

## ノリの細菌性病原体の直接蛍光抗体法による識別

福永 剛・半田 亮司・山下 輝昌  
(有明海研究所)

### Direct Fluorescent Antibody Technique for Diagnosis of Bacterial Disease in *Porphyra* spp.

Takeshi FUKUNAGA, Takatoshi HANDA and Terumasa YAMASHITA  
(Ariakekai Laboratory)

本県のノリ生産に被害をおよぼす病害には、あかぐされ病、壺状菌病およびスミノリ症があげられる。このうち冷凍生産初期に発生するスミノリ症の原因については多くの報告がされているが、その一つに、ある種の細菌が関与して起こることが明らかにされている。<sup>1, 2)</sup> 一般に細菌その他の病原体による病害の対策としては早期発見が重要である。

そこで本報ではノリ病原体の早期検出を目的として、病原体の早期検出に一般的に用いられている蛍光抗体法の有効性を検討したので報告する。

#### 材料および方法

##### 1. 養殖ノリ葉体の生菌数の経時的变化

1988年度から1990年度漁期にかけて図1に示した漁場から採取したノリから細菌を分離した。分離方法は、濾紙で水分を取り去ったノリ葉体0.5gを乳鉢を用いてホモジナイズし、10倍階段希釈したのち適当な濃度区から1mlを取り、ZoBell 2216 E培地中に塗抹または混釈し、25℃で2週間培養後コロニーの計数および釣菌を行った。

##### 2. 抗原としてのスミノリ症原因菌の決定

抗原としての原因菌は漁場のノリ葉体から分離

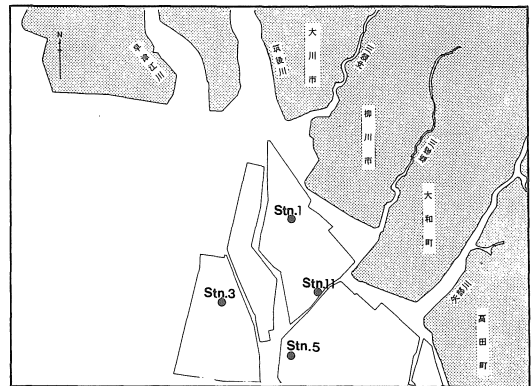


図1 ノリ葉体採取地点

した細菌について室内発症試験を行い決定した。

##### 3. 蛍光抗体液の作製

供試菌のホルマリン死菌をウサギに接種し、抗体価の上昇をみたのち、血液から抗体を精製した。精製抗体には蛍光色素フルオレセインイソチアシネート (FITC) を標識し、余分な色素を除去して蛍光抗体液とした。

##### 4. 蛍光抗体の有効性の検討

供試菌とノリ葉体に常在している細菌3株に対して蛍光抗体を反応させ、交差性を検討するとともに有効濃度を検討した。

5. ノリ葉体表面および海水中の菌体の検出

本菌を濾過滅菌海水 300 ml に  $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$  cells/ml の濃度で浮遊させ、葉長 5 cm 程度のノリ葉体 5 個体を 30 分間浸漬したのち蛍光抗体液を反応させ観察した。また同浮遊液 1 l を  $0.45 \mu\text{m}$  のメンブランフィルターで濾過し、フィルター上に残った菌体に蛍光抗体液を反応させて観察した。メンブランフィルターは白色のものと黒色のものを使用した。

さらに、'88 年度漁期にノリ葉体から分離した細菌の中から比較的淡水浸漬による原形質吐出を起こした FA-1209 Y 株の蛍光抗体を用いて、'91 年度漁期に採取したノリ葉体について本菌の有無を観察した。

結果および考察

1. 養殖ノリ葉体の生菌数の経時的変化

'88 年度、'89 年度および'90 年度ノリ漁期中におけるノリ葉体表面の生菌数の推移を表 1 に示した。'88 年度には酸処理区と無処理区を設定し細菌を分離したが、酸処理区では  $10^6$  cfu/g から  $10^7$  cfu/g で推移したのに対して無処理区では徐々に細菌数が増加し、 $10^9$  cfu/g に増加した。'89 年度には秋芽生産期に細菌の分離を行ったが、漁期の経過とともに徐々に付着細菌数が増加した。また、'90 年度には冷凍在庫直後から付着細菌数が多かった。

2. 抗原としてのスミノリ症原因菌の決定

室内発症試験の結果を表 2 に示した。発症試験後、ノリ葉体を淡水浸漬処理によって比較的原形質吐出を起こしやすい菌株はみられたが、漁場でみられるような針状細菌の付着はほとんど認められなかった。また、細菌の付着量と原形質吐出の程度にも関係は認められなかった。これらの細菌の中から比較的原形質吐出の程度の高かったもの 3 株 (FA-1209 Y, FA-1209 W, FA-6) を抗原とした。また、多数のスミノリ症が認められた'90 年度漁期にはスミノリ症発生直前の 12 月 6 日に Stn. 5 で採取したノリ葉体から分離した細菌のうち優占種 2 株 (Su-1206 W, Su-1206 W) を

単離した。

4. 蛍光抗体の有効性の検討

他のノリ葉体常在菌に対する抗 FA-1209 Y 蛍光抗体の反応結果を表 3 に示した。当該菌に対する蛍光強度は 64 倍の希釈で陽性 (+) となりその他の細菌にはほとんど反応せず、SA-10 株

表 1 1988 年度、1989 年度および 1990 年度におけるノリ葉体上の生菌数の推移 (cfu/g・wet basis)

A. 1988 年度 (Stn. 11)

| 調査年月日           | 酸処理区              | 未処理区              |
|-----------------|-------------------|-------------------|
| 1988 年 12 月 5 日 | —                 | $3.4 \times 10^7$ |
| 12 月 9 日        | $2.0 \times 10^6$ | $1.3 \times 10^8$ |
| 12 月 12 日       | $2.0 \times 10^7$ | $1.5 \times 10^8$ |
| 12 月 19 日       | $2.7 \times 10^7$ | $3.5 \times 10^8$ |
| 1989 年 1 月 9 日  | $3.4 \times 10^6$ | $1.4 \times 10^9$ |

B. 1989 年度

| 調査年月日            | Stn. 3            | Stn. 5            | Stn. 11           |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1989 年 10 月 23 日 | $1.3 \times 10^6$ | $1.4 \times 10^7$ | $1.9 \times 10^7$ |
| 10 月 30 日        | $1.5 \times 10^7$ | $1.5 \times 10^7$ | $9.4 \times 10^6$ |
| 11 月 6 日         | $2.6 \times 10^7$ | $8.2 \times 10^7$ | $1.8 \times 10^8$ |
| 11 月 13 日        | —                 | $3.0 \times 10^8$ | $2.4 \times 10^8$ |
| 12 月 4 日         | —                 | $1.7 \times 10^5$ | $1.2 \times 10^6$ |

C. 1990 年度

| 調査年月日           | Stn. 3            | Stn. 5            | Stn. 11           |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1990 年 12 月 6 日 | $1.2 \times 10^8$ | $1.9 \times 10^9$ | $8.8 \times 10^7$ |
| 12 月 10 日       | $2.4 \times 10^7$ | $2.5 \times 10^7$ | $6.6 \times 10^7$ |
| 12 月 13 日       | $7.0 \times 10^7$ | $9.8 \times 10^6$ | $4.0 \times 10^7$ |
| 12 月 17 日       | $1.5 \times 10^8$ | $4.6 \times 10^7$ | $1.6 \times 10^8$ |
| 12 月 25 日       | $1.9 \times 10^6$ | $1.7 \times 10^6$ | $1.2 \times 10^7$ |
| 12 月 28 日       | $1.0 \times 10^7$ | $1.2 \times 10^6$ | $3.2 \times 10^6$ |
| 1991 年 1 月 4 日  | $4.6 \times 10^4$ | $2.3 \times 10^6$ | $3.4 \times 10^7$ |
| 1 月 10 日        | $6.4 \times 10^6$ | $3.2 \times 10^5$ | $8.0 \times 10^7$ |
| 1 月 14 日        | $4.2 \times 10^6$ | $3.2 \times 10^5$ | $8.0 \times 10^7$ |
| 1 月 28 日        | $9.0 \times 10^6$ | $2.9 \times 10^6$ | $3.5 \times 10^7$ |
| 2 月 18 日        | —                 | —                 | $1.0 \times 10^8$ |

表2 ノリ葉体から分離した細菌の室内発症試験結果

| 菌株名      | 色素 | 原形質吐出程度 | 細菌着生程度 |
|----------|----|---------|--------|
| FA-1209Y | +  | +++     | -      |
| FA-1209W | -  | +++     | -      |
| Su-1206Y | +  | +++     | -      |
| Su-1206W | -  | +++     | -      |
| P-1      | +  | ++      | -      |
| P-2      | +  | +       | -      |
| P-3      | +  | ++      | -      |
| P-5      | +  | ++      | -      |
| P-6      | +  | ++      | +      |
| P-10     | -  | ++      | -      |
| P-12     | +  | +       | -      |
| P-13     | +  | ++      | -      |
| P-14     | +  | +++     | -      |
| P-15     | +  | ++      | -      |
| P-17     | +  | ++      | -      |
| P-18     | +  | ++      | -      |
| P-20     | +  | ++      | +      |
| P-22     | +  | ++      | +      |
| P-25     | -  | ++      | -      |
| P-27     | -  | ++      | ++     |
| P-30     | +  | ++      | -      |
| 対照区      |    | ++      | -      |

表3 抗FA-1209蛍光抗体の他の細菌に対する交差性および有効濃度

| 抗原       | 蛍光抗体液の希釈系列 |     |    |    |    |    |     |     |
|----------|------------|-----|----|----|----|----|-----|-----|
|          | 2          | 4   | 8  | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 |
| FA-1209Y | +++        | +++ | ++ | ++ | +  | +  | -   | -   |
| FA-1209W | -          | -   | -  | -  | -  | -  | -   | -   |
| FA-6     | -          | -   | -  | -  | -  | -  | -   | -   |
| SA-10    | +          | -   | -  | -  | -  | -  | -   | -   |

+++：強い蛍光を示す，++：明かな蛍光を示す，+：確認できる蛍光を示す，-：蛍光を示さない

のみにわずかな交差性が認められた。このことから抗FA-1209Y蛍光抗体は64倍の希釈まで十分有効であるとともに他の細菌に対する非特異的蛍光も少ないと考えられる。

表4 蛍光抗体法によるノリ葉体上および海水中の細菌(FA-1209Y株)の検出

| 細菌濃度 (cells/ml) | ノリ葉体 | 白色フィルター | 黒色フィルター |
|-----------------|------|---------|---------|
| 10 <sup>1</sup> | -    | -       | -       |
| 10 <sup>2</sup> | -    | -       | -       |
| 10 <sup>3</sup> | +    | -       | +       |
| 10 <sup>4</sup> | +    | +       | ++      |
| 10 <sup>5</sup> | ++   | +       | ++      |

++：明かな蛍光を示す，+：確認できる蛍光を示す，-：蛍光が認められない

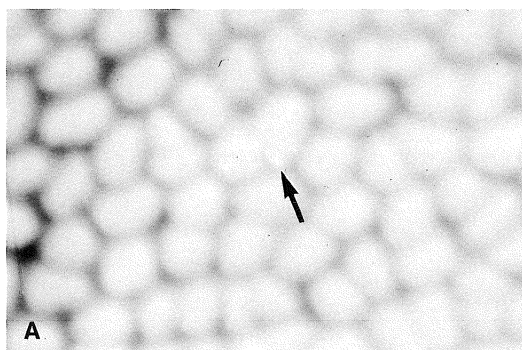


図2 FA-1209Y株のノリ葉体上(A)およびメンブランフィルター上(B)における蛍光像

### 5. ノリ葉体表面および海水中の菌体の検出

ノリ葉体表面および海水中の細菌の検出法を検討した結果を表4に示した。すなわち、ノリ葉体表面には10<sup>3</sup>から10<sup>5</sup> cells/mlの菌懸濁液に浸漬した場合に確認できる蛍光が認められた(図2-A)。また、海水中の細菌は10<sup>4</sup>から10<sup>5</sup> cells/mlの濃度でフィルター上に確認できた。しかし、

白色フィルターは非特異的な蛍光を発生し、蛍光色がFITCに似ているため極めて観察が困難であった。つぎに黒色のフィルターを用いて試験をしたところ、白色フィルターと比較してやや蛍光が確認しやすく  $10^3$  から  $10^5$  cells/ml の濃度の海水で確認できた (図 2-B)。さらに、漁場で採水した海水を用いて同様の試験を行ったが海水中に浮遊している泥等の懸濁物がフィルター表面に残るために検出は困難であった。これらの結果からノリ葉体表面および海水中の原因菌を蛍光抗体法によって検出できると思われた。しかし、葉体表面における検出可能な最小細菌数について、今後はさらに細かい検討が必要である。海水の場合も実際にはスミノリ症原因菌のみが海水中に  $10^3$  cells/ml の高濃度で浮遊しているとは考えにくいのでより精度の高い検出法の開発が必要と考える。

さらに、'91 年度に採取したノリ葉体からは明かな蛍光を示すものは認められなかった。

## 文 献

- 1) 山下輝昌：近年有明海奥部漁場で多発する細菌付着症とその対策について. 昭和 56 年度福岡県有明水産試験場研究業務報告, 1 - 12 (1983).
- 2) 楠田理一ら：養殖ノリのスミノリ病原菌 *Flavobacterium sp.* の性状. 水産増殖, 40 (4), 457 - 461 (1992).
- 3) 川生 明：図説 蛍光抗体法—その原理と技術および応用. 第 1 版, ソフトサイエンス社, 東京, 1983, pp. 15 - 21.
- 4) 楠田理一・河原栄二郎：直接および間接蛍光抗体法によるブリ主要病原細菌の識別. *Nippon-Suisan Gakkaishi*, 53 (3), 389 - 394 (1987).
- 5) 楠田理一・河原栄二郎：直接蛍光抗体法によるブリ主要病原性疾病の迅速診断. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53 (3), 395 - 399 (1987).