture Collection, Maryland, U.S.A.

ACAM: Australian Collection of Antarctic Microorganisms, Australia.

CECT: Collection Espanolade Cultivos Tipo, Valencia, Spain.

RNase Solution 3 μ Lを加え十分に混合して37°Cで60分間反応させた。室温で放冷後、Protein Precipitation Solution 200 μ Lを加え攪拌し5分間水冷した。遠心分離(14,000 rpm, 2 min)後、上清をとりイソプロパノール600 μ Lを加えチューブをよく振り混ぜ、遠心分離(14,000 rpm, 2 min)でDNAを沈殿させた。沈殿を70%エタノールで洗浄し乾燥させた後、得られたDNAをTE buffer (10 mM Tris-2 mM EDTA, pH 8.0)に溶解させ template DNA 溶液を得た。この溶液は使用するまで-20°Cで保存した。

特異的塩基配列の検索並びにプライマーの設計 伊達由来原因菌2株(Da2株とDa4株)、知内・鹿部由来原因菌各1株(Sr3株とSk1株)およびGene Bank databaseから検索した既知の*Vibrio*属細菌37菌種、*Photobacterium*属3菌種、また、当研究室で正常ウニ腸管から分離した*Vibrio* sp. 3株(Ua1株, Ug1株, Ud10株)³⁾およびハナサキガニ消化管白濁症原因菌*Vibrio* sp. V365株⁴⁾の16S rRNA 遺伝子塩基配列の比較検討から伊達由来原因菌と知内・鹿部由来原因菌に特異的な配列部分を検索した。両原因菌に特異的な配列を基に、伊達由来原因菌については forward primer として DA2F プライマー、5'-GGTAACGTTAATAGCGTTATC-3' (*Escherichia coli* numbering 456 から 476 番目に相当する 21 塩基)を、知内・鹿部由来原因菌については forward primer として SK1F、5'-GTGTGTAGTTAATA-GCTGCGCATC-3' (*E. coli* numbering 455 から 478 番目に相当する 24 塩基)を設計した。reverse primer としてユニバーサルプライマーである 1540R プライマー、5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'を用いた。なお、すでに報告しているように知内由来原因菌と鹿部由来原因菌は同一菌種であり、これら原因菌と伊達由来原因菌とは異なる菌種である。²⁾

16S rRNA 遺伝子の増幅 16S rRNA 遺伝子の増幅には、設計した各プライマーセットを用いてPCRを行った。DNA濃度が100 ng/100 μ L (PCR反応液)になるように調製した前述の template DNA 溶液を含むPCR反応液 [1 \times PCR buffer, dNTPs mix (各 200 μ M), 0.2 μ M DA2F primer-0.2 μ M 1540R primer, 1.5 mM MgCl₂] にミネラルオイルを重層後、サーマルサイクラー (PERKIN ELMER PJ-2000 Model 480) を用いて 94°C で 1 分間保持した後、熱変性 (94°C-1 min)、アニーリング反応 (58°C-1 min)、伸長反応 (72°C-1.5 min) の反応を 30 cycle 繰り返し、16S rRNA 遺伝子の増幅を行った。

増幅産物の確認は 1.5% アガロース電気泳動により行った。ゲルは 0.5 \times TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM-EDTA) にアガロース (Nippon gene) を加えて作製し、泳動には 0.5 \times TBE buffer を用い、約 30 分間室

温で定電圧 (100 V) の泳動を行った。泳動用試料は、16S rRNA 遺伝子増幅産物 5.0 μ L に分子量マーカー (30% グリセロール, 0.25% プロモフェノールブルー) 1.0 μ L を混合させたものを供試した。泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色して紫外線照射下で観察し、伊達由来原因菌と同一の約 1080 bp のバンドが認められたものについては 30°C での発育の有無を調べた。

試料採取および試料の培養 北海道水産種苗センター鹿部支所で飼育中のウニ個体、飼育海水、飼育カゴおよび飼育水槽内壁付着物を供試した。ウニ個体試料は 75% 滅菌人工海水で洗浄後、海水寒天培地に個体を押し付けて培養した。ウニ体腔液は、周口膜をアルコール綿で消毒後、滅菌注射器で採取して海水寒天培地に表面塗抹した。飼育カゴ付着物、飼育水槽内壁付着物は滅菌綿棒で採取後、75% 滅菌人工海水で適宜希釈して海水培地に塗抹した。海水試料については、約 200 mL を孔径 0.45 μ m のフィルター (Millipore HA) で濾過し、フィルターを海水寒天培地に貼り付け培養した。試料を接種した培地は 15°C で 5 日間培養した。

***Vibrio* 属菌の簡易同定** 前述した各試料の海水寒天培地に形成された集落のうち原因菌と色調が類似した集落を釣菌して TCBS 寒天培地へ移植して増菌させた。これらの集落の中で白糖非分解菌のみを海水培地平板に移植し (本疾病原因菌は白糖非分解菌である²⁾) 30°C で培養した。30°C で発育しない菌 (本疾病原因菌は 30°C で発育しない²⁾) についてグラム染色、グルコース分解試験、塩類要求性試験、運動性試験、オキシダーゼ試験およびカタラーゼ試験の検査性状により *Vibrio* 属細菌を選択した。

特異プライマーセットによる増幅 前記 *Vibrio* 属細菌について DNA を抽出した後、DA2F-1540R プライマーセットで増幅、次いで原因菌と同一の約 1080 bp の増幅産物が得られた菌株について SK1F-1540R プライマーセットによる増幅を行った。SK1F-1540R プライマーセットで増幅のみられた菌株を知内・鹿部由来原因菌、増幅のみられなかった菌株を伊達由来原因菌と同定した。

DNA-DNA 相同性の測定 前記 SK1F-1540R プライマーセットによる PCR で増幅のみられた菌株について DNA-DNA 相同性により原因菌の最終確認を行なった。DNA-DNA 相同性の測定は、Ezaki らの方法⁶⁾にほぼ準拠してフォトビオチン標識 DNA を用いたマイクロプレートハイブリダイゼーション法によって行った。鹿部由来原因菌代表株 Sk1 株の DNA を標識 DNA とした。

結果および考察

伊達由来原因菌 2 株 (Da2 株と Da4 株)、知内・鹿部由来原因菌各 1 株 (Sr3 株と Sk1 株) および Gene

Bank database から検索した既知の *Vibrio* 属細菌 37 菌種, *Photobacterium* 属 3 菌種, 当研究室で正常ウニ腸管から分離した *Vibrio* sp. 3 株 (Ua1 株, Ug1 株, Ud10 株)³⁾ およびハナサキガニ消化管白濁症原因菌 *Vibrio* sp. V365 株⁴⁾ の 16S rRNA 遺伝子塩基配列の比較検討から, 伊達および知内・鹿部由来原因菌同定のための特異配列を検索した。その結果, 両原因菌と上記の *Vibrio*・*Photobacterium* 属細菌との間で塩基配列が異なり, さらに伊達由来原因菌と知内・鹿部由来原因菌とで塩基配列の異なる部位が, *E. coli* numbering 456 から 476 番目に相当する塩基配列の部位にみられた。そこで, 伊達由来原因菌に特異的な塩基配列部位, *E. coli* numbering 456 から 476 番目に相当する 21 塩基を DA2F プライマー (forward primer), 知内・鹿部由来原因菌に特異的な塩基配列部位, *E. coli* numbering 455 から 478 番目に相当する 24 塩基を SK1F プライマー (forward primer) とし, reverse primer としてユニバーサルプライマーである 1540R プライマーを用いて 2 組のプライマーセットを作成した。

まず, DA2F-1540R と SK1F-1540R の両プライマーセットを用いて, 伊達, 知内および鹿部由来原因菌各 5 菌株の計 15 株の PCR 増幅を行った。DA2F-1540R プライマーセットを用いた PCR では, 原因菌 15 菌株すべてに所定の約 1080 bp の増幅産物がみられた。SK1F-1540R プライマーセットを用いた PCR では, 知内および鹿部由来原因菌の各 5 株は所定のサイズの産物が増幅されたが, 伊達由来原因菌 5 株には増幅がみられなかった (Table 2)。これらの結果から, DA2F-1540R プライマーセットを用いた PCR によって本疾病原因菌を特定した後, SK1F-1540R プライマーセットを用いた PCR により, 伊達由来原因菌と知内・鹿部由来原因菌とを区別することが可能であることが示唆された。

そこで *Vibrio* 属対照株 34 株を供試して DA2F-1540R プライマーセットを用いた PCR 増幅を行った。結果は示していないが, *Vibrio* sp. Ug1 株, *Vibrio* sp. P-2P44 株, *V. hollisae* および *V. fischeri* に原因菌と同一サイズの増幅産物がみられた。さらに, 供試 *Vibrio* 属対照菌株以外の海洋細菌についても増幅産物がみられるか否かを調べるため, 鹿部種苗生産センターの飼育海水から分離した *Alteromonas* 属, *Pseudomonas* 属および *Vibrio* 属菌株各 2 株の計 6 株, *Vibrio* 属以外の *Alteromonas* 属, *Deleya* 属, *Marinomonas* 属, *Photobacterium* 属, *Pseudoalteromonas* 属, *Pseudomonas* 属 および *Shewanella* 属対照株 32 株, さらに本病害の発症水温と近い海水温 (13.2°C) 時に下北半島沿岸域の海水から分離した *Alteromonas* 属菌株 2 株 (OM529 1-5 株と OM529 1-16 株), *Pseudomonas* 属菌株 2 株 (OM529 1

Table 2. PCR product from DNAs of the causative *Vibrio* spp. Da1-5, Sr1-5 and Sk1-5 with DA2F-1540R and SK1F-1540R primer sets

| Strain | Primer set | |
|--------|------------|------------|
| | DA2F-1540R | SK1F-1540R |
| Da1 | + | - |
| Da2 | + | - |
| Da3 | + | - |
| Da4 | + | - |
| Da5 | + | - |
| Sr1 | + | + |
| Sr2 | + | + |
| Sr3 | + | + |
| Sr4 | + | + |
| Sr5 | + | + |
| Sk1 | + | + |
| Sk2 | + | + |
| Sk3 | + | + |
| Sk4 | + | + |
| Sk5 | + | + |

+: positive

-: negative

-9 株と OM529 1-14 株), 伊達種苗センターで病気が発症した際にウニ個体から分離した病原性のない *Vibrio* sp. 2 株 (No. 19 株と No. 36 株) についても併せて調べた。その結果, 鹿部種苗生産センターの飼育海水から分離された *Vibrio* sp. No. 3 株と No. 26 株および伊達種苗センターのウニ体腔液から分離した *Vibrio* sp. No. 36 株に原因菌と同一の約 1080 bp の増幅産物が認められた (Fig. 1)。

なお, DA2F-1540R プライマーセットによる増幅において, 原因菌と同一サイズの増幅産物がみられた菌株 *Vibrio* sp. Ug1 株, *V. fischeri*, *V. hollisae*, *Vibrio* sp. P-2P44 株, 鹿部海水分離菌 *Vibrio* sp. No. 3 株と No. 26 株および伊達種苗センター分離菌 *Vibrio* sp. No. 36 株の計 7 株について 30°C での発育の有無を調べた。原因菌以外の菌株はすべて 30°C で発育したことから, 30°C での発育の有無を調べることによって, これら菌株と原因菌との鑑別が可能であった。

よって, 供試菌について, DA2F-1540R プライマーセットによる増幅を確認した後, 30°C で発育しないものについて, SK1F-1540R プライマーセットによる増幅を行えば, 本疾病原因菌を特定でき, さらに伊達由来原因菌と知内・鹿部由来原因菌とを区別することができると思われた。

次に, 北海道水産種苗センター鹿部支所において低水温期の本疾病の発生が予想される時期の選別作業後に, 試料の採取を行ない本疾病原因菌 *Vibrio* sp. の同定を

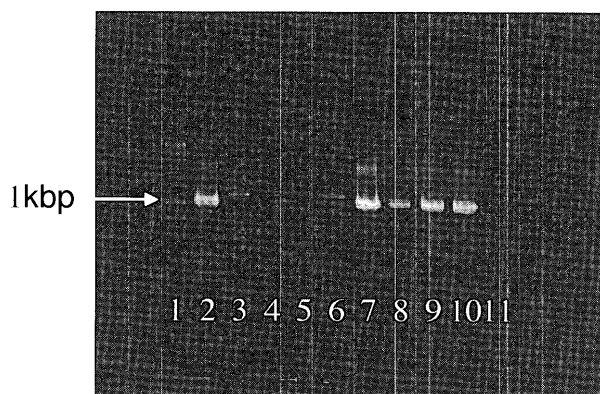


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products from *Vibrio* sp., *Alleromonas* sp. and *Pseudomonas* sp. with the primer DA2F and 1650R. Gel was stained with EtBr. Lanes: 1, length marker (1 kb DNA Ladder); 2, *Vibrio* sp. Da2; 3, *Alleromonas* sp. OM529 1-5; 4, *Alleromonas* sp. OM918 2-1; 5, *Pseudomonas* sp. OM529 1-9; 6, *Vibrio* sp. No. 19; 7, *Vibrio* sp. No. 36; 8, *Vibrio* sp. No. 3; 9, *Vibrio* sp. No. 26; 10, *Vibrio* sp. Da2; 11, negative control (without template).

試みた。各試料の海水寒天培地に形成された集落のうち原因菌と色調が類似した集落を釣菌して TCBS 寒天培地へ移植して増菌させた。これらの集落の中で白糖非分解菌のみを海水培地平板に移植し 30°C で培養した。30°C で発育しなかった菌株について前述の検査性状により *Vibrio* 属細菌 16 株を得た。これら 16 株について、まず DA2F-1540R プライマーセットによる増幅を行った結果、飼育海水から分離された Bc21 株のみに伊達由来原因菌と同一サイズの増幅産物がみられた (Table 3)。次いで Bc21 株は、SK1F-1540R プライマーセットでも増幅された (Fig. 2) ことから、知内・鹿部由来原因菌と同一菌種と考えられた。なお、Bc21 株はデータは示していないが、鹿部原因菌抗血清に対して凝集反応陽性を示し、さらに、鹿部由来原因菌代表株 Sk1 株との DNA-DNA 相同性を調べた結果、77.0% の相同性を示した。これらの結果から、Bc21 株は知内・鹿部由来原因菌と同一菌種であることが確認された。

以上の結果より、分離被検菌について 30°C での発育の有無、および本研究で設計した二つのプライマーセットでの PCR 増幅を組み合わせることで、低水温期のウニ病害原因菌は同定できることが示唆された。

本来、疾病の原因菌の同定には DNA-DNA 相同性の測定が必要だが、すべての分離菌株について DNA-DNA 相同性を調べるには非常に労力と時間を要する。2000 年 6 月、これまでに本疾病の発生が見られなかった北海道央域のウニ種苗センターで本疾病が発生した際、採水口海域を含めた近傍海域における原因菌の生態

Table 3. PCR product from DNAs of *Vibrio* spp. from various samples which do not grow at 30°C with DA2F-1540R primer sets

| Strain | Primer set | |
|--------|------------|------------|
| | DA2F-1540R | SK1F-1540R |
| Bc1 | - | - |
| Bc2 | - | - |
| Bc5 | - | - |
| Ba6 | - | - |
| Bc7 | - | - |
| Bc10 | - | - |
| Bc12 | - | - |
| Bc13 | - | - |
| Bc14 | - | - |
| Bc21 | + | + |
| Bc2-2 | - | - |
| Bc2-3 | - | - |
| F4 | - | - |
| F5 | - | - |
| F17 | - | - |
| G6 | - | - |

+: positive

-: negative

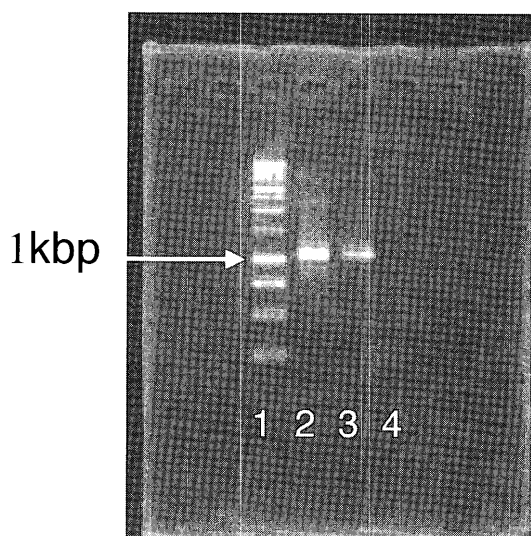


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products from *Vibrio* sp., Bc21 with the primer SK1F and 1540R. Gel was stained with EtBr. Lanes: 1, length marker (1kb DNA Ladder); 2, *Vibrio* sp. Sk1; 3, *Vibrio* sp. Bc21 isolated from rearing seawater; 4, negative control (without template).

調査を実施した。この調査で原因菌の簡易同定手段として原因菌多価抗血清を用いたが、多価抗血清による凝集反応には類属反応があり、より信頼性の高い同定法の開発が望まれた。本研究で開発した原因菌特異的プライマーを用いた PCR と 30°C での発育の有無を調べるこ

とでこの目的が達成できると考える。

謝 辞

ウニ個体の提供を頂いた北海道栽培漁業振興公社鹿部支所の職員各位に謝意を表す。

文 献

- 1) Tajima K, Takeuchi K, Iqbal K K, Nakano K, Shimizu M, Ezura Y. Studies on a bacterial disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* occurring at low water temperature. *Fish. Sci.* 1998; **64**: 918-200.
- 2) Takeuchi K, Tajima K, Iqbal M M, Sawabe T, Ezura Y. Taxonomical and serological studies on the causative bacteria of the disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* occurring at low water temperatures. *Fish. Sci.* 1999; **65**: 264-268.
- 3) Sawabe T, Oda Y, Shiomi Y, Ezura Y. Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones. *Microb. Ecol.* 1995; **30**: 193-202.
- 4) 渡辺研一, 吉水 守, 尾花博幸, 鎌田研一, 杉澤輝文, 澤辺智雄, 絵面吉雄. ハナサキガニ幼生の大量死に関する細菌学的研究. 北大水産彙報 1999; **50**(1): 19-22.
- 5) Tajima K, Hirano T, Shimizu M, Ezura Y. Isolation and pathogenicity of the causative organism of spotting disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Fish. Sci.* 1997; **63**: 249-252.
- 6) Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E. Fluorometric deoxy-nucleic acid-deoxynucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1989; **39**: 224-229.