



| | |
|------------------|---|
| Title | ビブリオ病原菌の血清学的検討－Ⅱ：V. anguillarumの0血清型(J-0-4～J-0-8) |
| Author(s) | 田島, 研一; TAJIMA, Kenichi; 絵面, 良男 他 |
| Citation | 北海道大學水産學部研究彙報, 37(3), 240-245 |
| Issue Date | 1986-08 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/23925 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 37(3)_P240-245.pdf |



ビブリオ病原菌の血清学的検討—II
V. anguillarum の O 血清型 (J-O-4~J-O-8)

田島 研一*・絵面 良男*・木村 喬久*

Serological Typing of Thermostable Antigens
of *V. anguillarum*—II
V. anguillarum O-serotypes (J-O-4~J-O-8)

Kenichi TAJIMA*, Yoshio EZURA*, and Takahisa KIMURA*

Abstract

In a previous paper (Tajima *et al.*, 1986), we reported that *V. anguillarum* strains showed three distinguishable serological groups (J-O-1, J-O-2 and J-O-3). However three strains of *V. anguillarum* and *V. ichthyoderms* NCMB 407 (one type strain of *V. anguillarum*) could not be classified as any particular serotype. In addition, strains of *V. anguillarum* isolated from marine environments in Otsuchi Bay in Iwate prefecture were also not classified into any 3 O-serotypes. Because these unclassified strains are noteworthy in relation to diagnosis, prevention and vaccine preparation for the vibriosis, we examined the serological relationship between the representative strains of the above 3 serotypes and the unclassified strains. From the results, the *V. anguillarum* could be classified into eight serological groups (J-O-1~J-O-8) based on analysis of thermostable antigens.

緒 言

前報 (田島ら, 1986) においてビブリオ病原菌は 3-O 血清型に型別されることが明らかになり, これに基づいて全供試菌の O 血清型別を行った結果, ビブリオ病原菌国内分離株 219 株は, 分類上 *V. anguillarum* とは類縁関係の認められなかった *Vibrio* spp. および *Aeromonas* spp. の 24 株が型別不能であったのを除くと大部分の菌株はいずれかに型別された。しかし *V. anguillarum* (phenon I) に分類された 170 株中の 3 株と, 同時に供試した対照株中 *V. anguillarum* の標準株 *V. ichthyoderms* NCMB 407 の計 4 株が 3-O 血清型のいずれにも型別されなかった。ところで前報 (田島ら, 1986) の O 血清型別の結果では, O 血清型は菌株の由来魚ならびにその飼育環境に深い関わりが窺われたことから, 型別不能株についての検討は, *V. anguillarum* の生態をも含めた疫学上からも重要なことと思われる。そこで本報では, これら型別不能の菌株と前報 (田島ら, 1986) の 3-O 血清型 (J-O-1, J-O-2, J-O-3) 株との O 抗原構造の関連性について詳細に検討した。なお上記型別不能株に, 著者らが岩手県大槌湾ギンマス養殖環境から分離した菌株 (田島他 未発表) で, 一般性状の詳細な検討から *V. anguillarum* 標準株と一致した性状を示すにもかかわらず, いずれの抗血清に対しても凝集の認められなかった菌株の代表株も併せ供試した。

* 北海道大学水産学部微生物学講座
(Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, 041 Hakodate, Japan.)

実験方法

1. 供試菌株

前報 (田島ら, 1986) で供試した菌株のうち J-O-1 型として V-7 (NCMB 6) 株, J-O-2 型として V-123 (PTE-1, 楠田 II 型) 株, J-O-3 型としては V-104 (NOAA V-775, U.S. serotype I) 株を選び, これに前報 (田島ら, 1986) の O 型血清型別において型別不能であった phenon I の 3 株 (V-183, V-196, V-231) と *V. anguillarum* 標準株の一つ *V. ichthyodermis* NCMB 407 (V-116), さらに岩手県大槌湾ギンマス養殖環境試料由来の *V. anguillarum* の代表株 (E6-5) を加えた計 8 株を供試した。供試株は Table 1 にまとめて示した。

Table 1. Strains used for preparation of antigens and rabbit antiserum

| Serotype | Strain No. | | Species name |
|----------|------------|-------------------------------------|-----------------------|
| J-O-1 | V-7 | (NCMB 6) | <i>V. anguillarum</i> |
| J-O-2 | V-123 | (PTE-1, Kusuda II) | " |
| J-O-3 | V-104 | (NOAA V-775, US-O-I) | " |
| Unknown | V-183 | | " |
| " | V-196 | | " |
| " | V-231 | | " |
| " | V-116 | (<i>V. ichthyodermis</i> NCMB 407) | " |
| " | E6-5 | | " |

2. 抗血清の作製

1) 免疫抗原

Table 1 の供試菌 8 株について, 前報 (田島ら, 1986) 同様常法に従って免疫抗原 (ホルマリン抗原) を作製した。

2) 免疫法

前報 (田島ら, 1986) 同様の免疫スケジュールに基づきウサギを免疫し, 抗血清を採取した。

3) 反応抗原

前述の各供試菌について, 前報 (田島ら, 1986) と同様の方法により耐熱性反応抗原を作製した。ただし加熱操作を 100°C, 1 時間の加熱に替え, 121°C, 20 分のオートクレーブによる加熱を行った。

4) 抗体価の測定

前報 (田島ら, 1986) と同様の方法により測定した。

5) 交叉吸収試験

前報 (田島ら, 1986) と同様の方法により吸収血清を作製した。

6) のせガラス (ためし) 凝集反応

前報 (田島ら, 1986) と同様の方法により凝集の有無を判定した。

結果および考察

1. 交叉凝集反応

J-O-1~J-O-3 の 3 抗血清に加えて型別不能の 5 株の抗血清とそれぞれの反応抗原との交叉凝集反応の結果は Table 2 に示した。供試各抗血清はそれぞれの homo の抗原に対して凝集がみられた他に、抗 J-O-3 (V-104) 血清と V-231 株、抗 V-116 (*V. ichthyodermis*) 血清と E6-5 株との間にもそれぞれ弱い凝集がみられた。しかしこれらと対応する逆の反応、すなわち抗 V-231 血清と J-O-3 型株、抗 E6-5 血清と V-116 株との反応はいずれも陰性であった。

Table 2. Slide cross-agglutination reactions of eight strains against each antiserum

| serum | antigen | | | | | | | |
|---------------|---------|-------|-------|-------|-------|----------------|-------|----------------|
| | V-7 | V-123 | V-104 | V-183 | V-196 | V-231 | V-116 | E6-5 |
| V-7 (J-O-1) | + | - | - | - | - | - | - | - |
| V-123 (J-O-2) | - | + | - | - | - | - | - | - |
| V-104 (J-O-3) | - | - | + | - | - | + ^w | - | - |
| V-183 | - | - | - | + | - | - | - | - |
| V-196 | - | - | - | - | + | - | - | - |
| V-231 | - | - | - | - | - | + | - | - |
| V-116 | - | - | - | - | - | - | + | + ^w |
| E6-5 | - | - | - | - | - | - | - | + |

+^w: weakly positive

2. 定量交叉凝集反応

供試各抗血清とそれぞれの反応抗原について定量交叉凝集反応の結果は Table 3 に示した。各抗血清と homo の抗原との凝集素価は 2,560~10,240 の範囲で高い値を示した。また前述のように、ためし凝集反応で弱い凝集のみられた抗 J-O-3 型血清と V-231 株、抗 V-116 血清と E6-5 とは共に凝集素価 256 を示した。しかし先のためし凝集反応でもみられたように、これらと対応する

Table 3. Cross-quantitative agglutination reactions of eight strains against each antiserum

| serum | antigen | | | | | | | |
|---------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| | V-7 | V-123 | V-104 | V-183 | V-196 | V-231 | V-116 | E6-5 |
| V-7 (J-O-1) | 5120 | 32 | 16 | 128 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| V-123 (J-O-2) | 64 | 10240 | 16 | 64 | 16 | 128 | 64 | 16 |
| V-104 (J-O-3) | 64 | 16 | 2560 | 128 | 16 | 256 | 256 | 32 |
| V-183 | 64 | 128 | 64 | 5120 | 64 | 256 | 128 | 32 |
| V-196 | 64 | 16 | 16 | 32 | 2560 | 32 | 128 | 8 |
| V-231 | 4 | 8 | 64 | 8 | 16 | 10240 | 128 | 8 |
| V-116 | 64 | 32 | 64 | 128 | 32 | 128 | 5120 | 256 |
| E6-5 | 64 | 8 | 4 | 32 | 4 | 16 | 64 | 5120 |

逆の反応系、抗 V-231 血清と J-O-3 型株、抗 E6-5 血清と V-116 株との間の凝集素価は共にわずか 64 に過ぎなかった。また抗 V-183 血清と V-231 株、抗 J-O-3 型血清と V-116 株との間にも 256 の凝集素価が観察されたが、これらと対応する逆の反応系の凝集素価はそれぞれ 8, 64 と低いものであった。なお上記以外の hetero 抗原との凝集反応ではいずれも 128 以下と低い値であった。

以上、ためし凝集反応および定量交叉凝集反応の結果から、各供試菌株は O-抗原構造が異なることが推察され、加えて J-O-3 型株と V-231 株、V-116 株と E6-5 株とはそれぞれ共通の O-抗原を有することが推察された。

3. 交叉吸収試験

供試 8 抗血清とそれらの抗原との交叉吸収試験は Table 4 にまとめて示した。8 種の各抗血清それぞれについて、hetero の加熱死菌抗原で吸収後、homo の抗原との凝集反応はすべて陽性を示した。すなわち型別不能の 5 株 (V-183, V-196, V-231, V-116, E6-5) は前報 (田島ら, 1986) の 3-O 血清型 (J-O-1, J-O-2, J-O-3) の菌株とは明らかに異なる O-抗原構造を有していること、さらに供試 8 菌株はそれぞれ特異な O-抗原因子を有していることが明らかになった。そこでこれまでの

Table 4. Cross-agglutination reactions of eight antisera after adsorption with cells of heterologous strains

| serum | adsorbing strain | antigen | | | | | | | |
|-----------------------------------|------------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| | | V-7 | V-123 | V-104 | V-183 | V-196 | V-231 | V-116 | E6-5 |
| J-O-1 V-7 (NCMB 6) | V-123 | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | V-104 | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | V-183 | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | V-196 | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | V-231 | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | V-116 | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | E6-5 | + | - | - | - | - | - | - | - |
| J-O-2 V-123 (PTE-1) | V-7 | - | + | - | - | - | - | - | - |
| | V-104 | - | + | - | - | - | - | - | - |
| | V-183 | - | + | - | - | - | - | - | - |
| | V-196 | - | + | - | - | - | - | - | - |
| | V-231 | - | + | - | - | - | - | - | - |
| | V-116 | - | + | - | - | - | - | - | - |
| | E6-5 | - | + | - | - | - | - | - | - |
| J-O-3 V-104 (NOAA V-775) | V-7 | - | - | + | - | - | + | - | - |
| | V-123 | - | - | + | - | - | + | - | - |
| | V-183 | - | - | + | - | - | + | - | - |
| | V-196 | - | - | + | - | - | + | - | - |
| | V-231 | - | - | + | - | - | - | - | - |
| | V-116 | - | - | + | - | - | + | - | - |
| | E6-5 | - | - | + | - | - | + | - | - |
| J-O-4 V-183 | V-7 | - | - | - | + | - | - | - | - |
| | V-123 | - | - | - | + | - | - | - | - |
| | V-104 | - | - | - | + | - | - | - | - |
| | V-196 | - | - | - | + | - | - | - | - |
| | V-231 | - | - | - | + | - | - | - | - |
| | V-116 | - | - | - | + | - | - | - | - |
| | E6-5 | - | - | - | + | - | - | - | - |

Table 4. Continued

| serum | adsorbing strain | antigen | | | | | | | | |
|-------|------------------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|---|
| | | V-7 | V-123 | V-104 | V-183 | V-196 | V-231 | V-116 | E6-5 | |
| J-O-5 | V-196 | V-7 | - | - | - | - | + | - | - | - |
| | | V-123 | - | - | - | - | + | - | - | - |
| | | V-104 | - | - | - | - | + | - | - | - |
| | | V-183 | - | - | - | - | + | - | - | - |
| | | V-231 | - | - | - | - | + | - | - | - |
| | | V-116 | - | - | - | - | + | - | - | - |
| | | E6-5 | - | - | - | - | + | - | - | - |
| J-O-6 | V-231 | V-7 | - | - | - | - | - | + | - | - |
| | | V-123 | - | - | - | - | - | + | - | - |
| | | V-104 | - | - | - | - | - | + | - | - |
| | | V-183 | - | - | - | - | - | + | - | - |
| | | V-196 | - | - | - | - | - | + | - | - |
| | | V-116 | - | - | - | - | - | + | - | - |
| | | E6-5 | - | - | - | - | - | + | - | - |
| J-O-7 | V-116 (NCMB 407) | V-7 | - | - | - | - | - | - | + | + |
| | | V-123 | - | - | - | - | - | - | + | + |
| | | V-104 | - | - | - | - | - | - | + | + |
| | | V-183 | - | - | - | - | - | - | + | + |
| | | V-196 | - | - | - | +w | - | - | + | + |
| | | V-231 | - | - | - | +w | - | - | + | + |
| | | E6-5 | - | - | - | - | - | - | + | - |
| J-O-8 | E6-5 | V-7 | - | - | - | - | - | - | - | + |
| | | V-123 | - | - | - | - | - | - | - | + |
| | | V-104 | - | - | - | - | - | - | - | + |
| | | V-183 | - | - | - | - | - | - | - | + |
| | | V-196 | - | - | - | - | - | - | - | + |
| | | V-231 | - | - | - | - | - | - | - | + |
| | | V-116 | - | - | - | - | - | - | - | + |

3-O 血清型 (J-O-1, J-O-2, J-O-3) に 5 血清型を加えうるものと考え、V-183 株の血清型を J-O-4 型、V-196 株を J-O-5 型、V-231 株を J-O-6 型、V-116 (*V. ichthyodermis*) 株を J-O-7 型および E6-5 株を J-O-8 型と呼称することとした。なお J-O-3 型の V-231 株以外の hetero 抗原吸収血清と J-O-6 型株、J-O-7 型の E6-5 株以外の hetero 抗原による吸収血清と J-O-8 型株とはそれぞれ陽性を示した。すなわち J-O-3 型株と J-O-6 型株、J-O-7 型株と J-O-8 型株との間にはそれぞれ共通の O-抗原因子が存在することが示唆された。しかしながらためし凝集反応 (Table 2) および定量交叉凝集反応 (Table 3) にもみられたように、それぞれ対応する逆の反応系の凝集反応はすべて陰性であり、さらに詳細な抗原分析が必要と考える。また各血清型菌株の由来を Table 5 に示した。新たに加えた 5 血清型のうち、海水環境由来の J-O-8 型株 (E6-5) を除く 4 血清型の菌株はそれぞれアユ、ウナギ、ハマチ、ヒラメ等の病魚から分離されたものであり、これら血清型に属する菌株は現在まで 1 株ずつしか分離されておらず、J-O-1 型、J-O-2 型、J-O-3 型以外の血清型菌株によるピブリオ病の発生は非常に希なものと思われる。この点に関しては Kitao (1983) も同様の見解を述べている。なお Kitao (1983) は淡水魚由来の *V. anguillarum* の O 抗原による血清型別において、A~F なる 6 種の血清型を報告している。前報 (田島ら, 1986) で述べたように、北尾の A,

Table 5. Source of strain belonging to each serotype

| Serotype | Strain No. | Species name | Source |
|----------|------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| J-O-4 | V-183 | <i>V. anguillarum</i> | ayu (Biwa Lake, 1977) |
| J-O-5 | V-196 | " | eel (Aichi, 1966) |
| J-O-6 | V-231 | " | yellow tail (Wakayama, 1973) |
| J-O-7 | V-116 | " | plaice |
| | | (<i>V. ichthyodermis</i> NCMB 407) | |
| J-O-8 | E6-5 | " | sea water (Otsuchi Bay, 1980) |

B, C型はそれぞれ著者らの J-O-1, J-O-2, J-O-3 型に相当する。また Sørensen and Larsen (1986) も魚類病原菌としての *V. anguillarum* の O-血清型として 10 種の血清型 (01~010) を報告しており、彼らの 01, 02, 03, 07 型はそれぞれ著者らの J-O-3, J-O-1, J-O-2, J-O-7 型に相当するが、両者の残りのものについては現在のところ不明であり、今後比較検討が必要であろう。

要 約

岩手県大槌湾ギンマス養殖環境分離株をも含めた *V. anguillarum* の型別不能株について 3-O 血清型 (J-O-1, J-O-2, J-O-3) 株との O 抗原構造の関連性を検討した結果、型別不能の 5 株は前報 (田島ら, 1986) の J-O-1~J-O-3 血清型の菌株とは異なる抗原構造を有し、さらに供試 8 抗血清には相互の O-抗原によっては吸収されない各抗血清特異抗体の存在が確認されたことから、J-O-4 型, J-O-5 型, J-O-6 型, J-O-7 型および J-O-8 型と規定し、前報 (田島ら, 1986) の 3-O 血清型に新たに加えた。

文 献

- Kitao, T., T. Aoki, M. Fukudome, K. Kawano, Y.O. Wada and Y. Mizuno (1983): Serotyping of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased freshwater fish in Japan. *J. Fish Dis.*, **6**, 175-181.
- 田島研一, 絵面良男, 木村喬久 (1986): ビブリオ病原菌の血清学的研究-I. ビブリオ病原菌の O 血清型 (J-O-1~J-O-3). 北大水産彙報, **37**(3), 230-239.
- Sørensen, U.S. and J.L. Larsen (1986): Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**(3), 593-597.