



二枚貝幼生の細菌性壊死症を抑制するための生体防  
御と生物学的防除の相互作用機構

(課題番号 13660176)

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金  
(基盤研究 (C) (2) ) 研究成果報告書

平成15年3月

研究代表者 高橋計介  
(東北大学大学院農学研究科助手)

## 1. はしがき

以下の報告は、平成13年度～平成14年度科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））によって実施することができ、現在までに達成することができた研究成果をまとめたものである。

本研究では、二枚貝の人工種苗生産時に発生して重篤な斃死をもたらすビブリオ菌を原因とする細菌性壊死症を、抗生物質を用いることなしに斃死を効果的に抑制することを大きな目標とした。特に、マガキ幼生の生体防御機構とビブリオ菌の増殖を特異的に抑制する生物学的防除法の關係に焦点をあてて、通常の状態ではビブリオ菌の感染を防ぐことができない幼生の生体防御機構が、ビブリオ菌を殺菌するのではなく増殖を抑制するだけの生物学的防除法と組み合わせた結果、感染抑制の機能を発揮できるようになる仕組みを解明する。生体防御機構の解明とビブリオ菌による疾病の予防研究は、健苗育成のための基礎資料を、また大量死現象の要因解明のための基礎資料を得るための重要な事柄としても期待されているのである。

近年、海産二枚貝の大量死は件数が大きく増加するとともに、斃死する種も多様化していて、関係者に大きな打撃を与えている。また、ビブリオ病を原因とする死亡は、これまで幼生や稚貝に限られていたものが、最近では母貝でもみられるようになり、問題は深刻である。大量死は直接的な病原菌だけがもたらすのではなく、それら細菌の増殖や病態の増悪を助長する現象、すなわち貝自体の体質の弱体化などの生理的な問題、漁場の老化や密殖といった養殖技術上の問題に加えて、沿岸環境の悪化という環境問題との複合要因であり、また個々の事例によって要因間の関わり合いの程度が異なるであろうから、軽々に結論されるものではない。しかし、いずれの事例においても共通して問題となるのは、貝が斃死に至るまでの過程で示していたと考えられる様々な生理的な変化とその意味を明確に知るための仕組みがなかったことである。斃死を予防するあるいは死亡率を減少させるためには、適切な生理活性指標を設けて、その変化を捉えることによる健康評価のシステムの確立が重要であると考えられる。生体防御に關与する諸因子は外敵微生物や生体内老廃

物の処理をするために、あるいは種々のストレス反応に対抗するために。生体が備えていると考えられるものであるから、上記のような評価システムにとって有力な武器になると思われる。このような試みはより集約的な養殖形態を採用している魚類や甲殻類ですでに始まっている。

本研究では、幼生に対する重篤な感染症で急激な斃死を引き起こすピブリオ菌による細菌性壊死症を、大量斃死の1つのモデルとして取り上げて生体防御機能の不活性化と斃死の関係を解析した。そして本研究の大きな特色は、マガキ成貝を材料として行ってきた申請者の生体防御機構の解明に関する研究で明らかとなった知見を生かし、幼生の生体防御能を把握することである。その結果、なぜ幼生は細菌性壊死症に対して抵抗性が低いのかを知ることができる。2つめの特色は、二枚貝幼生の細菌性壊死症に対して生物学的防除法の導入することである。本研究独自の発想として、多くの生物学的防除法において、拮抗微生物の作用は標的生物に対して殺菌（殺生物）的であるのに対し、本研究では、ピブリオ菌の増殖を抑制する作用を有する細菌を利用して感染性を低下させる点が挙げられる。

具体的な研究課題として本研究では、下記に示す3つの研究項目の解明を試みた。すなわち、

①病原性ピブリオ菌によるマガキ幼生血球の生体防御能不活化機構の解明

②ピブリオ増殖抑制細菌の感染抑制効果とその作用機序の検討

③ピブリオ増殖抑制細菌の共存による幼生血球の防御能の変化、である。

特に、①については新たな3つの知見を得ることができた。

それは、

1. マガキ幼生の血球はピブリオ菌をほとんど貪食できない。2. 幼生の血球は遊走能は持っている、しかしピブリオ菌に対しては全く遊走しない。そればかりか、血球の随意運動性自体もピブリオの菌体およびその培養上清によって阻害される。さらに、3. ピブリオ菌と共存した血球は6時間から12時間で80%以上が死亡する。すなわち、生体防御機構の中心である血球が、ピブリオ菌の作用によって重要な防御能である遊走能や運動性を阻害され、結果として菌を貪食することができ

ない（食食の欠如）。食食を受けないので、ピブリオ菌はほとんど殺菌されることもなく生存し、逆に血球の方が細胞毒性因子の作用を受けて死亡する。生体防御機構が全く機能しないことが明らかとなった。

また、②の研究において、ピブリオ菌の感染を抑制し、幼生を斃死から守る効果が高いオボマクログロブリンを、血球の実験区に添加した結果、血球の死亡率は有意に減少した。すなわち、幼生の血球に対して毒性を示す因子は、幼生自体に対して致死性を示すものと同じであると考えられた。しかし、オボマクログロブリンの添加区でも血球の運動能は回復しなかった。

そして、③の研究において、ピブリオ菌の増殖を抑制する細菌でも、抑制機構の違いによって、幼生の血球に与える影響が大きく異なることを明らかにした。つまり、ピブリオプロテアーゼ活性の抑制細菌は、幼生の血球に対して影響を与えず、血球は十分に防御能を示すことができた。しかし、その他の菌株には殺細胞作用などが認められ、投与の仕方を検討する必要があった。

上述のように、本研究から新しい知見が得られ、またさらに研究をすすめる大きな手がかりもつかめたと言える。しかしながら、当初の計画をすべて遂行できたとは言いがたく、これからの研究の継続を強く望むのが現状である。研究をより良く発展させるためにも、ここに研究成果の概略を述べて批判を仰ぐ次第である。また、この場を借りて文部科学省、日本学術振興会の補助金支給関係各位に深謝するとともに、本研究の展開にあたり種々の御協力をいただいた東北大学大学院農学研究科附属海洋生物資源教育研究センターの方々をはじめとする東北大学の関係各位に記して謝意を表したい。

## 2. 研究組織

研究代表者：高橋計介

（東北大学大学院農学研究科水圏動物生理学分野助手）



### 3. 研究経費

平成13年度 2,100 千円

平成14年度 1,300 千円

計 3,400 千円

### 4. 研究発表

#### (1) 学会誌等

1). Takahashi, K. G. and K. Mori:

Participation of reactive oxygen intermediates in the killing of ingested bacteria by *Crassostrea gigas* hemocytes.

Suisanzoshoku, Vol. 49, 389-396 (2001).

2). Terahara, K., K. G. Takahashi, and K. Mori:

Apoptosis by RGD-containing peptides observed in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*.

Dev. Comp. Immunol., Vol. 27, 521-528, (2003).

3). Terahara, K., A. Nakamura, K. G. Takahashi, and K. Mori:

Occurrence of integrin-dependent spreading ability and cloning of a  $\beta$  integrin subunit cDNA from the haemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*.

Fish Shellfish Immunol., Vol. 14, *in press*, (2003).

#### (2) 口頭発表

##### (2) - 1 国際学会

1). Takahashi, K. G., A. Nakamura, and K. Mori:

Pathogenicities against larval oysters of proteases from marine vibrios and their suppression by ovomacroglobulin, a hens' egg white protein., Fifth Korea-Japan Japan-Korea Joint Meeting and Symposium on Aquaculture, Kunsan, Korea. October 11-13, 2002.

(2)-2 国内学会

1. 高橋計介・森 勝義. 病原性ビブリオ菌により障害を受けるマガキ血球の防御能. 日本比較免疫学会 第14回学術集会, 名古屋, 2002年8月26-28日
2. 高橋計介・森 勝義. マガキ血リンパの酵素活性測定に対する簡易測定キットの適用. 日本水産増殖学会 第1回大会, 長崎, 2002年9月19日

## 序論

世界中で67種にも達する二枚貝類が増養殖の対象となっており (FAO yearbook1996による)、優良な種苗を安定的に確保することは重要な課題である。欧米、特に北アメリカ地域では、安定した生産が期待できる人工採苗による種苗生産が行われている。しかし、人為的な環境下で行う種苗生産の現場において、細菌感染症によると考えられる大量斃死が発生し、マガキ*Crassostrea gigas*を含む多くの二枚貝の種苗生産に多大な打撃を与えている。種苗生産過程における細菌性疾病は、Guillard (1959) によりマルスダレガイ*Venus(Mercenaria) mercenaria*で初めて報告され、その後、Table1に示した二枚貝種の生産時での発生が報告されている。これらの細菌性疾病で同定された原因細菌のほとんどは*Vibrio alginolyticus*と*V. anguillarum*に代表される*Vibrio*属細菌である。また、それらの報告で示された幼生や稚貝の病態は共通しており、感染から24時間以内にほとんど全部の幼生が死亡するという非常に高い死亡率を示すとともに、発症した幼生では面盤後引筋および面盤の損傷と組織全体の崩壊を引き起こす細菌性壊死症 Bacillary necrosis (本研究ではビブリオ病と呼ぶ) を伴うことが特徴としてあげられる。

従来、我が国では二枚貝種苗の多くを天然採苗に依存してきた。しかし近年、耐病性や成長などの形質のより優れた種苗や新品種の導入を目的として、人工種苗生産への取り組みは大きく増加している。その結果、マガキ (岡山県水産試験場)、アサリ*Ruditapes phillipinarum* (茨城県栽培漁業協会、千葉県東京湾栽培漁業センター)、チョウセンハマグリ*Meretrix lamarcki* (茨城県栽培漁業協会)、アカガイ*Scapharca broughtonii* (兵庫県栽培漁業公社)、アコヤガイ*Pinctada fucata martensii* (田崎真珠株式会社) において種苗生産過程でのビブリオ病と考えられる幼生

の大量斃死が発生している（すべて私信）。さらに、大量斃死の病原細菌としてビブリオ属細菌が分離、同定されたものとしてはマガキ (Sugumar *et al.*, 1998a) やトリガイ *Fulvia mutica* (藤原ら、1993) がある。

細菌感染症が成立する感染機構として1) 細菌の宿主への付着し、2) そこで増殖して定着し、3) 毒素や菌体外酵素を産生し、宿主に損傷を与えると考えられる。この感染機構に関わる病原因子が魚病細菌においては化学物質やトランスポゾンを用いた変異誘発によって、因子のみが欠損した細菌株が作出され、病原性発現過程での働きが解明されている。特定された病原因子としては、宿主への走化性や宿主体内への侵入という運動性に関与する鞭毛 (Milton *et al.*, 1996; O'Toole *et al.*, 1996)、不溶性の鉄を自らの生存のために利用するための鉄獲得能と関連する鉄結合蛋白 (シデロフォア; Walter *et al.*, 1983) ならびに宿主体内への侵襲の際に細胞間の結合を弱めるプロテアーゼ (Sakai, 1985) がある。

二枚貝におけるビブリオ病に関するこれまでの研究では、原因細菌の性状を明らかにすることや幼生の斃死形態を観察することなどに重点が置かれている。病原因子の解明に関する研究は原因細菌の培養上清の病原性の観察、すなわち上述した3) 毒素や菌体外酵素と考えられる菌体外に産生される病原因子の存在が証明されている (Brown and Roland, 1984; Riquelme *et al.*, 1995; Sugumar *et al.*, 1998a)。培養上清に含まれる病原因子についてはNottage and Birkbeck (1987) がプロテアーゼに関する研究を行っている。彼らはヨーロッパヒラガキ *Ostrea edulis* に対して病原性を示す *V. alginolyticus* の産生する活性量のもっとも高いプロテアーゼを精製し、それが主たる病原因子と考え、その病原性について検討している。その結果、精製プロテアーゼは幼生に対して病原性を示すが、プロテアーゼ活性量を同一にした培養上清よりも幼生に対する病原性は低いことを示している。さらに精製プロテアーゼに対する特異抗体は、精製プロ

テアーゼによる幼生に対する病原性を低下させるが、培養上清の病原性を全く低下させることができなかつたと報告している。これらのことから、菌体外産生プロテアーゼは病原因子の1つであり、単一のプロテアーゼのみで病原性が発現されるのではなく、その他にも病原性発現に関与するプロテアーゼの存在が考えられる。前田（1991）は細菌の産生するプロテアーゼが組織壊死を引き起こすことを報告しており、二枚貝のビブリオ病の病態として観察される組織壊死においてもプロテアーゼが関与すると考えられる。しかし、病原性発現過程にかかわるプロテアーゼの種類や数は特定されていない。

上述のように海産二枚貝のビブリオ病の病原因子がほとんど解明されていない現状においては、本格的な治療法や予防法は確立されていない。しかし、ひとたび本ビブリオ病の感染が起これば、種苗生産が不可能ともなる重大な問題だけに、現在是对症療法として病原細菌の抗生物質に対する感受性と幼生飼育系への抗生物質投与による発病抑制効果について検討されている（Sugumar *et al.*, 1998b; Nicolas *et al.*, 1996）。この感染防止法として抗生物質の投与は、タンパク質合成阻害作用による幼生の正常発達の阻害や病原細菌の耐性株を出現させる（Standiford, 1985; Riquelme *et al.*, 1995）などの問題点が考えられる。アサリ *Tapes philippinarum* の人工種苗生産では耐性菌によるビブリオ病が発生し、問題となっている（Nicolas *et al.*, 1992）。そこで抗生物質の使用に替わる方法、特に、耐性菌を出さず、生物環境にも影響を与えにくい方法を考える必要がある。そのためにはやみくもに細菌を殺滅させるような方法ではなく、病原性発現機構から推測される病原因子もしくは病原細菌のみの抑制による発病防止という限局した対処法がより有効であると考えられる。

本研究では二枚貝のビブリオ病の発症メカニズムに基づいた発病抑制方法の適用を試みた。はじめに今回対象とするビブリオ病の正確な病態を知

ること、病原性の強さ、発現の経過を把握することを目的として、3株の *Vibrio* 属細菌を用いてマガキ幼生に対する人為感染系を作成し、ビブリオ病の再現を試みた。そして、その感染病態の詳細な観察を行い、病原性発現に関わり、制御可能と考えられる感染の段階とそれに関与する要因を明らかにしようとした。また、組織壊死を引き起こす病原因子としてプロテアーゼの存在が考えられたことから、プロテアーゼの産生を抑制する目的で、化学物質による突然変異誘発によりプロテアーゼ産生能が低下した変異株を作出し、プロテアーゼ産生能と病原性発現の関連について検討した(第1章)。

先に述べたように、これまでの研究により二枚貝のビブリオ病において菌体の産生するプロテアーゼが組織壊死を引き起こす本体と考えら、その活性を抑制することにより病原性発現を抑制できる可能性が考えられる。しかし、単一のプロテアーゼ活性をその特異抗体によって抑制するだけでは病原性は抑制されないこと (Nottage and Birkbeck, 1987)、また病原性発現に関与するプロテアーゼ(群)の種類や特徴は明らかとなっていないことから、プロテアーゼ活性を阻害することにより病原性を抑制する方法として、特定のプロテアーゼに対する特異的な阻害剤を用いることは適当ではない。

現在知られているプロテアーゼ阻害剤の中でもっとも広範囲なプロテアーゼに対して阻害活性を有する物質の一つにマクログロブリン類がある。その代表的なものとして鳥類および爬虫類の卵白などに存在するオボマクログロブリンとその同族体で哺乳類の血清中に存在する  $\alpha_2$ マクログロブリンがある。これらの物質はプロテアーゼに対する独特のトラップ機構を有し、プロテアーゼを不活化する(猪飼, 1984、Barrett, 1981)。 $\alpha_2$ マクログロブリンは生体内で、創傷感染症の原因菌である *V. vulnificus* の産生するプロテアーゼを不活化し、血管透過性亢進作用および浮腫形成作用を阻害す



ることが報告されている（三好、1999）。また、オボマクログロブリンは生体内に投与することによりセラチア菌 *Serratia marcescens* および緑濃菌 *Pseudomonas aeruginosa* のプロテアーゼによる組織崩壊を抑制する効果があることが示されており（前田、1991）、これらのプロテアーゼ阻害剤が細菌の産生する病原性プロテアーゼ、特に組織崩壊を引き起こすプロテアーゼの病原性発現を抑制するのに有効であることが明らかとなっている。

そこで本研究においてもプロテアーゼ活性の阻害による病原性抑制の効果を期待して、単一のプロテアーゼに対する特異的な阻害剤ではなく、オボマクログロブリンと  $\alpha_2$ マクログロブリンをマガキ幼生に対する *V. alginolyticus* の感染系へ投与し、その効果を検討した。これらの投与は水生生物の感染実験では初めての試みであった。また、卵白のグロブリン画分製剤であり、少量のオボマクログロブリンを含むオボグロブリンについても同様の検討を行った（第2章）。

現在、病原細菌の低減化に有効な方法論として生物学的防除法（バイオコントロール）が検討されつつある。生物学的防除法とは、病虫害や病原細菌に対して拮抗作用を持つ細菌を用いて、これら生物を死滅、発病抑制などに導く制御を行う方法であり、農業においては生物農薬として広く使用されている。水産分野においてもビブリオ病抑制を目的としてオヒョウの1種 *Scophthalmus maximus* (Westerdahl et al.,1991)、ガザミ *Portunus trituberculatus* (Nogami and Maeda,1992)、ムラサキイタヤガイ (Riquelme et al.,1997) およびマガキ (Gibson et al.,1998) で適用が試みられているが、これらの事例しか報告がなく、実用化には至っていない。水産分野における生物学的防除法の適用は病原細菌の抑制効果と同時に飼育水中の細菌叢の安定化という効果が期待でき、その効果的な適用技術の確立が緊要である。



前の段階では、病原因子としてのプロテアーゼを抑制することにより、ビブリオ病の発現を抑制することが目的であった。そして、次の段階としてビブリオ病発現を抑制するためには菌体そのものの制御が必要であり、特に、病原性*Vibrio* 細菌の増殖能と感染性の度合との間に正の相関があると示唆されたことから、病原菌の増殖制御による病原性発現の抑制を目的として、*Vibrio* 属細菌に対して増殖抑制活性を示す海洋細菌を検索し、増殖抑制細菌を用いた生物学的防除法を適用を試み、その有効性について検討を行った（第3章）。

Table 1 これまでに報告された二枚貝のビブリオ病

マガキ				
Crassostrea gigas	<i>V. tubiashii</i> など3株 <i>Vibrio</i> sp. (5株) <i>V. splendidus</i>	Jeffries (1982) Garland et al. (1983) Sugumar et al. (1998)		
バージニアガキ				
<i>C. Virginica</i>	<i>Vibrio</i> sp. <i>Vibrio</i> sp. <i>Vibrio</i> sp. (2株)	Brown and Losee (1978) Elston and Leibovitz (1980) Brown (1981)		
ヨーロッパヒラガキ				
<i>Ostrea edulis</i>	<i>V. anguillarum</i> <i>V. tubiashii</i>	DiSalvo et al. (1978) Lodeiros et al. (1987)		
マルスダレガイ				
<i>Venus (Mercenaria) mercenaria</i>	<i>Vibrio</i> sp. <i>V. alginolyticus</i> など5株	Guillard (1959) Tubiash et al. (1965)		
トリガイ				
<i>Fulvia mutica</i>	<i>Vibrio</i> sp.	藤原ら (1993)		
ムラサキイタヤガイ				
<i>Argopecten purpuratus</i>	<i>V. anguillarum</i>	Riquelme et al. (1995)		
ヨーロッパホテガイ				
<i>Pecten maximus</i>	<i>V. splendidus</i>	Nicolas et al. (1996)		
アサリ				
<i>Tapes philippinarum</i>	<i>Vibrio</i> sp.	Nicolas et al. (1992)		
オオシヤコガイ				
<i>Tridacna gigas</i>	<i>V. alginolyticus</i> など14株	Sutton and Garrick (1993)		

## 第1章 *Vibrio*属細菌のマガキ幼生に対する病原性

二枚貝幼生のビブリオ病はこれまでの研究によって、*V. alginolyticus*や*V. anguillarum*に代表される*Vibrio*属細菌を原因細菌として、面盤の異常と広範囲な軟体部の組織壊死を特徴的な症状とすることが明らかとなっている。しかし、病原因子や病原性発現メカニズムの解明、さらにはそれらに基づいたビブリオ病発病の制御に関する研究は行われていない。

そこで本章では今回対象とするビブリオ病の正確な病態を知ること、病原性の強さ、発現の経過を把握することを目的として、3株の*Vibrio*属細菌を用いてマガキ幼生に対する人為感染系を作成し、ビブリオ病の再現を試みた(第1節)。そして、その感染病態の詳細な観察を行い、病原性発現に関わり、制御可能と考えられる感染の段階とそれに関与する要因を明らかにするため、3株の中でマガキ幼生に対してもっとも強い病原性を示した*V. alginolyticus*について、より詳細な病原性発現条件の検討を行った(第2節)。また、組織壊死を引き起こす病原因子としてプロテアーゼの存在が考えられたことから、プロテアーゼの産生を抑制する目的で、化学物質による突然変異誘発によりプロテアーゼ産生能が低下した変異株を作出し、プロテアーゼ産生能と病原性発現の関連について検討した(第3節)。

### 第1節 3株の*Vibrio*属細菌のマガキ幼生に対する病原性

ここではマガキ幼生に対するビブリオ病を人為感染系として再現するために、マルスダレガイ*Venus(Mercenaria) mercenaria*、ヨーロッパヒラガキ*Ostrea edulis*、ホンアメリカイタヤガイ*Aequipecten (Argopecten) irradians*ならびに*Teredo navalis*に対する病原性が明らかとなっている純

粹分離株の*V.alginolyticus*、*V.tubiashii*ならびに*Vibrio sp.*を用いて、マガキ幼生に対する病原性とその病態について詳細な観察を行った。また、それぞれの培養上清の病原性についても検討した。

## 実験方法

### マガキ幼生

マガキ幼生は、性成熟したマガキを用い、Loosanoff and Davis (1963)の方法により以下に示した手順により作出し、実験に供した。性成熟したマガキは、1996年から99年の5月から9月の期間では、宮城県女川湾竹ノ浦で垂下養殖されたマガキを用い、それ以外の期間では宮城県水産研究開発センター松浦裕幸技師から分与された加温給餌飼育（25℃、*Tetraselmis sp.*を給餌し、1ヶ月飼育）することにより再熟させたマガキを用いて行った。マガキの生殖巣の一部を採取し、光学顕微鏡で観察することにより雌雄および成熟度合を判別した。一方、雌3個体の卵巣を滅菌海水中でハサミを用いて裁断、破碎し、卵を分離、懸濁させた。100 $\mu$ mナイロンメッシュ（オープニング100 $\mu$ m、以下同様）で濾過後、30 $\mu$ mナイロンメッシュを用いて卵を回収し、0.45 $\mu$ mカートリッジフィルターを用いて濾過滅菌した海水に懸濁した。そして雄3個体の精巣を滅菌海水中でハサミを用いて裁断、破碎し、20 $\mu$ mナイロンメッシュで濾過することにより精子懸濁液を得た。これを先に得られた卵懸濁液に加え、10分間媒精した。得られた受精卵は30 $\mu$ mナイロンメッシュ上で滅菌海水により3回洗浄後、200L円型パンライト水槽に20個/mLの密度で収容し、24℃で飼育した。24~48時間後、50 $\mu$ mナイロンメッシュを用いてD型幼生（殻長約80 $\mu$ m）を回収した。マガキ幼生は滅菌海水中に3個体/mLとなるように7L円形プラスチック水槽に収容して、感染実験に使用するまでの間（1~3時間）23~24℃で

飼育した。

### 供試細菌

American Type Culture Collection (Rockville, MD, U.S.A.) から分譲された *Vibrio* sp. (ATCC19107)、*V. alginolyticus* (ATCC19108) ならびに *V. tubiashii* (ATCC19109) の3株の *Vibrio* 属細菌を実験に供した。

### 人為感染による病態の観察

3株の *Vibrio* 属細菌は、それぞれ Marine Broth 2216 (Difco) で20℃、24時間振とう培養し、対数増殖期に入ったことを確認した後、遠心分離 (3,000×g, 10分) により菌体と培養上清に分離し、回収した。菌体はオートクレーブ滅菌を行った海水で1回洗浄後、再度滅菌海水に懸濁した。培養上清はさらに12,000×g、30分の遠心分離後、滅菌した0.22 μm フィルターを用いて濾過滅菌した。各菌体懸濁液を上述のマガキ飼育水中に10<sup>5</sup> Colony forming units (CFU) /mLとなるように接種した。また、培養上清は5%濃度となるよう飼育水に添加した。対照区として、菌体を接種しない区および滅菌した Marine Broth を同濃度となるようを加えた区を設定した。菌体接種区とその対照区では3時間毎に、また、培養上清添加区とその対照区では24時間後に、核実験区から500mLの飼育水を抽出し、50 μm ナイロンメッシュを用いて幼生を回収した。回収された幼生について、200個体の形態と動きを光学顕微鏡下で観察し、対照区の幼生 (Fig.1) と比較した。さらに生死を判別し、生残率を算出した。このとき軟体部に損傷が見られ、遊泳運動にも異常が見られる幼生は瀕死と判別し、死亡個体と見なした。すべての試験は1回の実験において同条件の区を2区設定し、2回以上の実験を行った。実験結果のグラフは代表的な結果の形で表し、統計処理は行わなかった。

## 実験結果

### Vibrio属細菌のマガキ幼生に対する病原性

本研究に用いた3株の*Vibrio*属細菌 (*Vibrio* sp., *V. alginolyticus*および*V. tubiashii*) の感染により、経時的にマガキ幼生の生残率の低下がみられた (Fig.2) 。36時間後のマガキ幼生の生残率は、対照区が86%であるのに対して、*V. alginolyticus*感染区でもっとも低く2%となり、次いで*Vibrio* sp.感染区で11%、もっとも高い生残率を示した*V. tubiashii*において16%の順であった。3株の中でもっとも低い生残率を示した*V. alginolyticus*感染区では12時間後から幼生の急激な死亡が観察され、18時間後の生残率は4%となった。

### 感染病態の観察

*V. alginolyticus*に感染されたマガキ幼生を光学顕微鏡で観察した結果、特徴的な症状として運動機能の異常および組織壊死が観察された (Table 2) 。感染された幼生は最初の症状として6時間後に遊泳運動の停止がみられ、その後Fig.3Aおよび3Bに示したように面盤の伸張・収縮の制御不能および面盤の損傷による異常運動 (旋回運動) へと進行する。さらに、感染後8~9時間には殻周囲に細菌が蝟集し、12時間後には殻内でも細菌が蝟集するようになる。また、死亡した個体では殻内に軟体部組織は観察されず、細菌の蝟集塊のみが観察された (Fig.3C) 。軟体部組織の崩壊・壊死は10時間後から始まり、面盤、後引筋、内蔵諸器官の壊死の順に進行した。組織崩壊・壊死の進行により、Fig.3Aおよび3Bに示したように後引筋および内蔵諸器官は殻内に観察されなくなった。死亡個体は10時間後から認められ、12時間後から急激に増加した。この死亡個体の急激な増加は、組織壊死の進行の度合とよく一致した。

## Vibrio属細菌培養上清のマガキ幼生に対する病原性

3株の培養上清をマガキ飼育槽に添加することによるマガキ幼生の24時間後の生残率は、いずれも新鮮な培地を添加した対照区よりも明らかに低かった (Fig.4) 。これら3株の中で*V.alginolyticus*培養上清を添加した区において46%ともっとも低い生残率を示した。*Vibrio* sp.培養上清添加区で52%、もっとも高い生残率を示した*V.tubiashii*培養上清添加区で55%となった。3株の培養上清を感染させたときのマガキ幼生の症状は、菌体感染時と同様で異常遊泳、面盤の脱落および組織壊死が観察された。



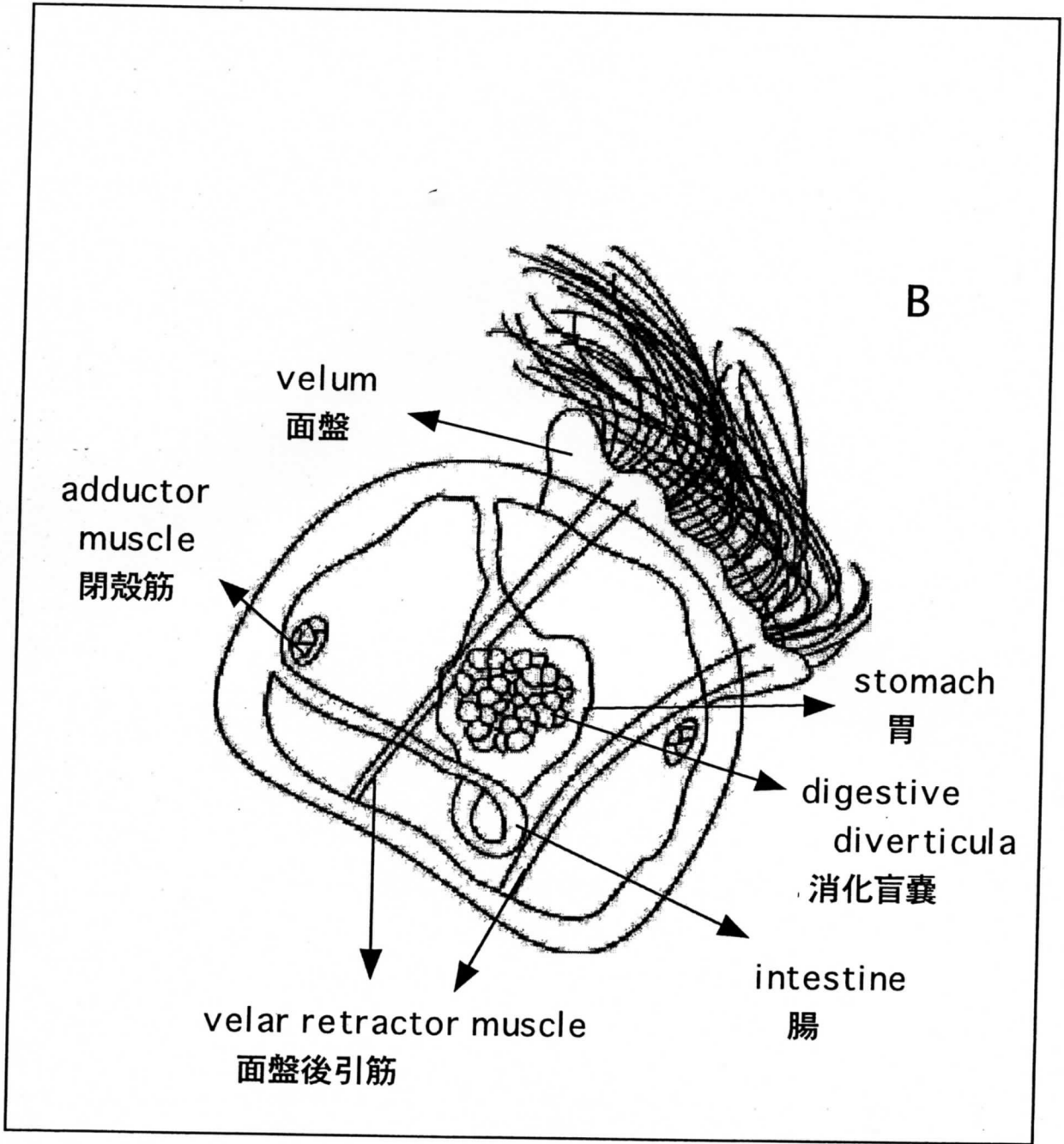


Fig. 1. マガキD型幼生

A; 発生後48時間 (写真), B; 解剖図

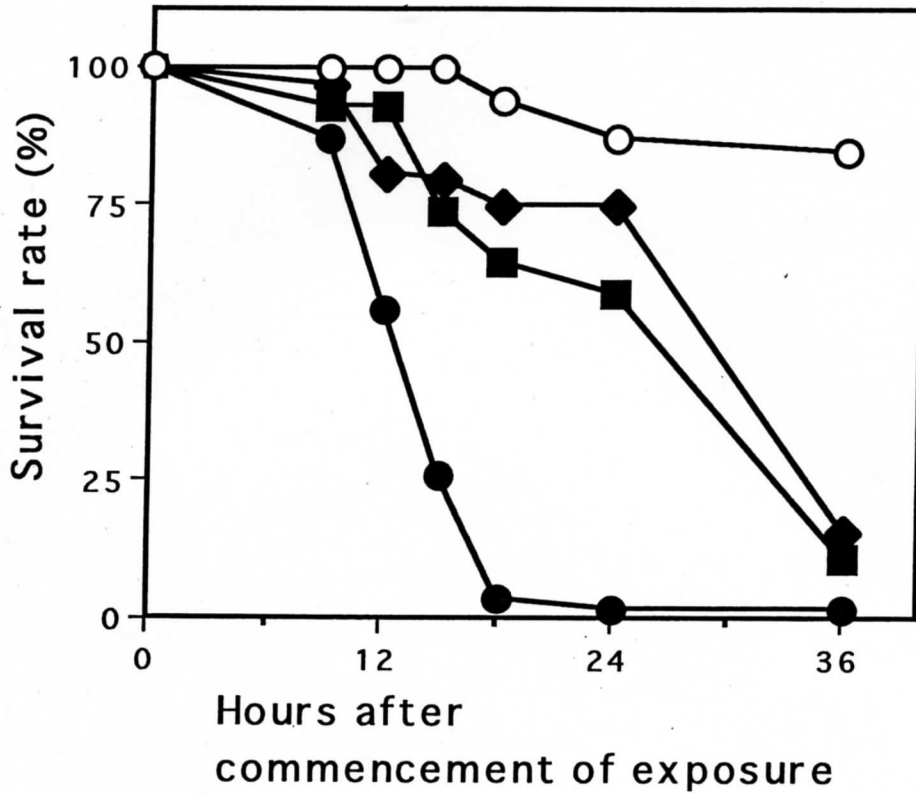


Fig.2. Changes in survival of larval oysters exposed to pathogenic *Vibrio* strains.

- , control; ■ , exposed with *Vibrio* sp.(ATCC19107);
- , exposed with *Vibrio alginolyticus* (19108);
- ◆ , exposed with *Vibrio tubiashii* (19109).

Each strain was added at  $10^5$  CFU/mL.

All experimental infections were carried out at 23°C.

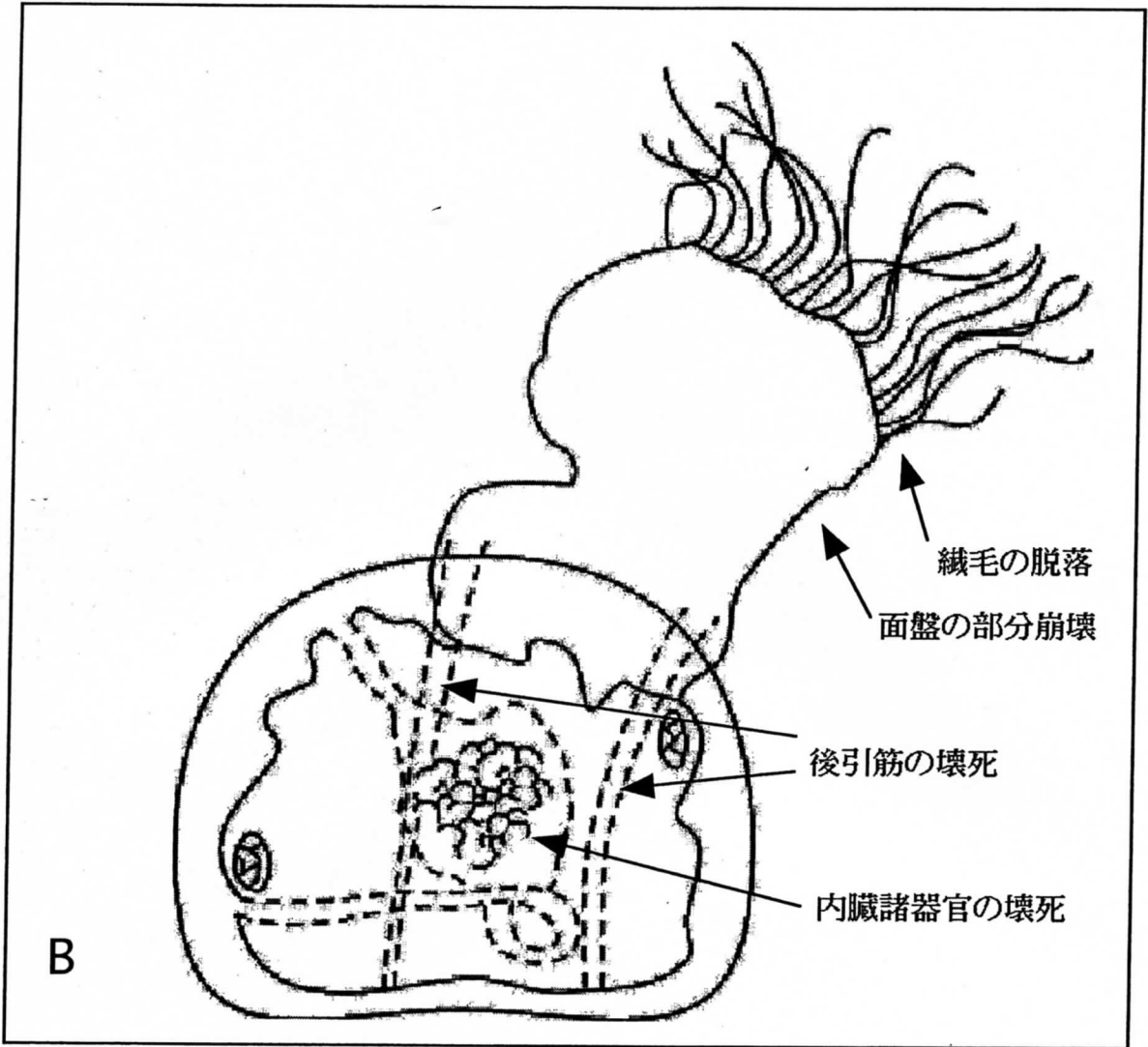


Fig.3 *V.alginolyticus*に感染されたマガキ幼生が示す病態  
 A; 感染16時間後のマガキ幼生 (写真) , B; Aの図説,  
 C; 死亡したマガキ幼生 (感染20時間後)

Table 2. *Vibrio alginolyticus* ( $1 \times 10^5$  CFU/mL) 人為感染によりマガキ幼生が呈する症状

症状の特徴	
最初に症状があらわれた時間	
<u>1.運動機能の異常</u>	
・遊泳運動の停止	6時間後
・面盤の伸張・収縮の制御不能	7～8時間後
・面盤の損傷による異常運動	8時間後
<u>2.組織壊死</u>	
・殻周辺部への細菌の蟻集（排除不能）	8～9時間後
・面盤の部分崩壊	10時間後
・繊毛の脱落	10～11時間後
・殻内での細菌の蟻集	12時間後
・後引筋の壊死	14～15時間後
・内臓諸器官の壊死	15時間後
<u>3.死亡</u>	
	10～11時間後

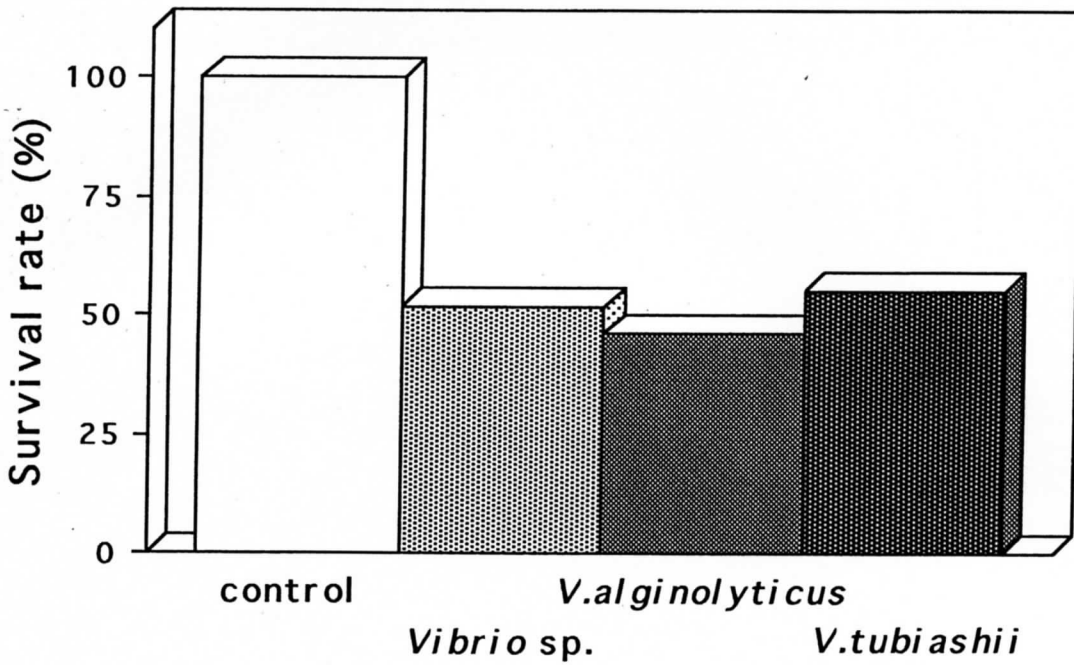


Fig.4. Pathogenicity of culture supernatants(5%) of pathogenic *Vibrio* strains to oyster larvae. Control was added to fresh Marine Broth.

## 第2節 *V.alginolyticus* のマガキ幼生に対する病原性

第1節の*Vibrio*属細菌3株のマガキ幼生に対する感染試験でもっとも強い病原性を示した*Vibrio alginolyticus*を、マガキ幼生のビブリオ病の再現菌株とすることとした。そして、このビブリオ病の発病過程から制御できる感染段階と病原因子の推測することを目的として、病原性発現条件に関する検討を以下の行った。具体的には感染密度の違いによる病原性発現の差違、および飼育温度について検討し、感染密度、飼育温度の上昇が病原性発現を亢進することを明らかにした。また、マガキ幼生へ感染後の*V. alginolyticus*の増殖を観察するとともに、培養上清の病原性について検討し、病原性発現に關与する因子について考察した。

### 実験方法

#### *V.alginolyticus*感染密度のマガキ幼生の生残率への影響

前節と同様の方法で調製した*V.alginolyticus*菌体懸濁液を感染密度が $10^3$ 、 $10^4$ および $10^5$  CFU/mLとなるよう前節で述べたマガキ幼生飼育水に接種し、23°Cで飼育した。菌体添加後12時間、18時間、24時間ならびに36時間に前節で述べた方法によりマガキ幼生を回収し、幼生の生残率を測定した。

#### 飼育温度による*V.alginolyticus*感染のマガキ幼生生残率への影響

前節と同様の方法で調製した*V.alginolyticus*菌体懸濁液を $10^5$  CFU/mL濃度で、飼育温度が20°Cおよび23°Cに調節されたマガキ幼生飼育水にそれぞれ接種した。菌体添加後12時間、18時間、24時間ならびに36時間に前節

で述べた方法によりマガキ幼生を回収し、幼生の生残率を測定した。

#### V.alginolyticusの培地中での増殖における温度の影響

滅菌したMarine broth 50 mLにV.alginolyticusを $4.7 \times 10^5$ CFU/mLとなるよう接種した後、20°Cおよび25°Cで振とう培養した。12時間毎に各培養液を50  $\mu$ Lずつ採取し、平板培養法により生菌数の測定を行った。測定に際しては滅菌海水によって連続10倍希釈系列を作成し、各希釈液50  $\mu$ LをMarine Agar 2216 (Difco) 平板に接種した後、20°Cで24時間培養して平板のコロニー数を計数し、生菌数 (CFU/mL) を算出した。

#### マガキ飼育水中におけるV.alginolyticusの増殖

前節と同様の方法で調製したV.alginolyticus菌体懸濁液を23°Cに設定したマガキ幼生飼育水およびマガキ幼生を含まない滅菌海水中に $3.7 \times 10^5$ CFU/mLとなるよう接種した。各水槽から12時間毎に海水を500  $\mu$ Lずつ採取し、上述した平板培養法により海水中の生菌数 (CFU/mL) を算出した。

#### V.alginolyticus培養上清のマガキ幼生に対する病原性

前節と同様の方法で調製したV.alginolyticusの24時間培養上清を5%および10%濃度となるようマガキ幼生飼育水に添加した。添加後、23°Cで飼育し、6時間毎に経時的に24時間まで前節で述べた方法によりマガキ幼生を回収し、幼生の生残率を測定した。対照区として10%となるよう新鮮なMarine Brothを添加した区を設定し、幼生の生残率を測定した。



## 実験結果

### V.alginolyticus感染密度の影響

Fig.5に示したように、マガキ幼生はV.alginolyticusの感染密度が高いほど早期に生残率が低下した。V.alginolyticus感染密度が $10^5$ CFU/mLにおける36時間後のマガキ幼生の生残率はもっとも低く0.5%であり、感染密度が $10^4$ CFU/mLでは55.2%、 $10^3$ CFU/mLでは72.1%であった。 $10^4$ および $10^3$ CFU/mLでの感染区においては、 $10^5$ CFU/mL感染区でみられた12時間後からの急激な生残率の低下は観察されず、緩やかに生残率が低下している。今回設定したいずれの密度の感染においても死亡個体は異常遊泳、面盤の脱落および組織壊死の症状 (Fig.3) を呈していた。

### V.alginolyticus感染密度のマガキ幼生の生残率への影響

Fig.6に示したように、対照区においては20℃、23℃ともにほとんどマガキ幼生の生残率が低下しなかったのに対して、23℃では12時間後から急激に生残率が低下した。20℃ではより緩やかな低下であった。

V.alginolyticus感染36時間後のマガキ幼生の生残率は23℃で0.5%であったのに対して、20℃では33%となった。20℃での感染区では生残率は緩やかに低下した。V.alginolyticusを感染させなかった対照区では97.6%の生残率であった。

### V.alginolyticusの培地中での増殖における培養温度の影響

V.alginolyticusのMarine brothにおける20℃および25℃での増殖についてFig.7に示した。各測定時間における25℃培養のV.alginolyticus生菌数は20℃培養の生菌数よりも高い値を示した。25℃培養では接種密度

4.7x10<sup>5</sup>CFU/mLであった生菌数が36時間後では1.0x10<sup>10</sup>CFU/mLに増殖するのに対して、20℃培養では5.3x10<sup>9</sup>CFU/mLであった。

#### マガキ飼育水中における*V.alginolyticus*の増殖

マガキ飼育水およびマガキ幼生を含まない滅菌海水に*V.alginolyticus*を添加した後の生菌数の変化についてFig.8に示した。どちらの区でも*V.alginolyticus*の増殖が観察された。マガキ飼育水では添加時3.7x10<sup>5</sup>CFU/mLであった生菌数が6時間後には7.6x10<sup>5</sup>CFU/mLに増殖するのに対して、滅菌海水中ではほとんど増殖がみられず添加密度とほぼ同数(3.8x10<sup>5</sup>CFU/mL)であった。滅菌海水中においても12時間後から増殖がみられたが、36時間までのすべての時間において常にマガキ飼育水中の生菌数が滅菌海水中よりも高い値を示した。

#### *V.alginolyticus*培養上清のマガキ幼生に対する病原性

5%および10%培養上清添加のどちらの区でも経時的にマガキ幼生の生残率が低下した(Fig.9)。感染後12時間から10%添加区において5%添加区よりも生残率が低くなり、24時間後の生残率はそれぞれ35%と46%となった。

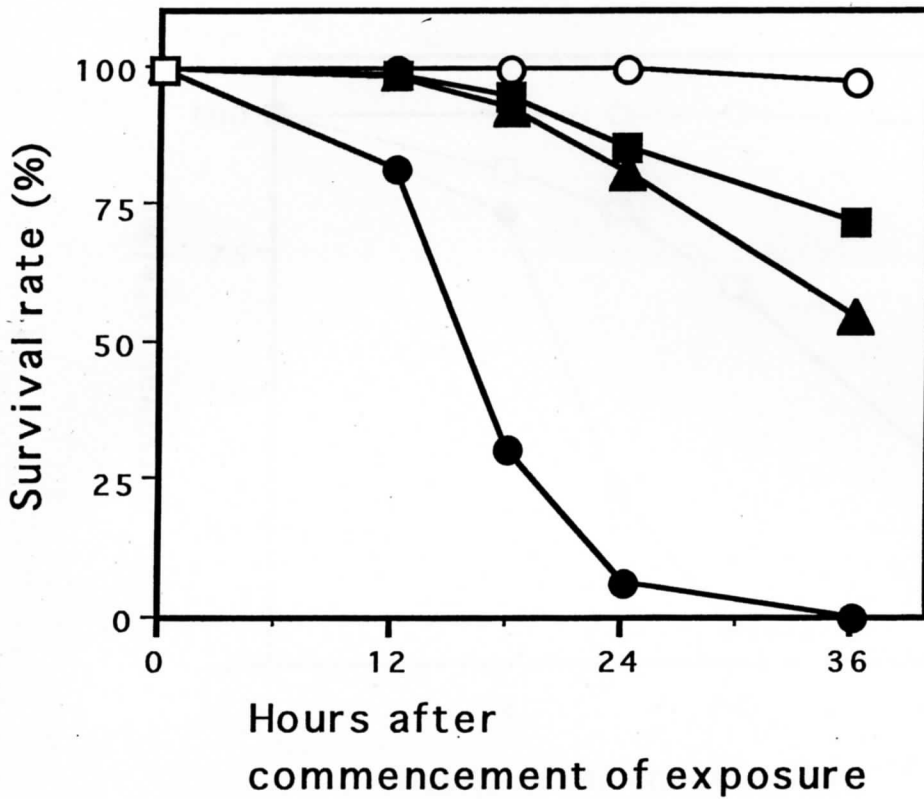


Fig.5. Changes in survival of larval oysters exposed to *Vibrio alginolyticus*.

○ , control(no inoculation); ■ , exposed at  $10^3$  CFU/mL; ▲ , exposed at  $10^4$  CFU/mL; ● , exposed at  $10^5$  CFU/mL.

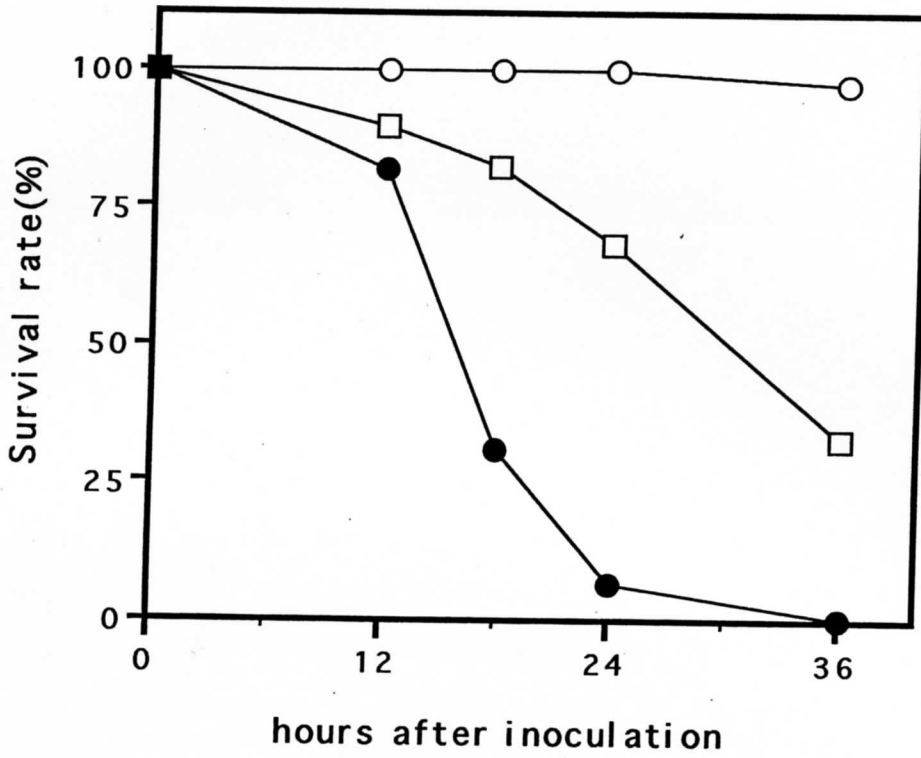


Fig. 6. Changes in survival of larval oysters exposed to *Vibrio alginolyticus*.

○ : control(no inoculation), □ : exposed in 20°C at 10<sup>5</sup> CFU/ml, ● : exposed in 23°C at 10<sup>5</sup> CFU/ml.

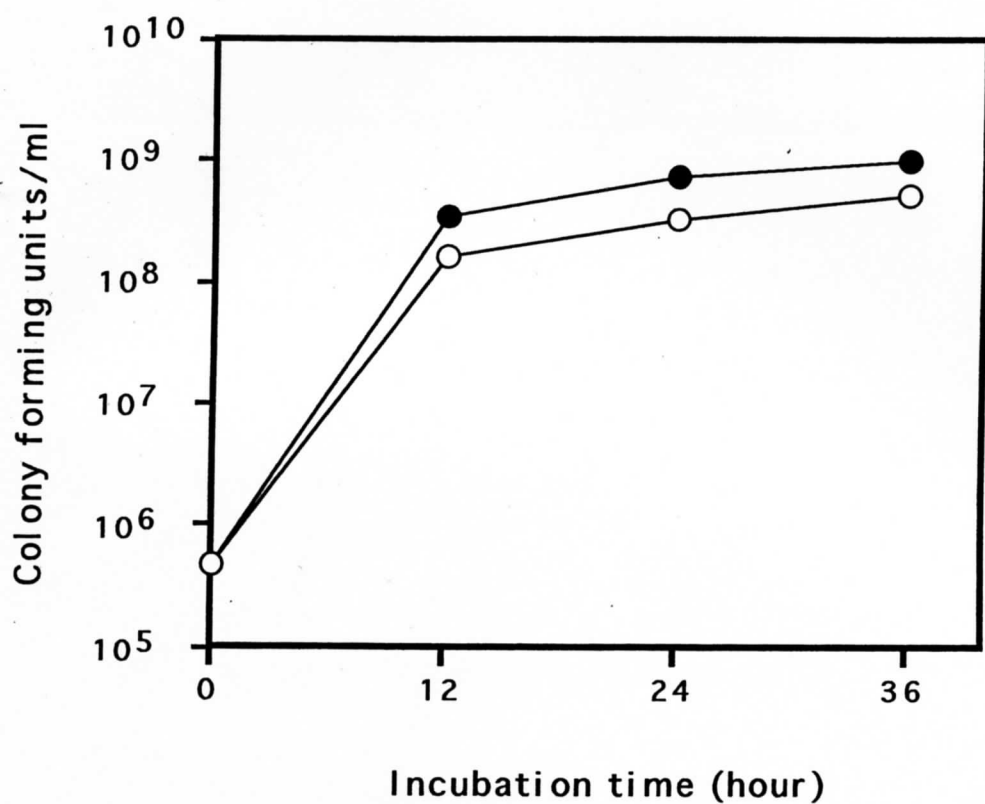


Fig. 7. Growth of *V.alginolyticus* in Marine broth. O; incubated at 20 °C, ●; incubated at 25 °C.

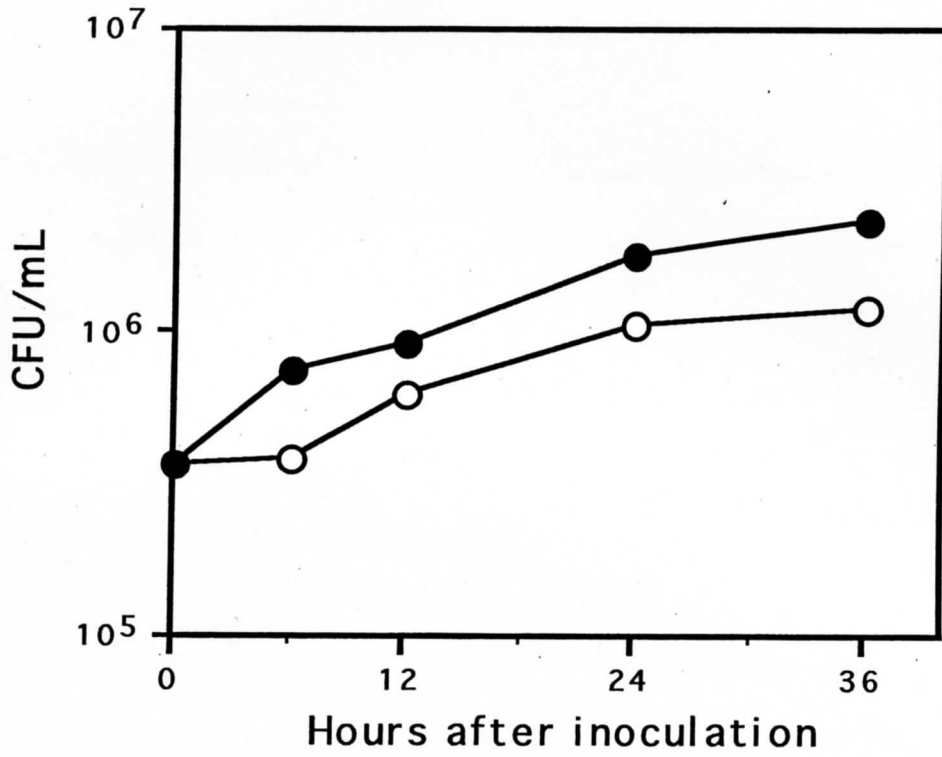


Fig.8. Growth of *Vibrio alginolyticus* in oyster larval culture. ●, inoculated in culturing seawater of oyster larvae; ○, inoculated in sterilized seawater(23°C).

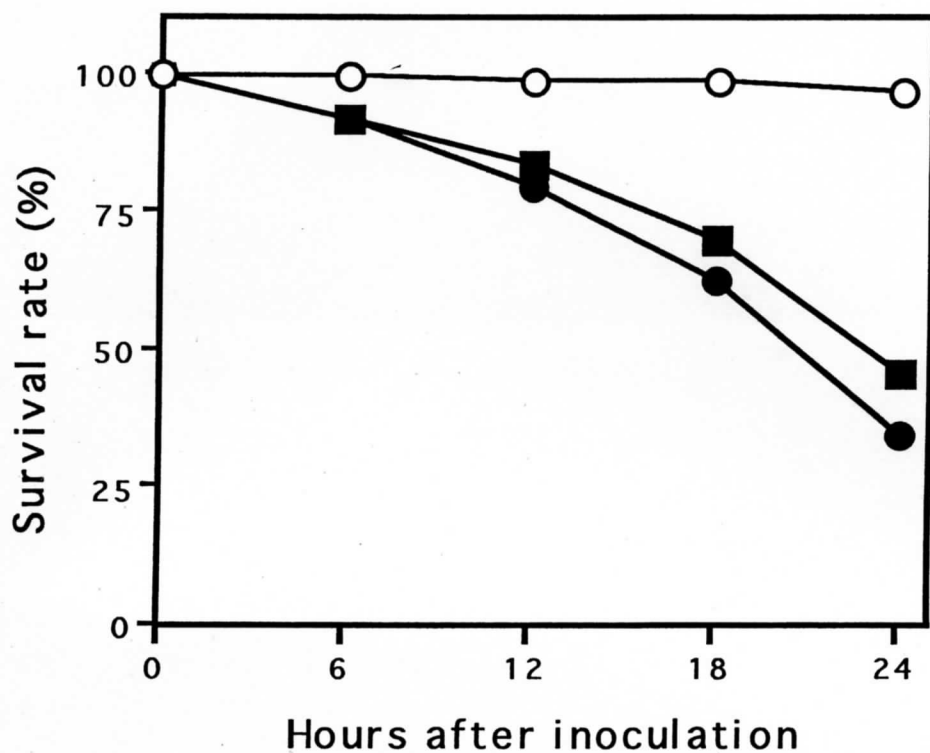


Fig.9. Effects of *Vibrio alginolyticus* culture supernatant on larval survival. ■, exposed to 5% culture supernatant; ●, exposed to 10% culture supernatant; ○, control(exposed to 5% flesh Marine Broth).



### 第3節 プロテアーゼ変異株を用いた病原性の解析

これまでの結果により組織壊死を引き起こす病原因子としてプロテアーゼの存在が考えられたことから、プロテアーゼの産生を抑制する目的で、ニトロソグアニジンを用いた突然変異誘発によりプロテアーゼ産生能が低下した変異株を作出した。作出された各変異株は野生株との細菌学的性状の違いを検討し、プロテアーゼ産生能のみの変異であることを確認した。各変異株の菌体および培養上清についてマガキ幼生に対する病原性を野生株との間で比較した。さらに培養上清中のプロテアーゼ活性に対する阻害試験を各種プロテアーゼの特異阻害剤を用いて行った。

## 実験方法

### プロテアーゼ活性の測定

*V. alginolyticus* を50mLのMarine Broth で振とう培養し、12時間毎に培養液1mLを抽出し、遠心分離により (12,000 xg, 10分) により菌体を取り除いた培養上清を試料として、アゾカゼインを基質としたKreger and Gray (1978) の方法によりプロテアーゼ活性を測定した。まず、5mg/mLアゾカゼイン (SIGMA) 水溶液、0.2M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) および蒸留水を各500  $\mu$ L混合した反応基質液に、培養上清を50  $\mu$ L加えて、37°Cで30分間反応させた。反応時間終了後、直ちに3.5mLの5%トリクロロ酢酸水溶液を加え、反応を停止させ、0.45  $\mu$ mのフィルターで沈殿物を除去した。濾過した反応液に同量の0.5N水酸化ナトリウム水溶液を加え、440nmの吸光度を分光光度計 (日立、U-2000) で測定した。ブランクとして、反応基質液に培養上清を加えないでトリクロロ酢酸水溶液を添加後、

培養上清を加え、同様の操作を行ったものを調製した。測定値からブランク値を差し引いた値の吸光度0.01を1unitとし、培養上清1mL当たりの値(units/mL)を算出した。

### ゼラチンザイモグラムによるプロテアーゼ活性分子の検出

培養上清中のプロテアーゼ活性を有する分子を検出するために、ゼラチンザイモグラムをHeussen and Dowdle (1980)の方法を改変して以下の通り行った。常法のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動で調製する11%分離ゲルに0.1%となるようゼラチンを加えゼラチンゲルを作成した。さらに、常法のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動ゲル作成方法に従って作成した、ゼラチンを加えない濃縮ゲルを重層した。5 $\mu$ Lの5%SDS溶液(2%スクロースおよび10 $\mu$ g/mLフェノールレッドを含む)と、同量の*V.alginolyticus*培養上清を混合したものを試料として、上述のゲルを用いて4 $^{\circ}$ C、8mAの定電流で電気泳動を行った。試料に加えた色素がゲル下端まで移動するまでの約4時間、通電し泳動を行った。泳動後、分離ゲルのSDSを2.5%Triton X-100溶液を用いて室温下1時間で除去した。SDS除去後、0.1Mグリシン-NaOH溶液(pH8.3)にゲルを浸し、37 $^{\circ}$ Cで2時間保温した。インキュベーター終了後、0.1%アミドブラック溶液(メタノール:酢酸:水=30:10:60)で1時間室温で固定および染色を行った。脱色にはメタノール:酢酸:水=30:10:60の溶液を用いて行った。

### *V.alginolyticus*培養上清からのプロテアーゼの分離

*V.alginolyticus*培養上清から菌体外産生プロテアーゼをSuperose12(Pharmacia)を用いたゲル濾過による分離を試みた。*V.alginolyticus*を500mLのMarine Brothを用いて20 $^{\circ}$ Cで48時間振とう培養し、12,000xg、30分間の遠心により菌体を除いた培養上清を調製した。培養上清に80%と

なるよう硫酸を加え、4℃で30分攪拌した後、10,000xg、20分間遠心分離を行い、沈殿を回収した。沈殿を5mLのTris-HCl緩衝液（pH7.5、100mM NaCl, 20mM EDTAを含む）に溶解し、同緩衝液で3時間透析を行い、得られた溶液をゲル濾過用試料とした。同緩衝液で平衡化を行った Superose12に200  $\mu$ Lの試料を添加し、ゲル濾過を行った。溶出は同緩衝液を用いて0.5mL/minの流速で行い、溶出液は1mL毎に回収した。溶出してくるタンパク質は280nmの吸収をモニターすることにより検出した。さらに、得られた各溶出液について上述のアゾカゼイン法によりプロテアーゼ活性を測定した。

#### プロテアーゼ産生能変異株の作出

*V.alginolyticus*プロテアーゼ産生能変異株はN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（ニトロソグアニジン）を変異原として用い、以下の手順で作出を試みた。

*V.alginolyticus*をMarine Brothによって20℃で12時間培養し、3,000xg、10分間の遠心分離により菌体を回収後、人工海水（マリンアート；千寿製薬）で1回洗浄後、 $10^4$ CFU/mLとなるよう懸濁させた。菌体懸濁液200  $\mu$ Lに、人工海水に1mg/mLとなるようニトロソグアニジンを溶解させた溶液200  $\mu$ Lを加え、20℃で1時間変異原処理を行った。処理後、人工海水を用いて（遠心分離5,000xg、10分）3回洗浄した後、1mLのMarine Brothに懸濁し、2時間、20℃で培養した。培養後、培養液を人工海水で10倍に希釈し、Marine Agar平板に100  $\mu$ Lを接種し、20℃で培養した。24時間後、十分に増殖し、かつ単一コロニーとなっている株を選別し、1次スクリーニングとして、1%スキムミルクを加えたMarine Agar（ミルク培地）に接種した。接種したミルク培地平板を20℃で24時間培養後、増殖したコロニー周囲のミルクカゼイン分解によって形成されるハロー（透

明帯)の大きさを同条件で培養した*V.alginolyticus*野生株のものと比較し、野生株よりもハローの小さい株を選別した。選別された株は2次スクリーニングとしてMarine Brothによって20℃で24時間培養した培養上清中のプロテアーゼ活性の測定を行い、同条件で培養した野生株のプロテアーゼ活性と比較し、活性値の低い株を選別した。また、活性値の低い株の培養上清を試料として前節で述べた方法によりゼラチンザイモグラムを行い、野生株とバンドパターンの異なるものを最終的にプロテアーゼ産生能変異株とした。

#### 変異株の細菌学的性状の検定

変異株の細菌学的な基本性状の変異を細菌簡易同定キットアピ20Eおよびアピザイム(ともに日本ビオメリュー)を用いて検定した。野生株および変異株についてキットに定められ手順によって各項目の測定を行った。

また、基本的な増殖能を調べるため、Marine Brothでの増殖能を野生株および変異株で比較した。培地に接種後、20℃で振とう培養し、経時的に前節で述べた平板培養法によって菌数を計数した。

#### 変異株のマガキ幼生に対する病原性

各変異株および野生株をMarine Brothを用いて20℃で24時間培養し、マガキ幼生に対する感染試験を行った。感染試験は前章で述べた方法と同様の条件で行い、感染密度は $10^5$ CFU/mLとなるようマガキ飼育水に接種し、24時間後のマガキ幼生の生残率を測定した。また、各培養上清においても5%濃度となるようマガキ飼育槽に添加し、24時間後のマガキ幼生の生残率を測定した。

## 変異株産生プロテアーゼの各種阻害剤の影響

本実験においてはプロテアーゼの種類を同定する意図のもとに、メタロプロテアーゼの阻害剤であるEthylenediaminetetraacetic acid (EDTA ; 同仁化学) および1,10-phenanthroline (フェナンスロリン ; SIGMA) 、セリンプロテアーゼの阻害剤であるPhenylmethylsulfonylfluoride (PMSF ; SIGMA) および大豆トリプシンインヒビター (SIGMA) 、システインプロテアーゼの阻害剤であるN-ethylmaleimide (NEM ; SIGMA) を用いた。先に述べたプロテアーゼ活性測定法において、各阻害剤をプロテアーゼ反応基質液に終濃度が1mMとなるよう添加し、各変異株および野生株の培養上清中のプロテアーゼ活性を測定した。同時に各培養上清の阻害剤を添加しないプロテアーゼ活性を測定し、阻害率を算出した。

## 実験結果

### V.alginolyticus培養上清のプロテアーゼ活性

Fig.10に経時的に採取した*V.alginolyticus*の培養上清中のプロテアーゼ活性と生菌数を示した。その結果から、菌体外にプロテアーゼを分泌していることが確認された。プロテアーゼ活性は菌体の増殖とともに上昇し、36時間後のプロテアーゼ活性は17.9units/mLであった (Fig.10)。

今回用いたゼラチンザイモグラムではゼラチン分解活性を持つプロテアーゼが、ゲル中のゼラチンを分解することにより、アミドブラック (タンパク染色剤) によって染色されない透明なバンドとして検出される。このため、ゼラチンが保持されている部分はアミドブラックによって濃染されるため、活性を示す透明なバンドは明確に識別される。*V.alginolyticus*の24時間培養上清を試料としてゼラチンザイモグラムを行ったところ、プロテアーゼ活性を示すタンパク質のバンドが検出された (Fig.11)。プロテアーゼ活性を示すバンドは10本以上確認できたので、培養上清中にはプロテアーゼが分泌されていることが示された。

### V.alginolyticus菌体外産生プロテアーゼの分離

*V.alginolyticus*の培養上清から塩析により調製した試料を用いてゲル濾過を行ったところ、2つの大きなタンパク質のピークが検出され、それと一致してプロテアーゼ活性が2つの大きなピークとして検出された

(Fig.12)。また、それら2つとは異なった溶出時間で2つの小さなプロテアーゼ活性のピークが検出された。このことから、培養上清中にプロテアーゼが4種類以上存在することが示された。今回結果は示さないが、4つのプロテアーゼ活性ピークにおいて、もっとも高いプロテアーゼ活性を示した

画分についてそれぞれSDS-ポリアクリルアミド電気泳動およびゼラチンザイモグラムを行ったところ、複数のタンパク質バンドおよびプロテアーゼ活性バンドが検出され、各ピークが単一のプロテアーゼで構成されていないことが示された。

### プロテアーゼ産生能変異株の作出

*V.alginolyticus*をニトロソグアニジンにより変異原処理を行って得た1068株についてスクリーニングを行った。プロテアーゼ産生能の低下を検出する2段階のスクリーニングによって、野生株に対して55.5~95.7%のプロテアーゼ産生量を示す変異株VM3、VM9、VM13およびVM24と名付けた4株を得た (Table3)。

*V.alginolyticus*変異株の培養上清を用いたゼラチンザイモグラムでは、野生株でみられる活性バンドの消失や変異株のみの活性バンドが検出され、いずれの変異株においても野生株のバンドパターンとは異なっていた (Fig.13)。

### 変異株の細菌学的性状の検定

細菌学的な分類を決定する基本性状である糖の分解形式やオキシダーゼ活性などを含む23項目についてアピ20Eを用いて変異株と野生株との間で比較した (Table4)。また、アピザイムを用いてトリプシン活性などの18項目の酵素活性についても野生株と比較した (Table5)。その結果、すべての項目について野生株と変異株の間で一致した。また、野生株および変異株がトリプシン活性を持つプロテアーゼを産生することおよびキモトリプシン活性を持つプロテアーゼは産生しないことが示された (Table5)。

変異株および野生株の培地中での増殖についてFig.21に示した。すべて



の株において増殖がみられ、36時間までの増殖曲線に大きな違いはみられず、増殖能には大きな差違のないことが示された。

### 変異株のマガキ幼生に対する病原性

各変異株および野生株のマガキ幼生に対する感染試験における24時間後の幼生の生残率をFig.14に示した。野生株感染区における幼生の生残率が4.3%であるのに対して、変異株感染区ではVM24でもっとも高く69.2%、VM9でもっとも低く25.6%であり、すべての株でマガキ幼生に対する病原性が低下していた。変異株および野生株感染における幼生の生残率とプロテアーゼ産生量の間には有意な相関はみられなかった。

各変異株培養上清のマガキ幼生に対する感染試験においても菌体感染と同様にマガキ幼生の生残率はすべて野生株よりも高い値を示した

(Fig.15)。マガキ幼生の生残率はVM24でもっとも高く80.2%、VM9でもっとも低く72.5%であり、菌体感染と同じ傾向を示した。また、菌体感染と同様に幼生の生残率とプロテアーゼ産生量の間には有意な相関はみられなかった。

### 変異株産生プロテアーゼの各種阻害剤の影響

5種類のプロテアーゼ阻害剤を用いた変異株および野生株培養上清中のプロテアーゼ活性阻害試験の結果をTable6に示した。野生株のプロテアーゼ活性はフェナンスロリンによりもっとも高く阻害され、残存活性が13%であった。大豆トリプシンインヒビターによってプロテアーゼ活性は全く阻害されなかった。EDTA、PMSF、大豆トリプシンインヒビターおよびNEMによる各変異株のプロテアーゼ活性の阻害率は野生株の値との間に大きな異なりはみられなかった。しかし、フェナンスロリンによる残存活性



は変異株で40%から55%であり、野生株の残存活性（13%）と比較すると大きく上昇していた。



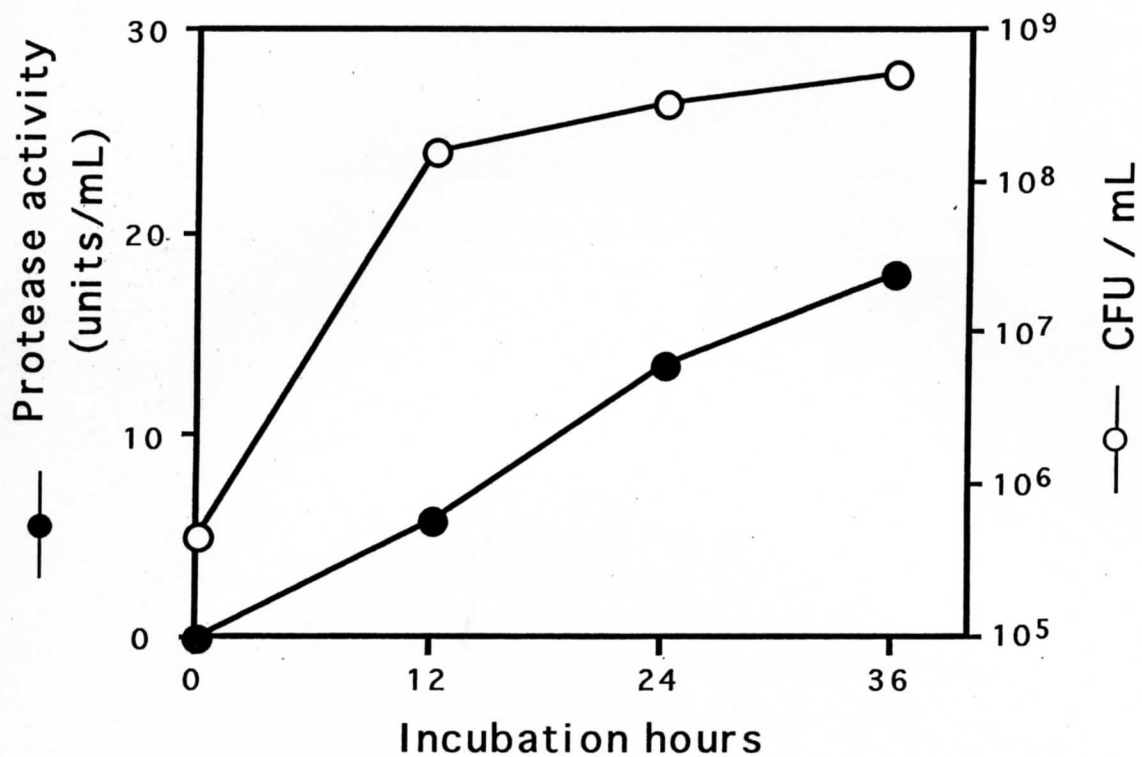


Fig.10. Protease activity of culture supernatant of *Vibrio alginolyticus* in Marine Broth.

**Fig.11. Gelatin SDS-PAGE analysis of culture supernatant of *Vibrio alginolyticus*.**

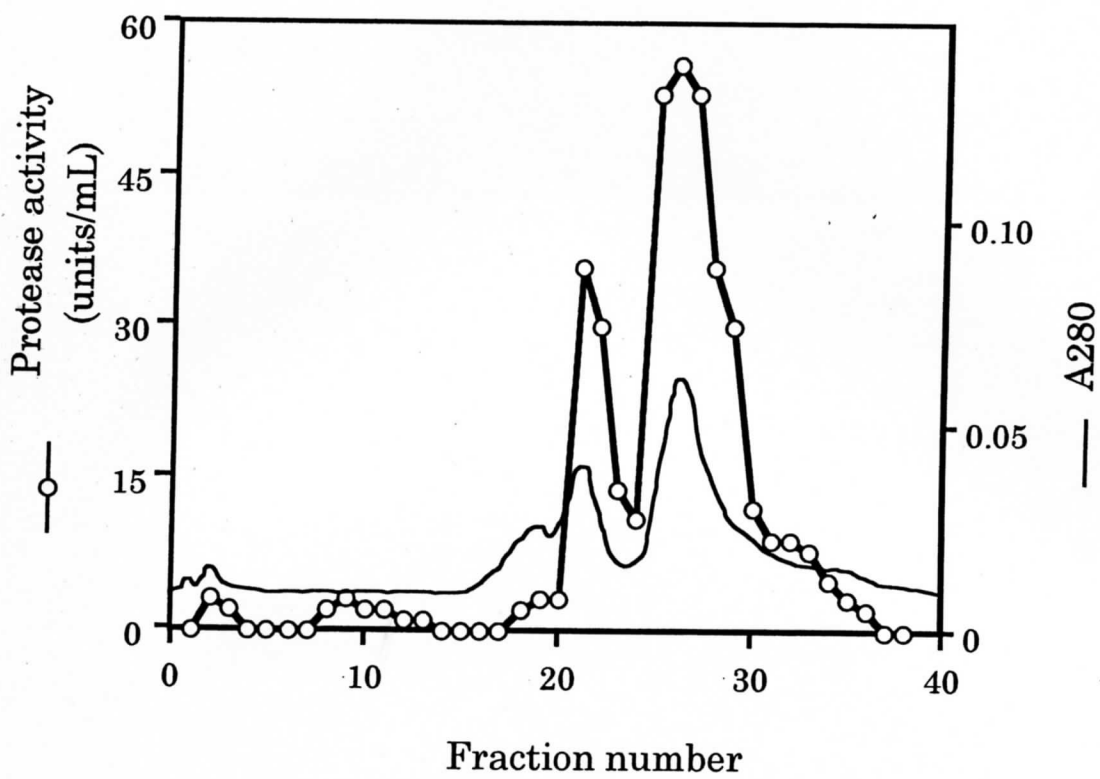


Fig.12. Gel filtration of culture supernatant of *Vibrio alginolyticus*

A B C D E F

**Fig.13. Gelatin SDS-PAGE analysis of culture supernatants of *Vibrio alginolyticus* mutants. Tracks contained supernatants of following strain: A,F, Wild type; B, VM3; C, VM9; D,VM13; E,VM24.**

Table 3. Protease activity of the wild type and mutants of *Vibrio alginolyticus* in Marine Broth

	Protease activity (units/mL)	Relative activity (%)
Wild type	18.9	(100)
VM3	10.5	55.5
VM9	13.9	73.5
VM13	18.1	95.7
VM24	11.8	64.4

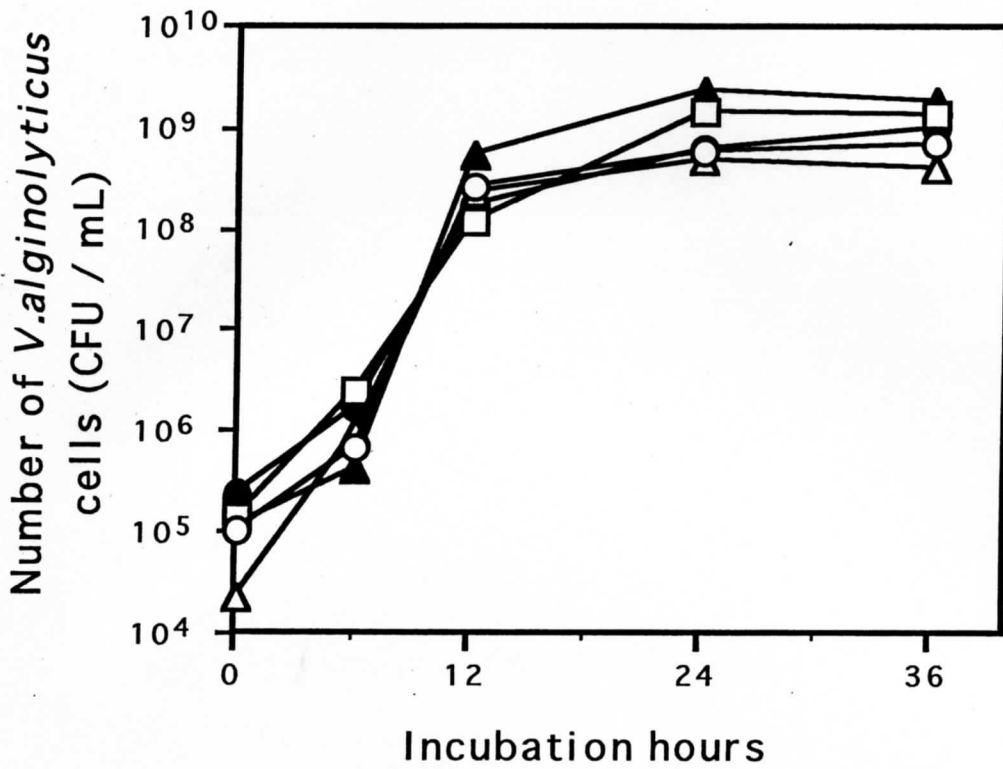


Fig.14. Growth of the wild type and mutants of *Vibrio alginolyticus* in Marine Broth.

○, Wild type; △, VM3; □, VM9; ▲, VM13;  
●, VM24.

Table 4. Characteristics of the wild type and mutants of  
*Vibrio alginolyticus*

Character	wild type	VM3	VM9	VM13	VM24
Gram stain	-	-	-	-	-
$\beta$ -galactosidase	-	-	-	-	-
Arginine decomposition	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylation	-	-	-	-	-
Ornithine	-	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-	-
Hydrogen sulphide	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-
Tryptophan deaminase	-	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer test	-	-	-	-	-
Gelatinase	+	+	+	+	+
Acid from					
Glucose	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-
Saccarose	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+
Nitric oxyde production	-	-	-	-	-

+, positive, -, negative.



Table 5. Enzymatic characteristics of the wild type and mutants of *Vibrio alginolyticus*

Enzyme	wild type	VM3	VM9	VM13	VM24
Alkaline phosphatase	+	+	+	+	+
Esterase (butyrate)	+	+	+	+	+
Esterase (carpylate)	+	+	+	+	+
Lipase (myristate)	+	+	+	+	+
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+
Varine arylamidase	+	+	+	+	+
Cystine arylamidase	-	-	-	-	-
Trypsin	+	+	+	+	+
Chimotrypsin	-	-	-	-	-
Acid phosphatse	+	+	+	+	+
$\alpha$ -galactosidase	+	+	+	+	+
$\beta$ -galactosidase	-	-	-	-	-
$\beta$ -glucuronidase	-	-	-	-	-
$\alpha$ -glucosidase	-	-	-	-	-
$\beta$ -glucosidase	-	-	-	-	-
N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	+	+	+	+	+
$\alpha$ -mannosidase	-	-	-	-	-
$\alpha$ -fucosidase	-	-	-	-	-

+; positive, -; negative.

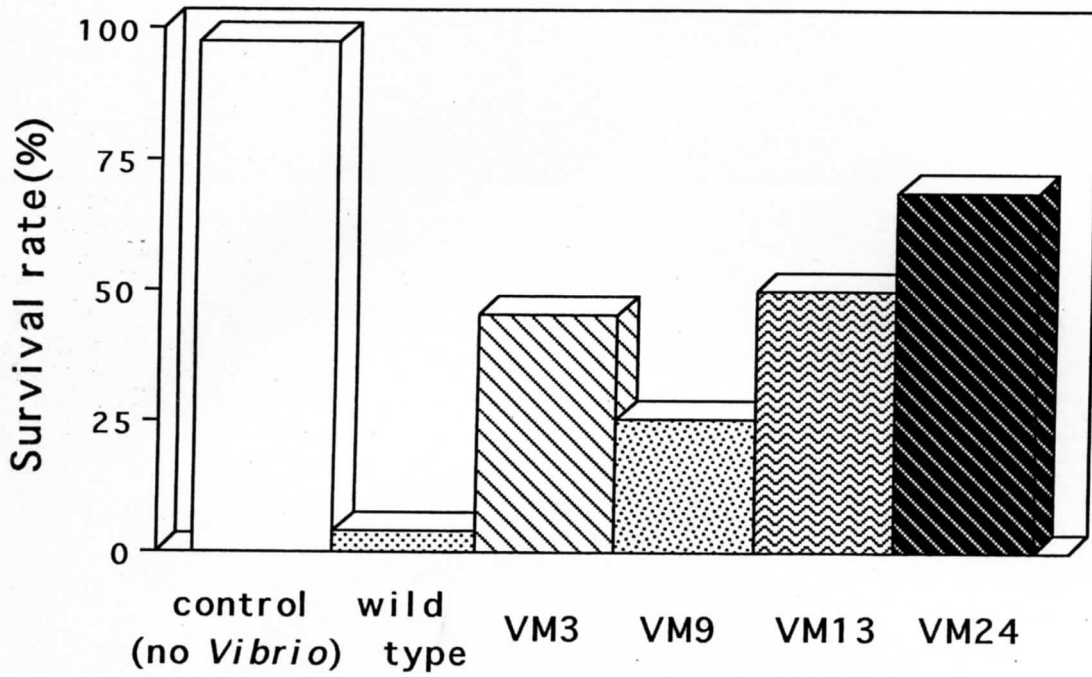


Fig.15. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* mutants against oyster larvae.

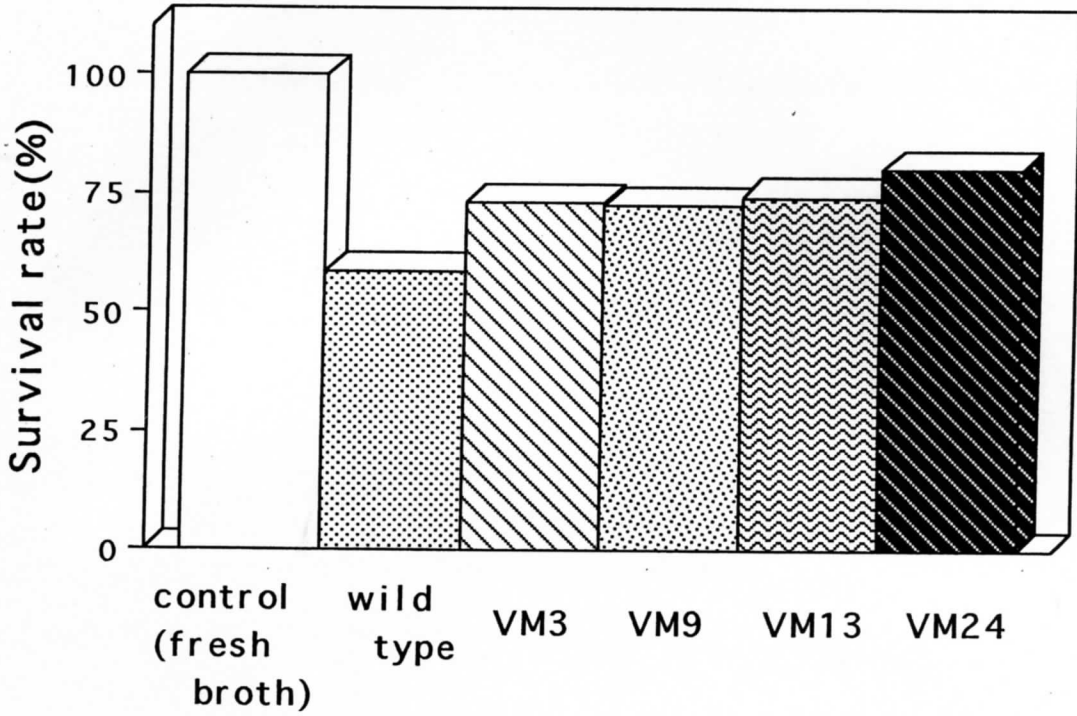


Fig.16. Pathogenicity of culture supernatants of *Vibrio alginolyticus* mutants against oyster larvae.

Table 6. Inhibition of protease activity in culture supernates of wild type and mutants of *Vibrio alginolyticus* by protease inhibitors

addition	wild type				residual activity(%)
	VM3	VM9	VM13	VM24	
none	100	100	100	100	100
EDTA(1mM)	83	98	89	86	83
1,10-phenanthroline(1mM)	13	40	55	49	46
Phenylmethylsulfonylfluoride(1mM)	50	53	44	45	60
Soybean Trypsin Inhibitor(1mM)	100	100	100	100	100
N-ethylmaleimide(1mM)	84	81	77	58	80

### 第3節 考察

#### Vibrio属細菌のマガキ幼生への人為感染試験

本研究に用いた3株のVibrio属細菌Vibrio sp., *V. alginolyticus*ならびに *V. tubiashii*はTubiah *et al.* (1965) によって瀕死のマルスダレガイ *Venus (Mercenaria) mercenaria* 幼生から分離され、同時に彼らによってヨーロッパヒラガキ *Ostrea edulis*、ホンアメリカイタヤガイ *Aequipecten (Argopecten) irradians* ならびに *Teredo navalis* 幼生に対しても病原性を示すことが報告されている。本研究においてマガキ幼生に対してもこれら3株が病原性を有することが示された (Fig.2)。また、培養上清の添加によって、幼生の半数以上が菌体感染の場合と同様の斃死を起こしたことから、上清に含まれる成分が病原性を有することが明らかになった (Fig.4)。

Tubiash *et al.* (1965) はこれらのVibrio属細菌の実験感染によりマルスダレガイ幼生が呈する症状として、面盤の脱落が起こり、軟体部が崩壊するbacillary necrosis (細菌性壊死症) と報告している。また、面盤の脱落時においても繊毛の運動性は十分に保持されていると報告している。本研究で観察されたマガキ幼生が呈する症状においても同様の面盤の脱落および軟体部の壊死がみられた (Fig.3およびTable2)。Elston and Leibovitz (1980) はヴァージニアガキ *C. virginica* 幼生に対する複数株の病原性ビブリオを用いた感染実験により、各株が感染する幼生の発達段階とその症状の違いから、幼生のビブリオ病を以下の3つのタイプに分類している。タイプIはすべての発達段階の幼生で遊泳停止を引き起こし外套膜で優先的に細菌の増殖が観察されるビブリオ病、タイプIIは早期ベリジャー幼生で起こる、遊泳運動を続けるが面盤に異常の見られるビブリオ病、タイプIIIは後期ベリジャー幼生で遊泳停止を引き起こし内臓の萎縮が観察されるビブリオ病である。本研究の感染実験には発生後2日前後のD型

幼生（早期ベリジャー幼生）を用いていること、さらに再現されたビブリオ病の特徴から、彼らが示すタイプⅡ、すなわち早期ベリジャー幼生で観察される面盤および後引筋の損傷を伴うビブリオ病であると考えられる。これらのことから本研究において行った3株の*Vibrio*属細菌のマガキ幼生への感染実験で観察された症状は、これまでに報告されている二枚貝幼生のビブリオ病の症状とよく一致し、本研究の感染試験によりビブリオ病が再現されていると判断した。

### *V. alginolyticus* のマガキ幼生に対する病原性

3株の中でマガキ幼生に対してもっとも強い病原性を示した

*V. alginolyticus*を以後のビブリオ病の感染実験供試菌株に用いることとし、その病原性発現の条件について検討を行った。

本研究に用いた*V. alginolyticus*のマガキ幼生に対する感染試験では、*V. alginolyticus*の感染密度が $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ CFU/mLと上昇することにより36時間後の幼生の生残率が72.1、55.2、0.5%と低下した（Fig.5）。この結果は、Sugumar *et al.*（1998a）において瀕死のマガキ幼生から分離した病原株の中でもっとも強い病原性を示し、彼らがこれまでに報告されている病原細菌と比較して強毒株と判定した、*V. splendidus* biovar Ⅱによるマガキ幼生に対する感染実験の結果とよく一致していた。従って本株は、マガキ幼生に対して*V. splendidus* biovar Ⅱと同程度の強い病原性を有する強毒株と考えられる。

*V. alginolyticus*感染における幼生の生残率は飼育水温が20℃よりも23℃で低い値を示した（Fig.5）。また、23℃での感染において、飼育水中で*V. alginolyticus*が増殖していることが確認され、マガキ幼生の感染病態の観察においてみられた殻周辺および死亡個体の殻内の細菌の蝟集は当初添加した菌体の集合ではなく、細菌増殖によるものと考えられる。

(Fig.6) 。 Fig.7に示したように*V.alginolyticus*は培地中では20℃よりも25℃で増殖がはやいことから、飼育水中に添加した後の*V.alginolyticus*の増殖速度が20℃よりも23℃で高く、飼育水中での増殖が病原性発現に強く関与していることが示唆される。

*V.alginolyticus*培養上清はマガキ幼生に対して病原性を有し、幼生の生存率で判定した場合、その病原性は濃度依存的に強くなったと考えられる (Fig.9) 。また、培養上清の添加では、菌体感染の場合のように、ほとんどすべての幼生が死亡するような強い病原性は見られなかった。一方で、Table2で示した菌体を感染させたときにみられた症状のうち、細菌の蟻集を除くすべての症状が培養上清のみの添加・感染系で観察された。これらことから、*V.alginolyticus*の菌体外産生成分は程度の差こそあれ、菌体による感染と同じ感染を引き起こす。すなわち、菌体外産生成分の中にマガキ幼生に対する病原因子が成分としてはすべて含まれると考えられる。

Sugumar *et al.* (1998a) は*V.splendidus*の洗浄菌体を破碎してその内容物をマガキ幼生に対して感染させた結果、菌体外産生成分の病原性と同等か、もしくはそれを上回る病原性を示したことを報告し、菌体内病原因子の存在を考えている。一方、Brown and Roland (1984) は病原因子はほとんどすべて菌体外産生成分にあると考えている。このように病原因子の発現には意見が分かれている。しかし、上で見たような結果を考えあわせて、本研究では量的な問題はともかく、菌体外産生成分にすべての病原因子が含まれると結論した。

次に制御可能な感染過程とそれに関する因子はなにかと考えた。病態観察の結果、菌体の蟻集と組織壊死が引き続いて起こり、それ以上病態が進行すると回復は困難となり幼生の斃死率は大きく上昇した。すなわち、病態を改善させるにはこの組織壊死の進行を制御する必要がある。

前田 (1991) は組織壊死は病原細菌が産生するプロテアーゼによって引



き起こされることを報告している。本研究においても感染時に見られる幼生の組織壊死が*V.alginolyticus*の産生するプロテアーゼによって引き起こされると考えられたので、この組織壊死に関与するプロテアーゼの存在と作用について追跡することとした。

### *V.alginolyticus*産生プロテアーゼ

本研究に用いた*V.alginolyticus*の24時間後の培養上清において、17.9units/mLのプロテアーゼ活性が認められ (Fig.10)、またゼラチンザイモグラムにより10本以上のプロテアーゼ活性バンドが検出されたことから (Fig.11)、*V.alginolyticus*が複数のプロテアーゼ産生能を有することが示唆された。Hare *et al.* (1983) は*V.alginolyticus*が高いプロテアーゼ産生能を有し、少なくとも5種類のプロテアーゼが培養上清中に産生されることを報告している。しかし、来住ら (1993) は試料をSDS処理した場合、活性を発現していない分子、たとえばプロ酵素の形で存在している分子が活性化されることを指摘している。すなわち、本研究でもSDS処理をしてさらに電気泳動を行っていることから、検出される活性バンドのすべてがアゾカゼインを用いたプロテアーゼ活性測定時に活性を持っていたと断定することは出来ない。また、SDS-PAGE電気泳動では試料中のタンパク分子に熱処理 (100℃、5分) でSDSを結合させることにより、タンパク分子の帯電量を分子量に正比例させ、電気泳動による移動度から分子量を推定する。しかし、ゼラチンザイモグラムに用いる試料ではプロテアーゼ活性の失活を考慮してこの熱処理を行わないため、プロテアーゼ活性バンドの正確な分子量を推測することは出来ない。従って、この実験において何種類のプロテアーゼが存在するは明らかにできない。

しかし、プロテアーゼ活性のピークが複数検出されたゲル濾過の結果から分子量の異なる複数のプロテアーゼの存在が示唆される (Fig.12)。加



えて、第3節で行った各種プロテアーゼに対する特異的な阻害剤を用いた阻害試験の結果からも、阻害剤に対する特異性の異なる複数種のプロテアーゼの存在が強く示唆された (Table6)。

### プロテアーゼ産生能変異株

本研究では変異原としてニトロソグアニジンを用いて *V.alginolyticus* 変異株の作出を行った。作出した変異株においてゼラチンザイモグラムにおいて複数のバンドで野生株と違いがみられ、複数のプロテアーゼの産生能に変異があると考えられた (Fig.14)。ニトロソグアニジンは非常に強い突然変異誘起作用を持ち、同時に強い発ガン作用を持つ物質として知られている。ニトロソグアニジンによる突然変異誘起はDNAに直接作用し、複製点の比較的近傍で非常に高い突然変異が起こり、点変異は起こりにくいことが明らかになっている (尾辻、1972)。しかし、今回調べた範囲では野生株との性状比較ではプロテアーゼ活性量とゼラチンザイモグラムのプロテアーゼ活性パターン以外には全く違いはみられず (Fig.14、Table4、Table5)、プロテアーゼ産生能にのみ変異が起こったと仮定して実験を進めた。

プロテアーゼ産生能の低下した変異株の4株すべてにおいてマガキ幼生に対する病原性は菌体およびそれらの培養上清の両方で野生株よりも低下した (Fig.15、Fig.16)。しかし、変異株および野生株のプロテアーゼ活性量と感染時のマガキ幼生の生残率に相関はみられなかった。各種プロテアーゼに対する特異的な阻害剤による阻害率において、すべての変異株においてフェナンスロリンによるプロテアーゼ活性阻害率が低下しており、すなわちメタロプロテアーゼの産生量の減少が示唆され、このことにより病原性が低下したと考えられる。

Nottage and Birkbeck (1987) は *V.alginolyticus* の産生する分子量

84kDaのプロテアーゼを精製し、そのプロテアーゼがヨーロッパヒラガキ *O.edulis* 幼生に対して病原性を持つこと、そして精製プロテアーゼの病原性が特異抗体により低下することを報告している。しかし、特異抗体によって培養上清の示す病原性は影響を受けないことも報告している。本研究で行ったゼラチンザイモグラムおよびゲル濾過の結果を併せて考慮すると、変異株を用いて行った実験により示唆された病原性発現に関与するメタロプロテアーゼも複数存在する可能性が考えられた。

本研究では変異株による実験で、プロテアーゼ活性の低下が幼生の死亡の軽減させるという結果が得られ、プロテアーゼの中でもメタロプロテアーゼが *V.alginolyticus* のマガキ幼生に対する病原性発現に関与していることが示唆された。これらのことからプロテアーゼ活性抑制が病原性発現の抑制につながると考えられ、プロテアーゼ阻害剤の添加による発病抑制効果を検討することとした。

## 要約

本研究に用いた3株の*Vibrio*属細菌はすべてマガキ幼生に対して病原性を示した。これらの感染されたマガキ幼生は異常遊泳、面盤の脱落、軟体部全体の壊死を特徴とするこれまでに報告されている二枚貝の細菌性壊死症と同様の症状を示し、本研究においてマガキのヒブリオ病が再現された。3株の*Vibrio*属細菌の培養上清においてもマガキ幼生に対する病原性が観察され、菌体外産生物中に病原因子が存在することが示された。また、斃死に至った幼生が示す病態は菌体を感染させた場合と同様であった。

*Vibrio alginolyticus* は菌体外に複数のプロテアーゼを産生しており、その中で病原性発現に関わるプロテアーゼの産生能を抑制する目的で*V. alginolyticus* の変異誘発を行った結果、プロテアーゼ産生能が野生株よりも4.3~44.5%減少した変異株が4株得られた。プロテアーゼ産生能変異株の4株すべてでマガキ幼生に対する菌体および培養上清の病原性が野生株に比べ顕著に減少していた。プロテアーゼ活性に対する阻害試験の結果、変異株のメタロプロテアーゼ活性は、野生株に比べて著しく低下しており、メタロプロテアーゼが病原性発現に関与していると推測された。

## 第2章 プロテアーゼ活性抑制による病原性発現の抑制

第1章ではマガキ幼生に対するビブリオ病を再現し、感染時のマガキ幼生の病態観察、培養上清中の病原因子の存在ならびにプロテアーゼ産生能変異株を用いた実験により、病原細菌が菌体外に産生する複数のメタロプロテアーゼが病原性発現、特に組織壊死に関与していることが推察された。それらのことからマガキ幼生への感染系において*V. alginolyticus*のプロテアーゼ活性を低下させることができれば、病原性の抑制につながるという考えに至った。

しかし、病原性発現に関与するプロテアーゼが特定されなかったこと、さらに第1章で推測されたメタロプロテアーゼの特異的阻害剤は2価金属イオンのキレート剤であり、これらのイオンは海水中に多量に含まれ、幼生に必須な物質であるため、阻害剤添加によるビブリオ病発病抑制に用いるには適さないと考えられる。

そこで本章ではプロテアーゼ活性の抑制による病原性発現の抑制を行うため、動物由来の3種類の非特異的なプロテアーゼ阻害剤、オボマクログロブリン、 $\alpha_2$ マクログロブリンならびにオボグロブリンを用いて*V. alginolyticus*の産生するプロテアーゼに対する阻害活性について検討した。さらに各阻害剤を培養上清と菌体のマガキ幼生への感染系に添加し、病原性発現の抑制効果について検討した。

### 第1節 プロテアーゼ阻害剤による病原性発現の抑制

#### 実験方法

## 動物由来プロテアーゼ阻害剤による活性阻害試験

本実験にはオボマクログロブリン（日本抗体研究所より分与）、ウシ血清由来 $\alpha_2$ マクログロブリン（ヤガイ）およびオボグロブリン（SIGMA）の3種類のプロテアーゼ阻害剤を用いた。今回使用したオボマクログロブリンはオボグロブリンから高度に精製された（98%以上）純品を用いた。猪飼（1984）は、分子量720kDの高分子タンパクであるオボマクログロブリンはトリプシンを捕捉してその活性を抑制すること、またその反応はこの分子に特徴的な分子トラップ様式で不可逆的な反応であることを明らかにしている。 $\alpha_2$ マクログロブリンはオボマクログロブリンと起源を同じくする相同の分子で哺乳類の血清中に存在する分子である。オボグロブリンは、ニワトリ卵白のグロブリン画分としては精製されているが、電気泳動などで確認した結果、オボミクログロブリン、オボマクログロブリンなどを含む8~9種類のタンパクからなる混合物である（Sigmaの製品保証書および日本抗体研究所大井氏のデータによる）。*V.alginolyticus*をMarine Brothで24時間培養した培養上清25 $\mu$ Lと0.1Mリン酸緩衝液（pH7.5）に2mg/mLとなるよう懸濁した各阻害剤溶液25 $\mu$ Lを混合し、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、アゾカゼイン法でプロテアーゼ活性を測定した。リン酸緩衝液により2倍希釈した培養上清のプロテアーゼ活性を対照区としてプロテアーゼ活性阻害率を算出した。

## プロテアーゼ阻害剤の*V.alginolyticus*培養上清の病原性発現抑制効果

各プロテアーゼ阻害剤を前章で述べた*V.alginolyticus*培養上清感染区に添加し、6時間ごとに24時間までマガキ幼生の生残率の変化を観察した。*V.alginolyticus*培養上清の感染濃度は5%とし、プロテアーゼ阻害剤の濃度は以下のように設定した；オボマクログロブリン終濃度2 $\mu$ g/mLおよび20 $\mu$ g/mL； $\alpha_2$ マクログロブリン終濃度2 $\mu$ g/mLおよび20 $\mu$ g/mL；オボ

グロブリン終濃度 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ および $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 。対照区として新鮮な滅菌Marine Broth を5%濃度となるよう幼生飼育水に添加し、同時に各プロテアーゼ阻害剤（オボマクログロブリン $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $\alpha_2$ マクログロブリン $20\mu\text{g}/\text{mL}$ およびオボグロブリン $50\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を添加した区を設定した。

### プロテアーゼ阻害剤の*V.alginolyticus*増殖への影響

*V.alginolyticus*の増殖培地としてゼラチン-海水培地（0.1%ゼラチン（Difco）および0.2%グルコースを含む滅菌海水）を用いた。培地に各プロテアーゼ阻害剤をそれぞれ添加した区（オボマクログロブリン終濃度 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ および $50\mu\text{g}/\text{mL}$ ； $\alpha_2$ マクログロブリン終濃度 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ および $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ；オボグロブリン終濃度 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ および $50\mu\text{g}/\text{mL}$ ）およびプロテアーゼ阻害剤無添加区（対照区）を設定し、 $20^\circ\text{C}$ で振とう培養した。各区から3、6、12ならびに24時間後に培養液を抽出し、前節で述べた平板培養法により生菌数を測定した。

### プロテアーゼ阻害剤の*V.alginolyticus*菌体の病原性発現への影響

各プロテアーゼ阻害剤を前章で述べた*V.alginolyticus*感染区に添加し、6時間ごと24時間までマガキ幼生の生残率の変化を観察した。*V.alginolyticus*の感染密度は $10^5\text{CFU}/\text{mL}$ とし、プロテアーゼ阻害剤の濃度は以下のように設定した；オボマクログロブリン終濃度 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ； $\alpha_2$ マクログロブリン終濃度 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ および $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ；オボグロブリン終濃度 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ および $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 。対照区として*V.alginolyticus*を添加せず各々のプロテアーゼ阻害剤のみを添加した区（オボマクログロブリン $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $\alpha_2$ マクログロブリン $5\mu\text{g}/\text{mL}$ およびオボグロブリン $50\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を設定した。



## 実験結果

### プロテアーゼ阻害剤によるプロテアーゼ活性阻害試験

今回用いた3種のプロテアーゼ阻害剤の*V.alginolyticus*培養上清中のプロテアーゼ活性に対する阻害率をTable7に示した。3種のプロテアーゼ阻害剤のいずれも、培養上清に含まれるプロテアーゼ活性に対して阻害効果を有していた。阻害活性の強さを比較するとオボマクログロブリンが阻害率85.3%ともっとも高い阻害活性を示した。 $\alpha_2$ マクログロブリンにおいても同等に近い79.1%の阻害率を示した。オボグロブリンにおいては50.1%の阻害率であった。

### プロテアーゼ阻害剤の*V.alginolyticus*培養上清の病原性発現抑制効果

*V.alginolyticus*培養上清のマガキ幼生感染区へのオボマクログロブリン、 $\alpha_2$ マクログロブリンならびにオボグロブリン投与の効果についてそれぞれFig.17、Fig.18ならびにFig.19に示した。

新鮮な培地とオボマクログロブリン、 $\alpha_2$ マクログロブリンおよびオボグロブリンそれぞれ投与した対照区においては生残率がすべて97%となり、マガキ幼生のみを飼育した区での生残率98%と同等の生残率を示した。

オボマクログロブリンを培養上清添加区に投与した場合のマガキ幼生の24時間までの生残率は、 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 投与区および $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 投与区で培養上清のみを添加した区よりも高い生残率を示した。 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 投与区での24時間後のマガキ幼生の生残率は91%となり、新鮮な培地とオボマクログロブリンを投与した対照区の生残率97%に近い値であった (Fig.17)。

$\alpha_2$ マクログロブリン投与では $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 投与区での24時間後のマガキ幼生の生残率は65%、 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 投与区では $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 投与区よりも高い80%の

生残率となり、いずれの濃度投与においても培養上清のみを添加した区の生残率46%よりも高い値を示した (Fig.18)。

オボグロブリン投与においては、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ならびに50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のいずれの濃度においても、培養上清のみを添加した場合と同様に幼生の生残率が低下し、オボグロブリン投与によるマガキ幼生の生残率の向上は認められなかった (Fig.19)。

### プロテアーゼ阻害剤の*V.alginolyticus*増殖への影響

*V.alginolyticus*の培地中での増殖に対するオボマクログロブリン、 $\alpha_2$ マクログロブリンならびにオボグロブリンの影響について評価した (Fig.20、Fig.21ならびにFig.22)。

オボマクログロブリンを培地中に添加した場合、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ および50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加区のいずれにおいても12時間までの*V.alginolyticus*の生菌数は対照区よりも低い値であった。特に、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加区では6時間後の生菌数は $7.3 \times 10^4 \text{CFU}/\text{mL}$ となり、はじめに培地に接種した生菌数

( $6.7 \times 10^4 \text{CFU}/\text{mL}$ )に近い値を示し、6時間までの明確な増殖抑制がみられた。しかし、12時間以降は*V.alginolyticus*は増殖に転じたが、24時間後の生菌数において、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加区では $5.3 \times 10^4 \text{CFU}/\text{mL}$ となり、対照区の $7.0 \times 10^4 \text{CFU}/\text{mL}$ よりも低い生菌数であった。一方、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加区の24時間後の生菌数 ( $1.5 \times 10^5 \text{CFU}/\text{mL}$ )は対照区よりも高くなった (Fig.20)。

$\alpha_2$ マクログロブリンを培地中に添加した場合、12時間後の1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ および10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加区の*V.alginolyticus*の生菌数は $2.1 \times 10^5$ および $2.0 \times 10^5 \text{CFU}/\text{mL}$ となり、対照区での生菌数 $5.0 \times 10^5 \text{CFU}/\text{mL}$ よりも低い値を示し、増殖が抑制されていた。しかし、24時間後の生菌数は対照区では $8.3 \times 10^5 \text{CFU}/\text{mL}$ となるのに対して、 $\alpha_2$ マクログロブリンの添加区では、



1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加の場合 $1.0 \times 10^6 \text{CFU}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加の場合 $1.7 \times 10^5 \text{CFU}/\text{mL}$ となり、対照区よりも高い生菌数を示した (Fig.21)。

オボグロブリンを培地中に添加した場合、12時間後の5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ および50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加区の*V.alginolyticus*の生菌数は $2.4 \times 10^4$ および $4.8 \times 10^4 \text{CFU}/\text{mL}$ となり、対照区での生菌数 $2.1 \times 10^5 \text{CFU}/\text{mL}$ よりも低い値を示し、増殖が抑制されていた。しかし、24時間後の生菌数は対照区では $1.9 \times 10^5 \text{CFU}/\text{mL}$ となり12時間後 ( $2.1 \times 10^5 \text{CFU}/\text{mL}$ ) とほぼ同じであるのに対して、オボグロブリンの添加区では、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加の場合 $3.9 \times 10^5 \text{CFU}/\text{mL}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加の場合 $3.7 \times 10^5 \text{CFU}/\text{mL}$ となり、12時間後よりも大きく増殖し、むしろ対照区よりも高い生菌数を示した (Fig.22)。

#### プロテアーゼ阻害剤の*V.alginolyticus*菌体の病原性発現抑制効果

*V.alginolyticus*菌体を用いた感染に対してオボマクログロブリン、 $\alpha_2$ マクログロブリンならびにオボグロブリン投与が感染抑制効果を持つのかを調べるため、各々の添加区におけるマガキ幼生の生残率の変化を調べることとで評価した (Fig.23、Fig.24ならびにFig.25)。

オボマクログロブリンの20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 投与区では24時間後の幼生の生残率は38%となり、オボマクログロブリンを投与しない感染区の生残率3%よりも明確に高い値を示し、斃死抑制の効果が認められた (Fig.22) オボグロブリン添加区でも、幼生の生残率は経時的に低下したが、常に単独感染区よりも高い値であった。

オボグロブリンおよび $\alpha_2$ マクログロブリンの添加は、いずれの添加濃度においても幼生の斃死を抑制しなかった (Fig.24、Fig.25)。むしろ、12時間後のマガキ幼生の生残率は、オボグロブリンおよび $\alpha_2$ マクログロブリンを投与しない単独感染区よりも低い生残率となった。

Table 7. Inhibition of protease activity in culture supernatant of *Vibrio alginolyticus* by protease inhibitors

inhibitor	inhibition rate(%)
ovoglobulins	50.1
ovomacroglobulin	85.3
$\alpha_2$ macroglobulin	79.1

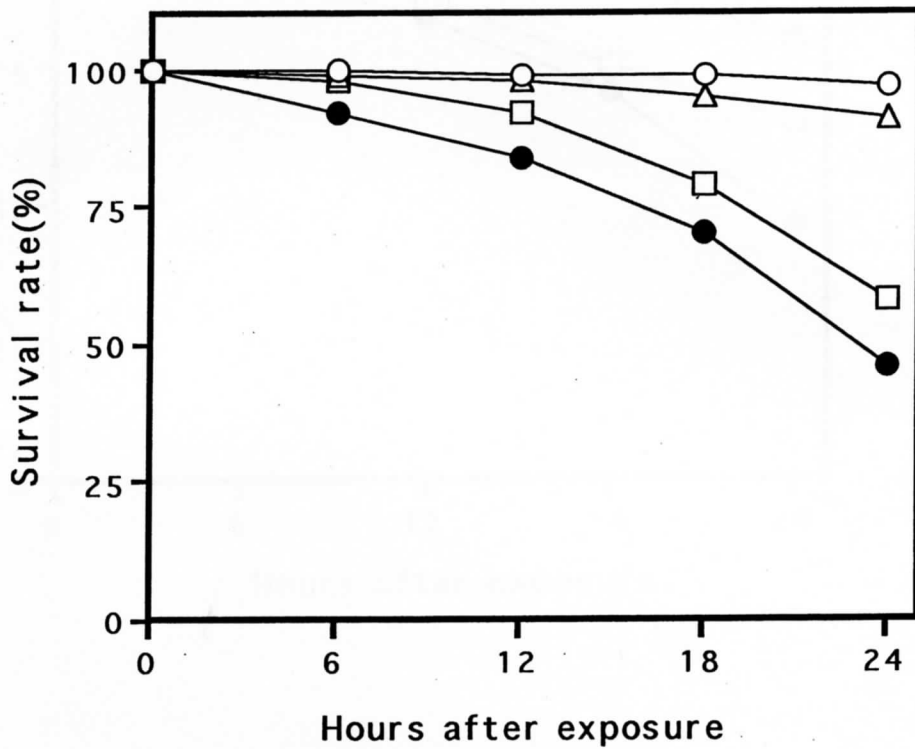


Fig.17. Effects of ovomacroglobulin on the survival of oyster larvae exposed to culture supernatant of *Vibrio alginolyticus*. ● ; exposed to 5% culture supernatant, □ ; exposed to 5% culture supernatant with 2µg/ml ovomacroglobulin, △ ; exposed to 5% culture supernatant with 20µg/ml ovomacroglobulin, ○ ; control(added 5% flesh Marine Broth with 20µg/ml ovomacroglobulin).

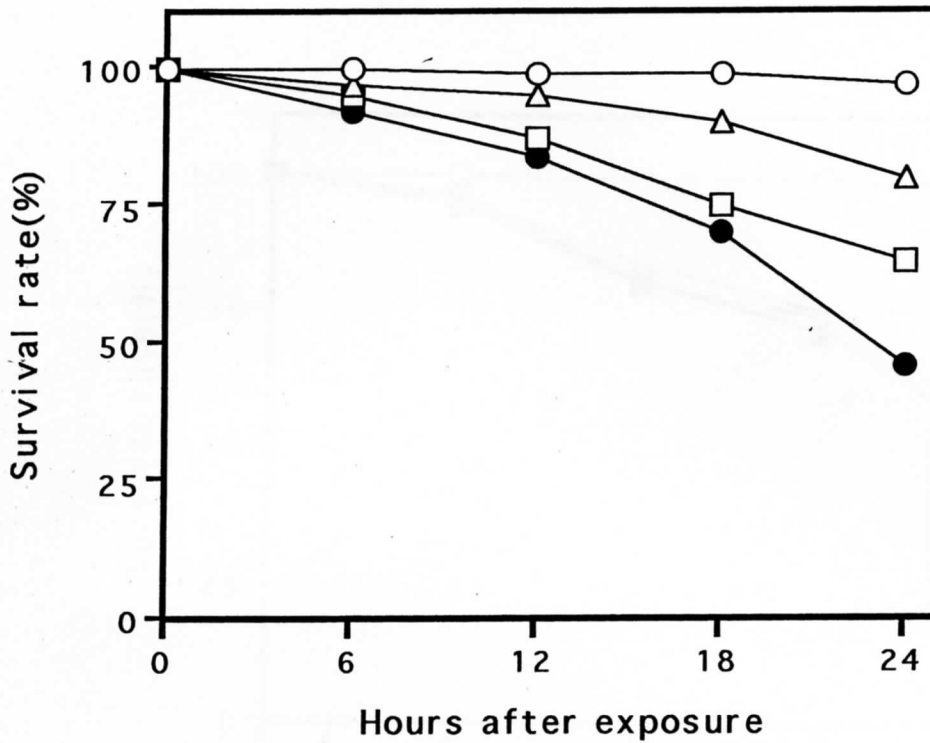


Fig.18. Effects of  $\alpha_2$  macroglobulin on the survival of oyster larvae exposed to culture supernatant of *Vibrio alginolyticus*. ● ; exposed to 5% culture supernatant, □ ; exposed to 5% culture supernatant with 2 $\mu$ g/ml  $\alpha_2$  macroglobulin,  $\Delta$  ; exposed to 5% culture supernatant with 20 $\mu$ g/ml  $\alpha_2$  macroglobulin, ○ ; control(added 5% flesh Marine Broth with 20 $\mu$ g/ml  $\alpha_2$  macroglobulin).

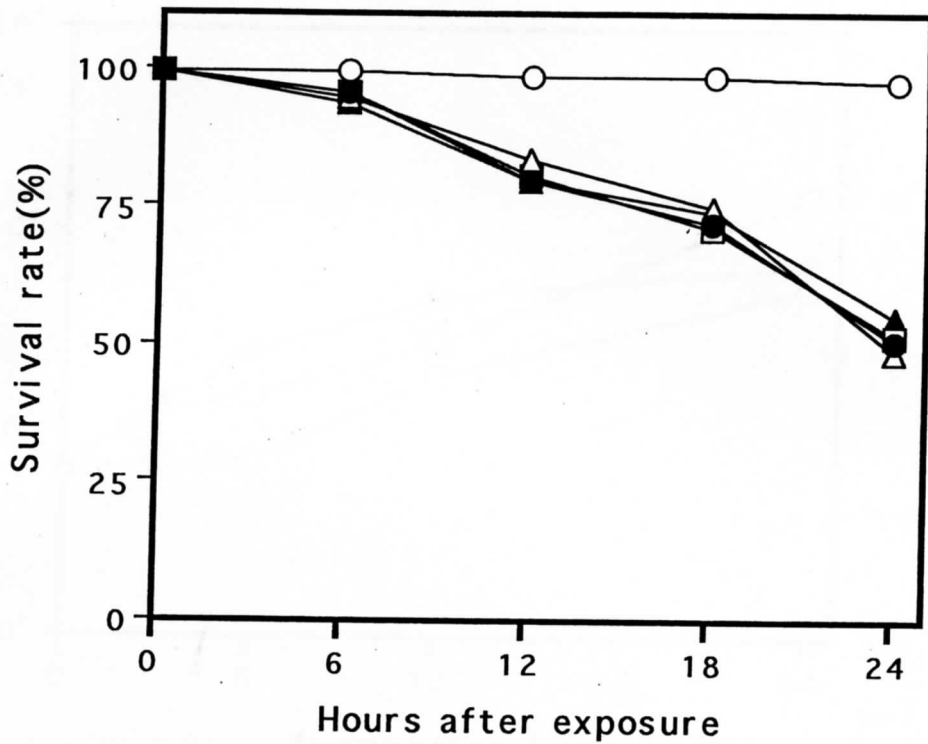


Fig.19. Effects of ovoglobulins on the survival of oyster larvae exposed to culture supernatant of *Vibrio alginolyticus*. ● ; exposed to 5% culture supernatant, △ ; exposed to 5% culture supernatant with 1 µg/ml ovoglobulins, □ ; exposed to 5% culture supernatant with 10µg/ml ovoglobulins, ▲ ; exposed to 5% culture supernatant with 50µg/ml ovoglobulins, ○ ; control(added 5% flesh Marine Broth with 50µg/ml ovoglobulins).

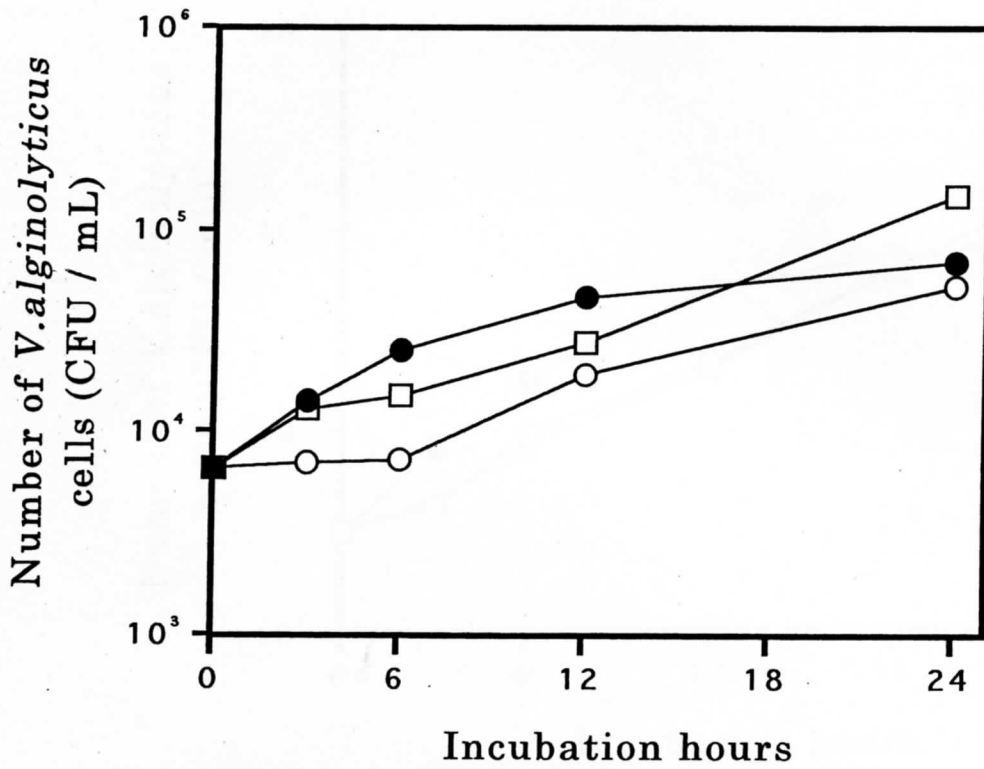


Fig.20. Suppressive effect of ovomacroglobulin on the growth of *V. alginolyticus* in gelatin medium.

● : *V. alginolyticus* was incubated alone,  
 □ : *V. alginolyticus* was incubated with 5µg/ml ovomacroglobulin, ○ : *V. alginolyticus* was incubated with 50µg/ml ovomacroglobulin..

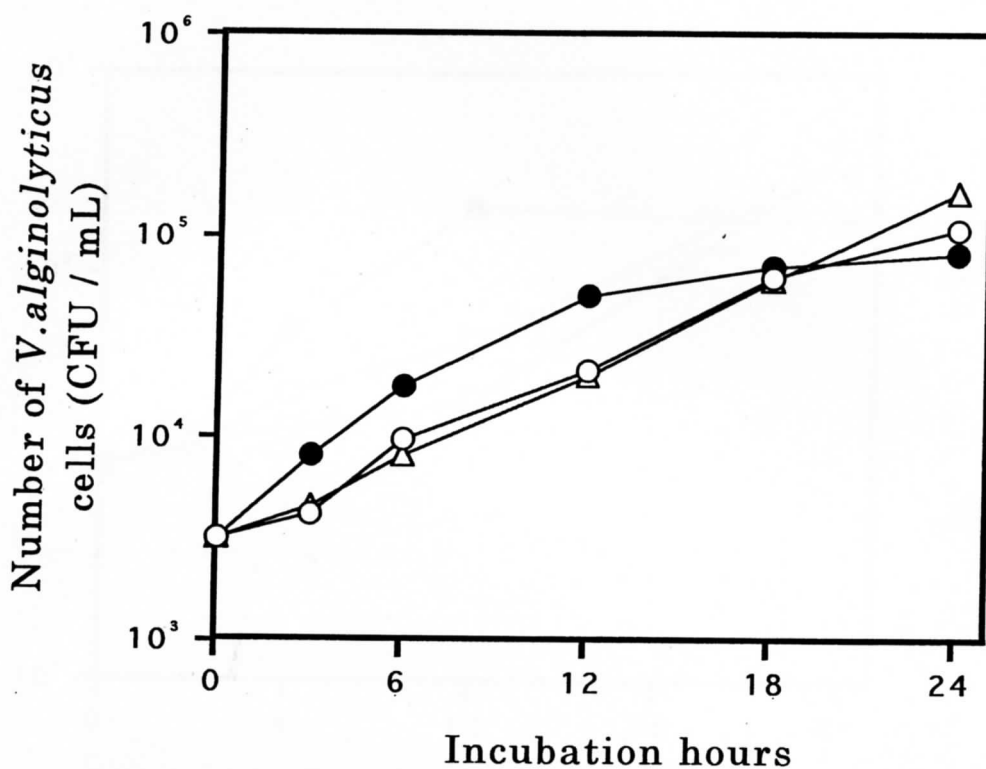


Fig.21. Suppressive effect of  $\alpha 2$  macroglobulin on the growth of *V. alginolyticus* in gelatin medium.

- : *V. alginolyticus* was incubated alone,
- : *V. alginolyticus* was incubated with 1µg/ml  $\alpha 2$  macroglobulin, Δ: *V. alginolyticus* was incubated with 10µg/ml  $\alpha 2$  macroglobulin..

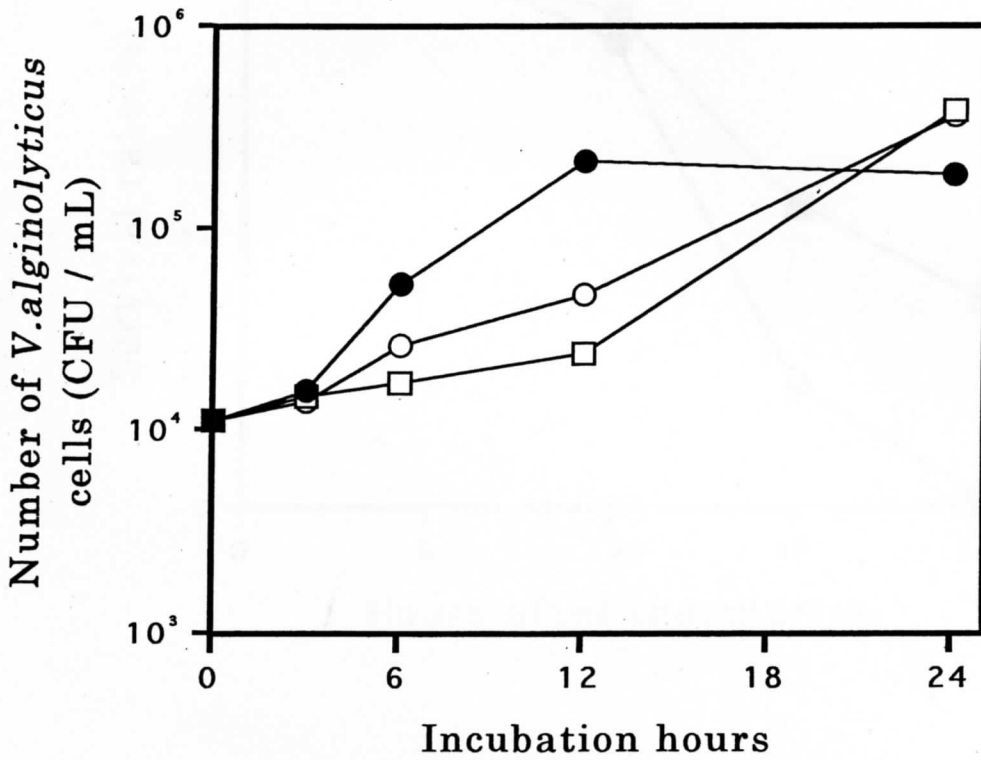


Fig.22. Suppressive effect of ovoglobulins on the growth of *V. alginolyticus* in gelatin medium.  
 ● : *V. alginolyticus* was incubated alone,  
 □ : *V. alginolyticus* was incubated with 5µg/ml ovoglobulins, ○ : *V. alginolyticus* was incubated with 50µg/ml ovoglobulins.



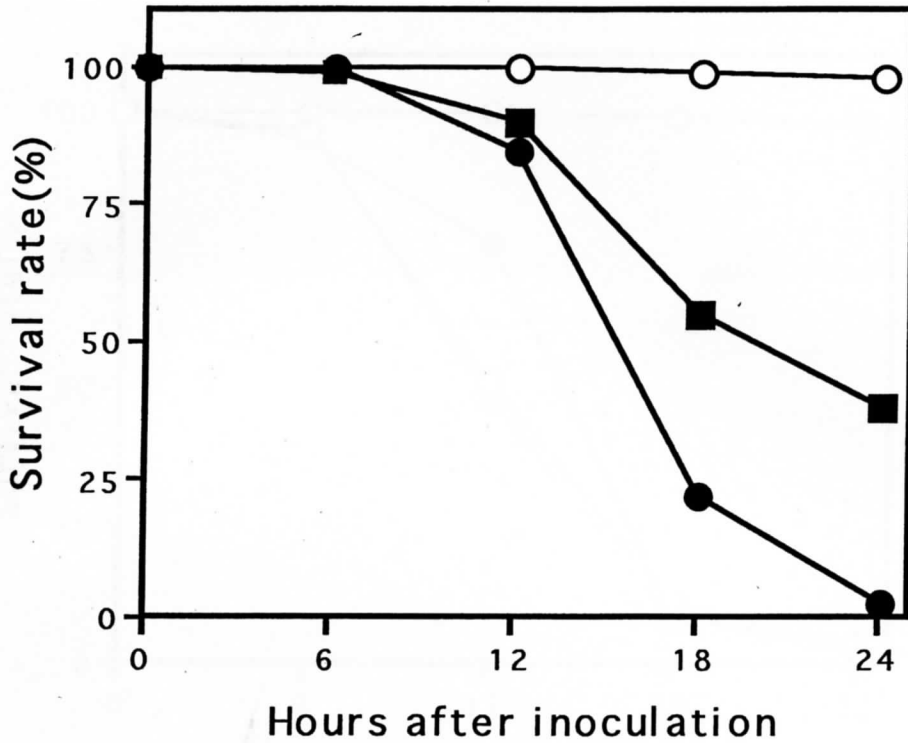


Fig.23. Effects of ovomacroglobulin on the survival of oyster larvae inoculated with *Vibrio alginolyticus*.

●, inoculated with *Vibrio alginolyticus* at  $10^5$  CFU/mL; ■, inoculated with *Vibrio alginolyticus* at  $10^5$  CFU/mL with 20 μg/mL of ovomacroglobulin; ○, control(added 20 μg/mL of ovomacroglobulin).

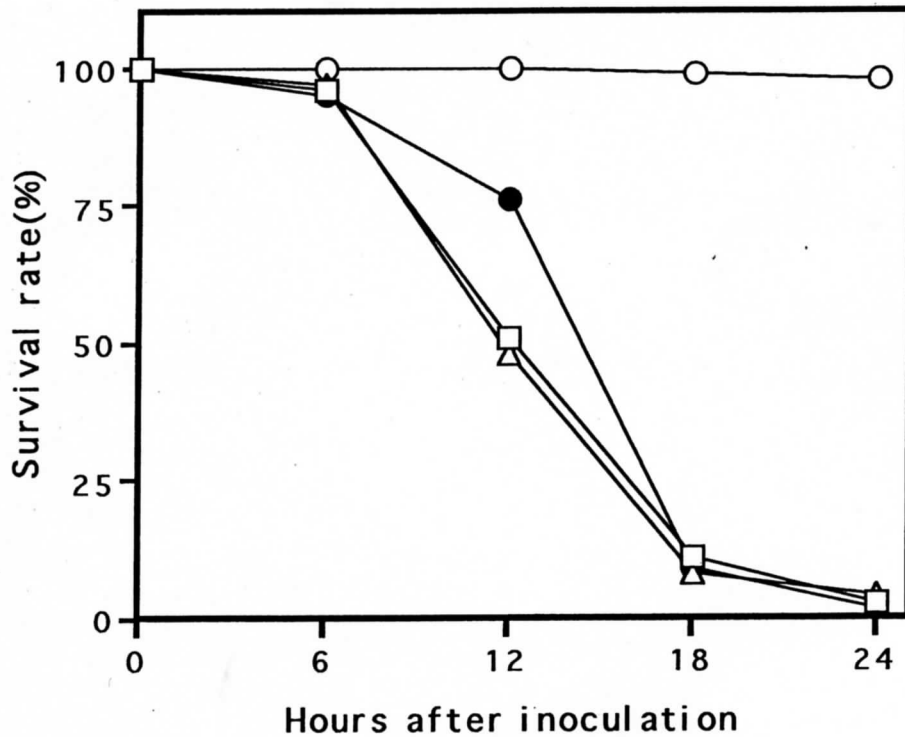


Fig.24. Effects of  $\alpha_2$  macroglobulin on the survival of oyster larvae inoculated with *Vibrio alginolyticus*.  
 ●; inoculated with *Vibrio alginolyticus* at  $10^5$  CFU/ml,  
 □; inoculated with *Vibrio alginolyticus* at  $10^5$  CFU/ml with  $1\mu\text{g/ml}$   $\alpha_2$  macroglobulin,  $\Delta$ ; inoculated with *Vibrio alginolyticus* at  $10^5$  CFU/ml with  $5\mu\text{g/ml}$   $\alpha_2$  macroglobulin,  $\circ$ ; control(added  $5\mu\text{g/ml}$   $\alpha_2$  macroglobulin).

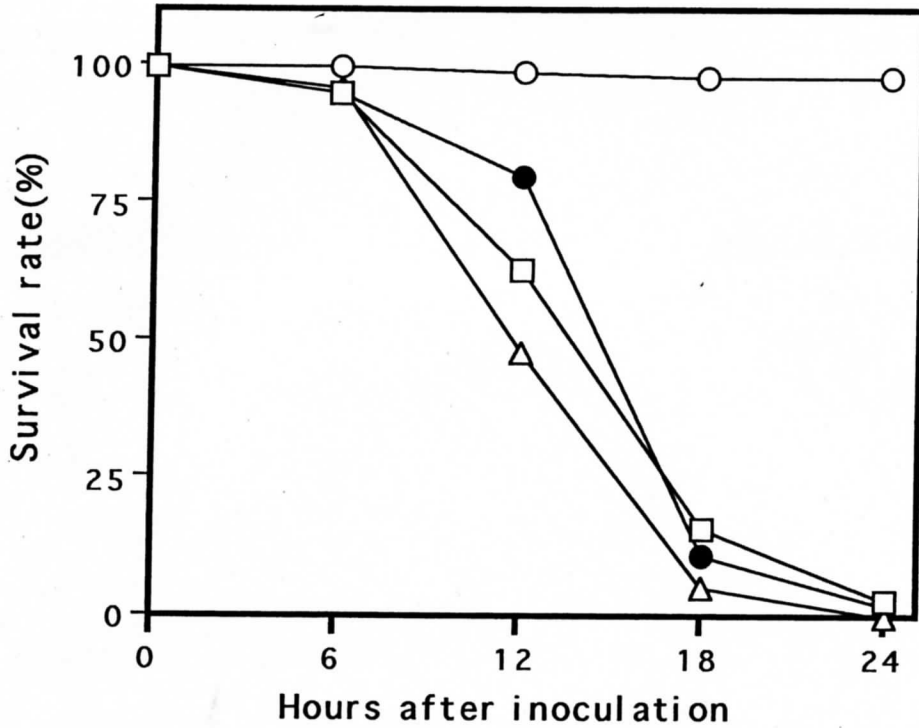


Fig.25. Effects of ovoglobulins on the survival of oyster larvae inoculated with *Vibrio alginolyticus*.  
 ● ; inoculated with *Vibrio alginolyticus* at  $10^5$  CFU/ml, □ ; inoculated with *Vibrio alginolyticus* at  $10^5$  CFU/ml with 5µg/ml ovoglobulins, △ ; inoculated with *Vibrio alginolyticus* at  $10^5$  CFU/ml with 50µg/ml ovoglobulins, ○ ; control(added 50µg/ml ovoglobulins).

### 第3節 考察

#### プロテアーゼ阻害剤の*V.alginolyticus*病原性発現抑制効果

本研究にはいずれも動物由来の成分で*V.alginolyticus*の産生するプロテアーゼに対して阻害活性を有すると考えられる阻害剤を用いて、ビブリオ病の発病抑制効果について検討した。これらの物質を用いた理由は前節で述べたように*V.alginolyticus*の産生するプロテアーゼは、特定されていない複数種から構成されるものであり、ある特定のプロテアーゼに対する特異的な阻害剤の適用はできないことから、特異性は低いがより広範なプロテアーゼ活性に対して阻害能を有する物質を用いることを考えた。

もう一つの理由は、発病抑制の手法として、マガキ幼生の飼育水に添加する方法を考えた。その際には、海水中でも十分にプロテアーゼ阻害効果を発揮でき、幼生に対して影響を及ぼさない物質でなければならない。前章第3節の実験から病原性発現にはメタロプロテアーゼの関与が示されたが、メタロプロテアーゼの阻害剤である各種キレート剤は海水中に存在する金属イオンをキレートすることにより、プロテアーゼ阻害剤としての機能が消失することが考えられ、さらには幼生に必要な金属イオンをキレートしてしまい幼生に悪影響があることが考えられる。そこで、これまでに知見はなく飼育水への投与によりマガキ幼生に対して何らかの生理活性を有するかもしれないが、生物由来の物質を用いることとした。

さらに、前田(1991)は、強病原性の緑膿菌*Pseudomonas aeruginosa*の産生するプロテアーゼとオボマクログロブリンを反応させた結果、プロテアーゼ活性をほとんど抑制するとともに、その病原性を大きく抑制させたことを報告している。 $\alpha_2$ マクログロブリンは血清におけるプロテアーゼ活性阻害物質として細菌感染において重要な機能を担うことが知られている(篠原1993、前田1995、三好1999)。このような病原性細菌の産生す

るプロテアーゼに対して高い阻害活性とその病原性抑制効果が、オボマクログロブリンおよび $\alpha_2$ マクログロブリンの投与によってマガキ幼生のヒブリオ病においても期待できると考えられた。

以上の3つの理由からオボマクログロブリンおよび $\alpha_2$ マクログロブリンを選択し、さらに、オボマクログロブリンを少量含有するオボグロブリンの3種類のプロテアーゼ阻害剤を使用した。幼生飼育水にこれらを投与したところ、無添加区とほぼ同様の生残率を示し、光学顕微鏡観察で幼生の運動性や形態に異常は認められず、3種類ともマガキ幼生の生存に影響するものでないことが確認された (Fig.17~19)。

各阻害剤は*V.alginolyticus*培養上清中のプロテアーゼに対して高い阻害活性を示した。オボグロブリンを除くオボマクログロブリンと $\alpha_2$ マクログロブリンでは、その阻害活性の強さと阻害剤添加による培養上清のマガキ幼生に対する病原性の抑制効果はよく一致していた (Table7、Figs.17~19)。特に阻害率のもっとも高かったオボマクログロブリンは20 $\mu$ g/mLの濃度で感染実験系に添加することにより、培養上清の病原性をほぼ完全に抑制した。しかし、 $\alpha_2$ マクログロブリンはオボマクログロブリンと比較して、傾向は同様であったが、プロテアーゼ活性阻害、病原性の抑制効果はともに低かった (Table7、Fig.18)。一方、オボグロブリンはプロテアーゼ活性は約50%阻害したにもかかわらず、病原性の抑制効果はみられなかった (Table7、Fig.19)。この違いの原因として複数存在する

*V.alginolyticus*プロテアーゼに対する各阻害剤の阻害特異性の違い、すなわち病原性発現に強く関与するプロテアーゼに対する阻害率の違いや阻害の持続時間の違いなどに起因すると考えられる。これらのことから、培養上清中のプロテアーゼ活性が、幼生に対して培養上清が示す病原性に関与していると強く示唆された。

今回用いた3種の阻害剤の培地への添加は*V.alginolyticus*の初期の増殖

を抑制した (Figs.20~22)。特に、オボマクログロブリンは6時間までの明確な増殖抑制効果を示した。Miyagawa et al. (1991) は *Serratia marcescens* および *Pseudomonas aeruginosa* の増殖が菌体外産生プロテアーゼによって促進され、オボマクログロブリンを投与することによりその増殖が抑制されることを報告している。本研究においても、オボマクログロブリン添加は産生するプロテアーゼによるゼラチンの分解を抑制することによって栄養の摂取 (N源、C源の獲得) を抑え、そのことが増殖抑制につながったと考えられた。これらのことから、*V.alginolyticus* の菌体外産生プロテアーゼはヒブリオの栄養の摂取という面で重要な因子であり、プロテアーゼ活性を抑制することによって増殖が抑制されることが示された。

マガキ幼生に対する *V.alginolyticus* 感染区への各阻害剤の投与においてオボマクログロブリン投与区のみでマガキ幼生の生残率の向上がみられた (Figs.23~25)。これはオボマクログロブリン投与により、幼生に作用する *V.alginolyticus* プロテアーゼに対する阻害作用と、プロテアーゼ抑制による増殖抑制作用により病原性発現が抑制されたと考えられる。しかし、培養上清の感染系に添加した場合にみられた、ほぼ完全な病原性の抑制効果はみられず、24時間後のマガキ幼生の生残率は38%と、オボグロブリンのみの添加区よりも大幅に低いものであった。その理由として以下のことが考えられる。

病態の観察から *V.alginolyticus* は飼育水に添加された後マガキ幼生に付着・増殖し、その状態でプロテアーゼが産生され、作用していると考えられる。オボマクログロブリンは高分子タンパクであり、付着・増殖する菌体から幼生に向かって産生されるプロテアーゼに対して活性を阻害する十分量のオボマクログロブリンが存在できず、病原性発現を抑制できないことが考えられた。また、マガキ飼育水中ではマガキ代謝産物によって、プ

ロテアーゼを必要とせず*V.alginolyticus*が栄養獲得ができる環境と考えられる。さらに、オボマクログロブリンは培地中で菌体の増殖を6時間までは抑制したが、24時間後の生菌数から、6時間以降の増殖速度は無添加区よりも加速していると考えられ (Fig.20) 、この*V.alginolyticus*の増殖にともなってプロテアーゼの産生量が増大し、飼育水中ではオボマクログロブリンのプロテアーゼ阻害による病原性発現効果が十分に発揮されていないと可能性が考えられた。

プロテアーゼ阻害剤、特にオボマクログロブリン投与は、培養上清という増加しないプロテアーゼのマガキ幼生に対する病原性については抑制したが、菌体感染における増殖にともなって産生されるプロテアーゼに対しての抑制には、最初にオボマクログロブリンを投与するという今回の手法では限界があった。そこで、菌体の増殖抑制による病原性の抑制を検討することとした。

## 要約

*Vibrio alginolyticus* の菌体外に産生されるプロテアーゼ活性はオボマクログロブリン、 $\alpha_2$ マクログロブリンにより強く阻害された。プロテアーゼ活性の抑制による病原性発現の抑制を目的として、オボマクログロブリンを添加することにより、*V. alginolyticus* 培養上清のマガキ幼生に対する病原性がほぼ完全に抑制された。このことから、菌体外産生物中の主な病原因子はプロテアーゼであると強く示唆された。また、菌体感染系への添加でも幼生の死亡が軽減された。



### 第3章 マガキ幼生ビブリオ病への生物学的防除法の適用

マガキ幼生のビブリオ病は、ビブリオ属細菌の増殖によって生産され、多量に菌体外に分泌される複数のプロテアーゼの作用によるマガキ幼生の組織壊死によって発現することが*V. alginolyticus*のプロテアーゼ産生能変異株を用いた感染試験や各種プロテアーゼ阻害剤を用いた発病抑制試験などによって明らかにされた。ビブリオ属細菌にとってプロテアーゼの分泌は、タンパク質の分解による栄養吸収の手段であり、その増殖の最も重要な条件になっていると考えられた。したがって、マガキ幼生のビブリオ病を阻止するためにはプロテアーゼ活性を阻害する必要がある、プロテアーゼ阻害剤の1種であるオボマクログロブリンがもっともその可能性が高いと考えられた。しかし、病原細菌の増殖にともなって上昇するプロテアーゼ活性に対してオボマクログロブリンの投与には限界があり、実際の発病を阻止するためには実用的ではない。

マガキ幼生のビブリオ病は、今や緊要な課題であるため早急にその対策を立てる必要がある。このため、プロテアーゼ活性を阻害する方法よりもビブリオそのものの増殖を抑制する方法が選択される。これまで有害細菌の増殖を抑制するには各種の抗生物質が用いられていたが、海洋の汚染や耐性菌など種々の問題がある。そこで、海洋細菌を用いた生物学的防除法の確立を試みた。

はじめに3株の*Vibrio*属細菌に対する増殖抑制能を持つ海洋細菌の分離を試みた。さらに、*Vibrio*増殖抑制細菌を*V. alginolyticus*のマガキ幼生感染系に添加し、病原性発現の抑制効果について検討を行った。

#### 第1節 *Vibrio* 増殖抑制細菌を用いた*V. alginolyticus*病原性発現の抑制

## 実験方法

### 海洋細菌の分離

宮城県石巻湾袖の浜から採取した天然海水および東北大学大学院水圏動物生理学研究室におけるマガキ成貝の飼育水槽（循環濾過式水槽）の飼育水から海洋細菌の分離した。各海水50  $\mu$ LをMarine agar平板に接種し、室温（約23°C）で2~3日培養した。単一コロニーを釣菌し、別のMarine agar平板に接種し、保存した。

### Vibrio 増殖抑制活性の測定

得られたすべての分離細菌株について、第1章で用いた3種の*Vibrio*属細菌 (*V. alginolyticus*, *V. tubiashii*, *Vibrio* sp.) に対する増殖抑制活性を測定した。測定方法はNogami and Maeda (1992) の方法（スメア一法）によった。すなわち、分離細菌株をMarine agar平板上に2本の平行な直線状（長さ約4cm、3cm間隔）に植菌し、*Vibrio*属細菌株をそれよりも短く（長さ約2cm）中央に植菌した（Fig.26B）。対照区として分離細菌株の代わりに同じ*Vibrio*属細菌株を植菌したもの（Fig.26C）および中央の*Vibrio*属細菌株のみを植菌したもの（Fig.26A）を作成した。各平板を20°Cで3~7日培養後、中央の*Vibrio*属細菌株の増殖を2つの対照区と比較し、増殖抑制活性を判断した。*Vibrio*属細菌の増殖が対照区Fig.24Cよりも抑制された株を++、対照区Fig.24Cと対照区Fig.24Aの間であったものを+、対照区Fig.24Aと同等もしくはより増殖したものを-として判定した。

### Vibrio 増殖抑制細菌のマガキ幼生への影響

供試した3株のうちで、もっとも強い病原性を示す*V.alginolyticus*に対して増殖抑制活性を示した分離細菌について、マガキ幼生への影響を検討した。第1章で述べた方法により採取した30個体のマガキ幼生を、6ウェル培養プレートに10mLの滅菌海水とともに収容し、分離細菌株を $10^4$ CFU/mLとなるよう添加し、20°Cで飼育した。24時間後のマガキ幼生の生死を光学顕微鏡下で観察し、生残率を算出した。対照区として細菌を添加しない区を設定した。

#### 分離細菌S21株の*V.alginolyticus*に対する海水培地中での増殖抑制効果

*V.alginolyticus*に対して増殖抑制活性を示したS21株について10% Marine Brothを含む人工海水培地中での増殖抑制効果について検討した。*V.alginolyticus*およびS21をそれぞれ $3.8 \times 10^2$ および $6.8 \times 10^2$ CFU/mLで海水培地に接種後、室温（約23°C）で36時間まで培養した。12時間ごとに培養液を抽出し、第1章で述べた平板培養法により生菌数を測定した。*V.alginolyticus*およびS21を同培地で単独培養したものを対照区として設定した。

#### 分離細菌S21株の*V.alginolyticus*のマガキ幼生に対する病原性抑制効果

*V.alginolyticus*によるマガキ幼生に対する感染試験は第1章で述べた方法で行った。*V.alginolyticus*の感染濃度は $10^5$ CFU/mLとした。Marine Brothで24時間、室温で培養したS21株を遠心分離（3,000xg,5分）により菌体を回収し、滅菌海水に懸濁後、 $10^4$ および $10^5$ CFU/mLとなるよう*V.alginolyticus*感染区に添加した。添加後、12、18、24、ならびに36時間に幼生の生残率を計測した。対照区としてS21株を加えない*V.alginolyticus*感染区およびS21株のみを加えた区を設定し、その生残率も記録した。

## 実験結果

### Vibrio増殖抑制細菌の分離

天然海水およびマガキ飼育海水からそれぞれ23株と28株の計51株の単一コロニーが分離された。この51株について、3株のVibrio属細菌に対する増殖抑制活性を調べた結果、12株が抑制活性を示した (Table 8)。3株のVibrio属細菌すべてに増殖抑制活性を示した株はY5、T1の2株であった。V. alginolyticusに対して9株が増殖抑制活性を示し、S21株がもっとも強い増殖抑制活性を示した。

### 増殖抑制細菌のマガキ幼生に対する病原性

V. alginolyticusに対して増殖抑制活性を示した9株のマガキ幼生に対する病原性をTable 9に示した。9株のうち6株については、飼育水に添加しても幼生の生残に全く影響を示さず、その生残率は分離細菌を加えない対照区と同様に100%であった。一方、残りの3株、Y1、Y5およびT10株を添加した場合は幼生の生残率の低下がみられ、とくにY5株の添加では生残率は9.1%と著しく低下した。

### S21株の海水培地中でのV. alginolyticus増殖抑制活性

V. alginolyticusを単独で培養すると、36時間で $3.8 \times 10^2$  CFU/mLから $3.7 \times 10^8$  CFU/mLに増殖した。しかし、S21株との混合培養した場合、36時間後のV. alginolyticusの菌数は $1.0 \times 10^5$  CFU/mLと増殖が抑制された (Fig. 27)。また、すべての測定時間において混合培養における菌数が単独培養よりも低い菌数を示した。今回特に経時変化の図は示さないが、S21株を36時間培養した後の生菌数は、S21株単独培養 ( $1.6 \times 10^7$  CFU/mL)

と*V.alginolyticus*との混合培養 ( $1.4 \times 10^7$ CFU/mL) の間で大きな違いはみられなかった。

#### S21株の*V.alginolyticus*のマガキ幼生に対する病原性抑制効果

*V.alginolyticus*の増殖を強く抑制し、かつマガキ幼生に対して影響を示さないことが確認されたS21株を*V.alginolyticus*の実験感染系に添加して生物学的防除法を試みた (Fig.28)。その結果、マガキ幼生への*V.alginolyticus*感染区では24時間後の幼生の生残率は8.4%となったのに対して、S21株を $10^4$ CFU/mLおよび $10^5$ CFU/mLとなるよう添加した区では幼生の生残率が向上し、それぞれ53.1%と78.0%となった。S21株を添加した*V.alginolyticus*感染区において生残していた幼生は運動も活発で、また形態異常も認められなかった。特に、 $10^5$ CFU/mLのS21株添加区では24時間の段階で完全に死亡している個体はほとんどなく、今回の基準で死亡と判定された個体も瀕死でピブリオ病の病態を呈しているものであった。菌体を加えない区およびS21株をのみを添加した区での幼生の生残率は24時間でそれぞれ93.3%と97.4%であった。

Fig.26. The smear method for the detection of vibriostatic activity. A, control (smear of *V. tubiashii*, ATCC19109); B, plate tested with strain S21; C, *V. tubiashii* instead of strain S21. Arrows indicate the smear of *V. tubiashii*. Arrowheads indicate the smear of strain S21.

Table 8. Inhibitory effects of marine bacteria isolates on the growth of *Vibrio* strains

	<i>Vibrio</i> sp. ATCC19107	<i>V. alginolyticus</i> 19108	<i>V. tubiashii</i> 19109
from oyster rearing tank (28 strains)			
S2	+	-	-
S3	+	-	+
S13	+	-	+
S21	-	++	++
Y1	+	+	-
Y5	+	++	++
from coastal seawater (23 strains)			
T1	+	+	++
T5	+	+	-
T10	+	++	-
T13	+	+	-
T17	+	+	-
T18	-	+	-

++, Strong inhibition ; +, Weak inhibition ; -, No inhibition.

Table 9. Effects of marine bacterial strains on the survival of larval oysters

Bacterial strain added	Survival rate (%)
<u>S21</u>	<u>100</u>
Y1	96.8
Y5	9.1
T1	100
T5	100
T10	95.8
T13	100
T17	100
T18	100
None	100



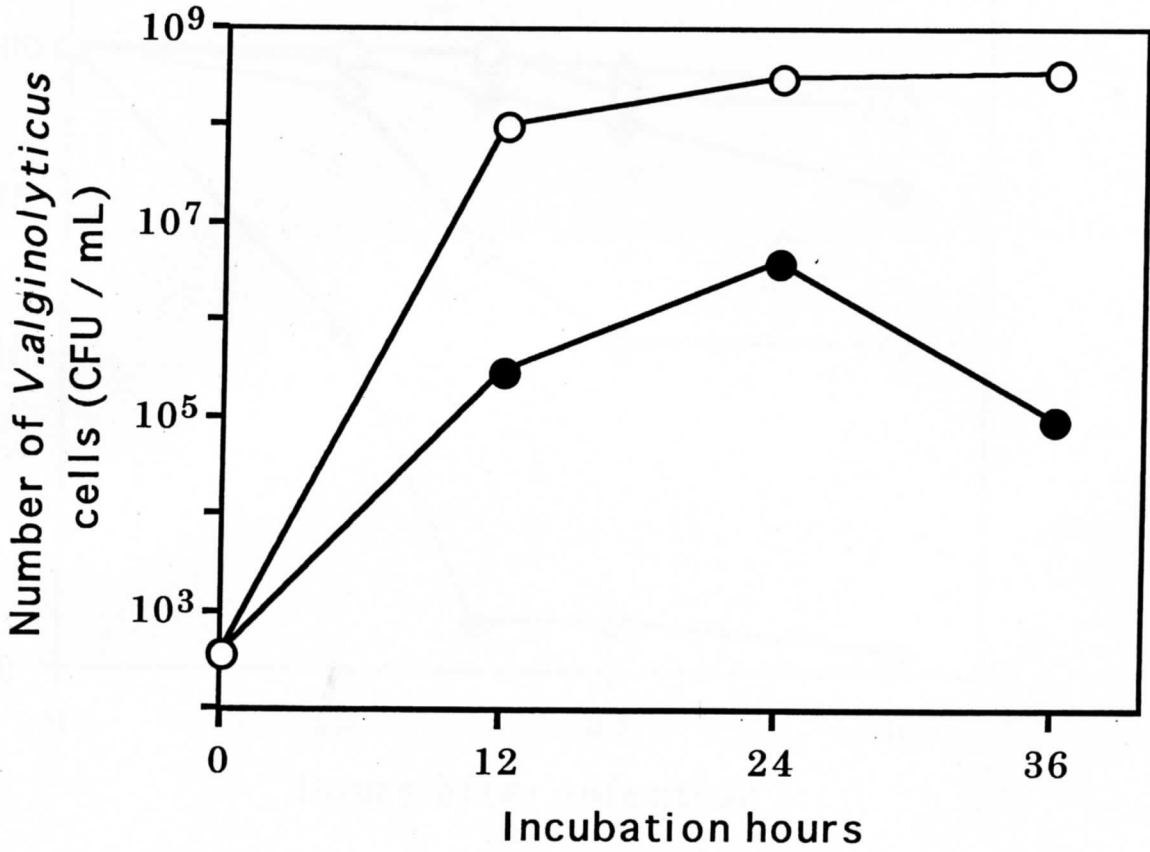


Fig.27. Suppressive effect of strain S21 on the growth of *V. alginolyticus* in seawater broth.

○ , *V. alginolyticus* was incubated alone;

● , *V. alginolyticus* was incubated with strain S21.

Incubation temperature was 23°C.

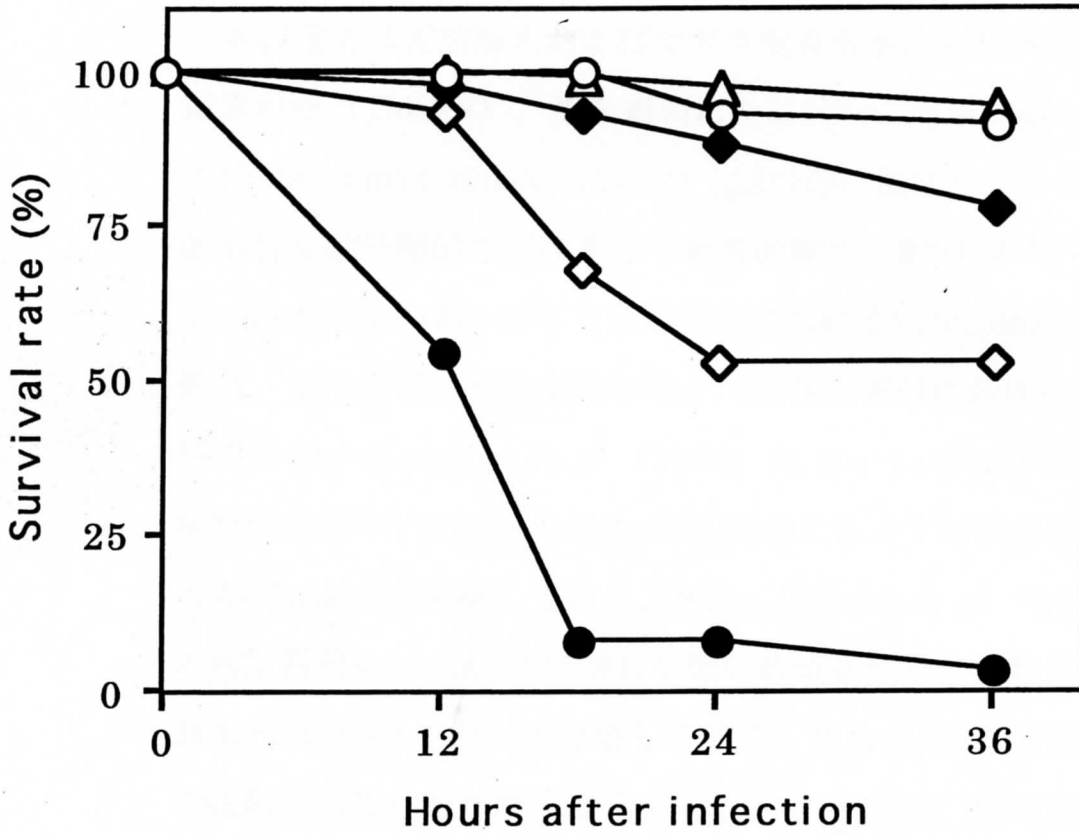


Fig.28. Effects of strain S21 on survival of larval oysters challenged with *Vibrio alginolyticus*.

- , inoculated with *V. alginolyticus* alone;
- ◇, inoculated with *V. alginolyticus* and S21 at 10<sup>4</sup> CFU/mL;
- ◆, inoculated with *V. alginolyticus* and S21 at 10<sup>5</sup> CFU/mL;
- △, inoculated with S21 at 10<sup>4</sup> CFU/mL alone;
- , control(no inoculation).

## 第2節 考察

### Vibrio 増殖抑制細菌を用いた *V.alginolyticus* 病原性発現の抑制

本研究では天然海水およびマガキ飼育海水から12株の増殖抑制細菌が分離された (Table8)。海洋細菌による *Vibrio* 増殖抑制のメカニズムについて Nogami and Maeda (1992) は2つの可能性を示唆している。1つは抗菌的もしくは静菌的な活性を示す物質の産生、2つ目として niche competition、すなわち生息環境内における *Vibrio* 属細菌と抑制細菌の位置競合、主に微量金属や窒素源などの栄養素獲得における競合による抑制効果である。Riquelme *et al.* (1996) は *Argopecten purpuratus* に対して病原性を示す *V.alginolyticus* に抑制効果を示す海洋細菌 *Alteromonas haloplanktis* を分離している。また、Gibson *et al.* (1998) はマガキ幼生の病原細菌 *V.tubiashii* に対して強い殺菌活性を示す物質を産生する海洋細菌 *Aeromonas media* を分離している。彼らの用いた2層培養法は分離細菌を殺菌した後、新たな培地を重層し、その培地上での対象細菌 (病原細菌) の増殖の程度から抑制細菌を検索する方法であり、抗生物質産生細菌の分離は行えるが、生菌同士の抑制効果は検討できない。今回の研究で用いたスメア一法では病原細菌と分離した試験菌を同時に平板上に培養することで上述した2つの可能性を持つ抑制細菌が分離できると考えられる。

*V.alginolyticus* に対して平板上および培地中で強い抑制活性 (Table7、Fig.25) を示した S21 株はグラム陰性、単桿菌、紫色の色素産生菌であった。Anderson *et al.* (1974) や Gauthier and Flatau (1976) は色素産生細菌の多くが抗生物質を産生すると報告している。しかし、本研究では *Vibrio* 属細菌に対する抑制効果を持つ細菌の分離が目的であるので、S21 株の抗生物質産生能の検討を含む抑制メカニズムについての検討は行わず、今後の検討課題である。

S21株を*V.alginolyticus*のマガキ幼生への感染系に添加することにより、*V.alginolyticus*の病原性発現を顕著に抑制した (Fig.28)。このことは第1章で示された*V.alginolyticus*が感染した後に増殖すること (Fig.8) が病原性発現において重要な意味を持ち、増殖抑制が病原性発現の抑制に有効であることを示している。また、種苗生産現場での適用には抑制細菌の海水中での生残と病原性発現の抑制効果の持続期間などのさらなる検討が必要ではあるが、増殖抑制細菌を用いた生物学的防除法が二枚貝ビブリオ病に適用できる可能性が示された。

## 要約

マガキ幼生ビブリオ病の生物学的防除法に適用する目的で、ビブリオ増殖抑制細菌を検索した。その結果、マガキ飼育水および天然海水から分離した細菌株のうち、約18% (9/51株) の株が平板上で *Vibrio alginolyticus* に対して増殖抑制活性を示した。 *Vibrio alginolyticus* に対して強い増殖抑制活性を示し、かつマガキ幼生に対して毒性を示さない S21 株をビブリオ感染系へ添加した結果、幼生の生残率は3%から78%に大きく改善した。これらのことから、ビブリオ増殖抑制細菌を用いたマガキ幼生のビブリオ病の生物学的防除法が有効な防除法であることが示された。

#### 第4章 総合考察

本研究では二枚貝のビブリオ病の病原性発現メカニズムに基づいたビブリオ病抑制方法の適用を試みた。本研究の内容をFig.29にまとめた。

マガキ幼生のビブリオ病においては、感染・発病過程の中で*Vibrio*属細菌の増殖によって生産され、多量に菌体外に分泌される複数のプロテアーゼの作用で誘起されるマガキ幼生の組織壊死の過程が、病態の増悪を招き、最終的に幼生を死に至らしめることが、*V.alginolyticus*の野生株およびプロテアーゼ産生能変異株を用いた感染試験や各種プロテアーゼ阻害剤を用いた発病抑制試験などによって明らかとなった。*Vibrio*属細菌にとってプロテアーゼの分泌は、タンパク質の分解による栄養摂取（N源、C源の獲得）の手段として必須であり、その増殖の最も重要な条件になっていると考えられた。したがって、マガキ幼生のビブリオ病を阻止するためにはプロテアーゼ産生を抑制する、または活性を阻害する必要がある。そこで、プロテアーゼ阻害剤の1種で、細菌の産生するプロテアーゼに対して高い阻害効果を有することが明らかとなっているオボマクログロブリンの添加による発病の抑制法を検討した。その結果、オボマクログロブリンの投与は、培養上清中のプロテアーゼ活性を阻害し、その病原性を完全に抑制した。すなわち、本研究の大きな成果として、プロテアーゼ活性を阻害することが、発病の抑制に重要であることを明確にした。しかし、感染時の病原性*Vibrio*属細菌の増殖にともなって産生量が増大し、活性が上昇するプロテアーゼに対しては、オボマクログロブリンの単独投与だけでは完全な抑制には至らなかった。すなわち、細菌の増殖を抑制して、かつプロテアーゼ活性も低く抑えることが重要であると考えられた。そこで*V.alginolyticus*そのものの増殖を抑制する方法として、海洋の常在細菌から分離したビブリオ増殖抑制細菌を用いた生物学的防除法を適用した。その結果、

*V.alginolyticus*の増殖は低く抑えられ、マガキ幼生の生残率は大幅に向上した。すなわち、本研究によりビブリオ病抑制方法として、ビブリオ増殖抑制細菌を用いた生物学的防除法がビブリオ病の発症を制御するために、非常に有効な手法であることが明らかとなった。

本研究では3株の*Vibrio*属細菌 (*V.alginolyticus*, *V.tubiashii*, *Vibrio* sp.) を用いてマガキ幼生に対する感染実験を行い、すべての株でこれまでに報告されている二枚貝のビブリオ病と同様の症状を示し、ビブリオ病を引き起こすことを明らかにした。この3株はこれまでにマルスタレガイ *Venus(Mercenaria) mercenaria*など4種の二枚貝に対してビブリオ病を引き起こすことが報告されている (Tubiash et al.1965)。このように同じ細菌株が複数の二枚貝種に対して同じの症状のビブリオ病を引き起こすということは、病原因子や発病メカニズムには共通性があると考えられ、それらに基づいたビブリオ病発病抑制方法は多くの二枚貝種で有効であると考えられた。

二枚貝のビブリオ病においては病原因子の解析についての研究は少なく、本研究において初めてプロテアーゼ産生能変異株を用いてプロテアーゼと病原性の関連について検討を行った。プロテアーゼ産生能は多くの*Vibrio*属海洋細菌で有する能力であることがShimidu and Tsukamoto (1985)によって報告されている。本研究で用いた*V.alginolyticus*も培養上清中のプロテアーゼ活性の測定からプロテアーゼ産生能を有することが明らかとなった。これまでに*V.anguillarum* (Farrell and Crosa, 1991) *V.cholerae* (Booth et al., 1983) *V.vulnificus* (Kothary and Kreger,1987) などの魚類およびヒトに病原性を有する細菌から主要な菌体外産生プロテアーゼが病原因子として分離・精製されている。これらのプロテアーゼはすべてメタロプロテアーゼであり、本研究で用いた*V.alginolyticus*においても、野生株と変異株の培養上清に対する各種プロ

テアーゼ阻害剤を用いた阻害試験からメタロプロテアーゼが主たる病原因子であることが明らかとなった。今後このメタロプロテアーゼを指標に、本件級の結果から複数あると考えられた病原性プロテアーゼの特定やマガキ幼生が損傷を受ける部位の特定といった病原性発現におけるプロテアーゼの作用機序の解明が期待できる。

本研究では病原性発現課程における制御可能な因子として、マガキ幼生に組織壊死を引き起こす重要な因子と考えられた*V.alginolyticus*の産生するプロテアーゼを選択した。その他の病原性発現に関わる病原因子としては、幼生への菌体付着に関わる付着（定着）因子および菌体内に存在する病原成分（菌体内成分）が考えられる。本研究のビブリオ病の病態観察において、広範な組織壊死に先立ち、幼生への菌体の蝟集、付着が観察された。このことから*V.alginolyticus*がマガキ幼生に対する付着（定着）因子を持つことが示唆された。また、Sugumar *et al.* (1998a) はマガキ幼生に対して病原性を有する*V.splendidus*の洗浄菌体を破碎して得た菌体内成分中に病原因子が含まれ、菌体外産生物よりもマガキ幼生に対する病原性が強いことを報告している。今回の研究ではこれらの因子に関する検討は行っていないが、今後これらの分子の特定や二枚貝幼生への作用機序が解明されれば、それらの因子の制御によるビブリオ病の制御方法が検討できる。特に、本研究の病態観察において、組織壊死に先立ち、幼生への菌体の付着が観察されたことから、感染の第1段階と考えられる菌体の宿主への付着を制御することも有効な発病抑制方法となる可能性がある。

*V.alginolyticus*培養上清中のプロテアーゼ活性に対する阻害率は相同分子であるオボマクログロブリンと $\alpha_2$ マクログロブリンで異なっていた。オボマクログロブリンと $\alpha_2$ マクログロブリンは、プロテアーゼを捕捉し、複合体を形成することによって高分子の基質（タンパク質）に対するプロテアーゼ活性を阻害する。この捕捉（トラップ機構）はそれぞれの分子が持



つプロテアーゼに対して感受性の高い'餌部位'の切断によって引き起こされる。この餌部位が、相同分子ではあるがオボマクログロブリンと $\alpha_2$ マクログロブリンで異なっており、そのことによって*V.alginolyticus*培養上清中のプロテアーゼに対する阻害率が異なつたと考えられた。このことはセラチアプロテアーゼに対する $\alpha_2$ マクログロブリンの阻害率は60%であるが、オボマクログロブリンでは100%阻害することが報告されている(Molla et al.,1987) ことから裏付けられる。

本研究で用いた3種類のプロテアーゼ阻害剤のうち、オボマクログロブリンは*V.alginolyticus*培養上清中のプロテアーゼ活性をもっとも強く阻害し、培養上清のマガキ幼生に対する病原性を完全に抑制した。すなわち、プロテアーゼ活性を阻害することが、発病の抑制に重要であることが示された。しかし、オボマクログロブリンを感染実験開始時に添加しただけでは完全な抑制には至らなかった。このことは、感染時の*V.alginolyticus*の増殖にともなつて産生量が増大し活性が上昇するプロテアーゼに対して、十分なオボマクログロブリンのプロテアーゼ阻害効果が得られず、発病の抑制につながらなかつたと考えられた。つまり、細菌の増殖を抑制して、かつ、プロテアーゼ活性も低く抑えることが重要であると考えられ、増殖抑制細菌の添加により発病が抑制されたことから、細菌の増殖が発病における必須な要件であることが示された。

二枚貝幼生飼育においてタンパク質あるいは細菌の海水中への添加はこれまで一般的に行われていない。特にタンパク質の添加は海水中の細菌叢への栄養添加の意味を持ち、飼育環境の急激な変化をもたらし、飼育生物へのストレスや病原細菌の増加をもたらすことが懸念される。しかし、本研究で用いた、タンパク質である3種のプロテアーゼ阻害剤の飼育環境への添加はマガキ幼生に対して全く影響を与えなかつた。特にオボグロブリンにおいては*V.alginolyticus*のプロテアーゼを抑制し、その病原性発現を

抑制した。また、本研究で分離した海洋細菌であるS21株の添加においてもマガキ幼生への影響は認められず、*V.alginolyticus*の増殖抑制によってビブリオ病の発病を抑制した。これらのことから有効な作用を持った機能タンパク質もしくは海洋細菌の飼育水への添加は有効な飼育効率の向上手法となり得ることが示された。

これまでの魚介類の種苗生産現場ではなるべく飼育水の細菌を減らす努力がなされてきた。しかし、近年細菌叢を安定化させ、飼育生物に適した細菌を含んだ飼育環境を作り出す、すなわち細菌叢を意識した「水づくり」という考えが取り入れられ始めている（前田1991）。この水づくりでは人為的に細菌叢を安定化させる、すなわち病原細菌の顕在化などの飼育環境の急激な変化を防ぐことがもっとも重要となる。水産における生物学的防除法はその水づくりの1つであり、本研究ではマガキ幼生飼育水へ病原細菌に対して増殖制御効果を有する細菌を添加することにより、感染実験系でのビブリオ病の発病を抑制できた。

これまでに魚病細菌の増殖抑制を指標として抗生物質を産生する海洋細菌が検索され、数多くの海洋細菌が分離されている（Anderson *et al.*1974, Sakata *et al.*,1982, Lemos *et al.*1985）。また、抗生物質産生細菌添加によるビブリオ病抑制のための生物学的防除法も検討されている

（Westerdahl *et al.*,1991, Riquelme *et al.*,1997, Gibson *et al.*,1998）。しかしこれらの抗生物質産生細菌を生物学的防除法に適用する場合、薬剤投与と同様に耐性菌出現の問題が発生する。そこで本研究ではビブリオ増殖抑制細菌の検索方法として抗生物質産生だけではなく位置競合によるビブリオ増殖抑制効果を検討できるNogami and Maeda (1992)の方法を用いた。本研究で分離したS21株がどちらの増殖抑制メカニズムによってビブリオ属細菌を抑制したかは明らかではないが、生物学的防除には位置競合による病原菌の増殖抑制を示す細菌を用いる方がよいと考えられ、位置競

合による増殖抑制のみを指標とした増殖抑制細菌の分離手法の開発が望まれる。

生物学的防除法に用いる添加細菌が有する、病原細菌に対する増殖抑制効果以外の有効な性状としては、病原因子に対しての抑制物質の産生能が挙げられる。すなわち今回明らかにした病原因子であるプロテアーゼを制御できるプロテアーゼ阻害剤を産生する細菌の添加は病原性抑制の可能性が期待できる。さらに添加する細菌の性状として、幼生への餌料としての効果や餌料微生物の増殖促進効果を付加できれば幼生飼育における総合的な種苗生産効率の向上が期待できる。

本研究の結果、マガキ幼生ビブリオ病において発病メカニズムに基づいた発病抑制方法、すなわち病原性発現に関与する病原細菌の産生するプロテアーゼ活性の抑制を目的とするオボマクログロブリンの幼生飼育水への投与、また、発病の重要な要因である病原細菌の増殖を増殖抑制細菌によって抑制する生物学的防除法という2つの手法の有効性が示された。

# ビブリオ病発病抑制方法

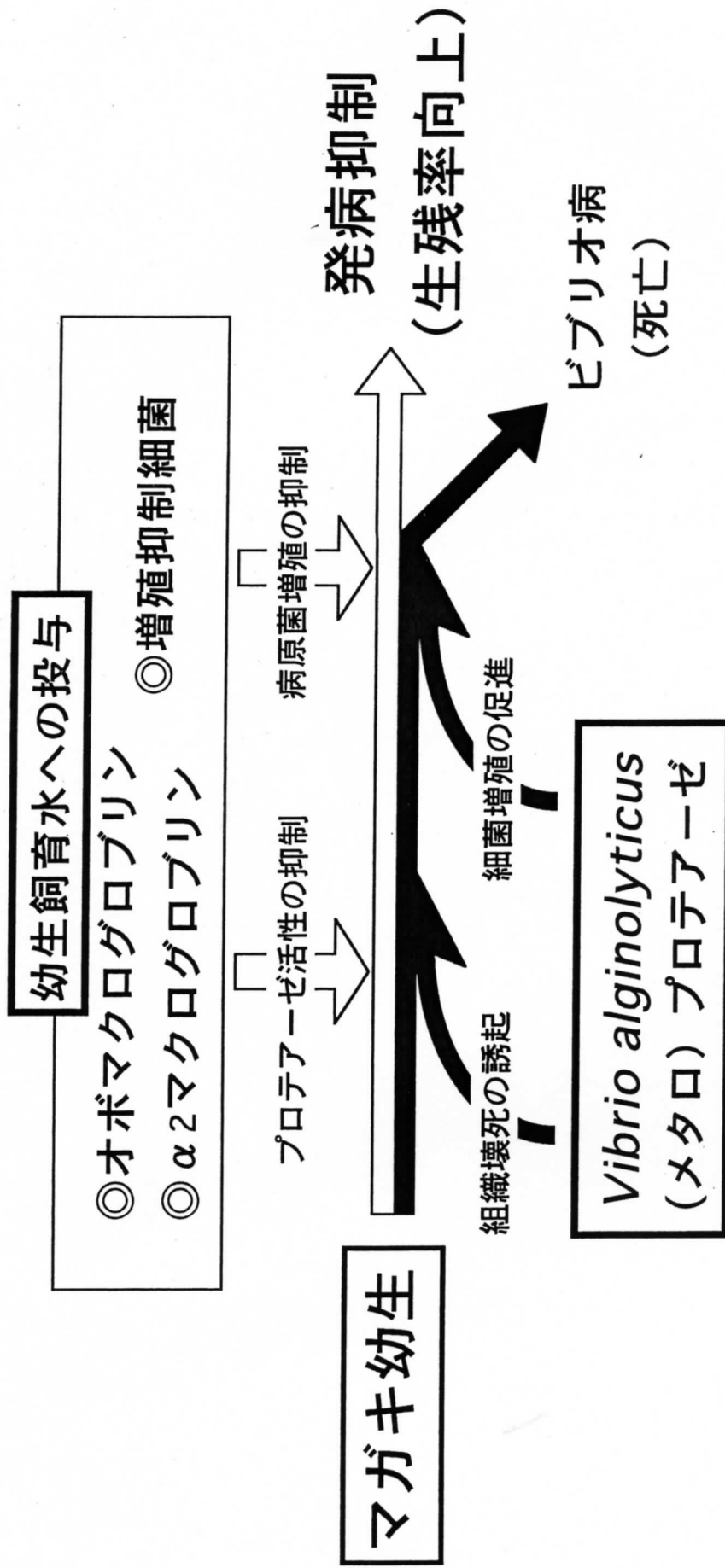


Fig.29 マガキ幼生に対する *Vibrio alginolyticus* の病原性発現の制御 (まとめ)