

RT-PCR によるブリからの *Photobacterium damsela* の検出

松岡 学*・廣瀬 恵子**・惣明 陸枝**
西澤 豊彦**・室賀 清邦**

広島大学生物生産学部, 東広島市 739

1997年10月31日 受付

要旨 魚類病原細菌 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* および *Ph. damsela* subsp. *piscicida* を検出するために、本菌の 16S rRNA における種特異的塩基配列の解析に基づき RT-PCR 法を考案した。まず、魚介類病原菌を中心とした12種のビブリオ属細菌を用いて本 RT-PCR の特異性を確認し、また検査魚の脾臓磨砕液をトリプトソヤ・ブロスで前培養後 RT-PCR に供することにより検出感度が高まることが分かった。この方法を用いることにより、外見的に健康な養殖ブリ *Seriola quinqueradiata* およびウマヅラハギ *Thamnaconus modestus* やマアジ *Trachurus japonicus* など数種の天然魚に *Ph. damsela* が存在することが明らかにされた。

緒 言

類結節症は、わが国のブリ (*Seriola quinqueradiata*) 養殖において最も深刻な被害をもたらす細菌性疾病の一つである。本症は、1968年に最初の発生が愛媛県下のブリ養殖場で確認され、その1, 2年後には西日本一帯のブリ養殖場において流行した。本症の原因菌は楠田・山岡(1972)により *Pasteurella piscicida* と同定された。最近 GAUTHIER *et al.* (1995) は 16S rRNA 塩基配列および DNA の相同性を調べ、本菌が *Photobacterium damsela* と遺伝学的に同種であることを明らかにし、*Pa. piscicida* を *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* と呼ぶことを提案している。彼らの提案は妥当なものであると考えられ、本論文では彼らに従い *Ph. damsela* を *Ph. damsela* subsp. *damsela*, *Pa. piscicida* を *Ph. damsela* subsp. *piscicida* として扱うことにする。

Ph. damsela subsp. *piscicida* 感染症は現在までにブリだけではなく、マダイ *Pagrus major*, クロダイ *Acanthopagrus schlegeli*, キジハタ *Epinephelus akaara*, シマアジ *Pseudocaranx dentex*, イソギンポ *Pictiblenius yatabei*, アユ *Plecoglossus altivelis* などからも報告されている (MUROGA *et al.*, 1977; 安永ら, 1983; 植木ら, 1990; 松岡ら, 1990; 浜口ら, 1991; NAKAI *et al.*, 1992)。しかし、これらの魚種のうち、クロダイやアユではブリにおける本症の特徴である脾臓や腎臓に形成される結節様の白点が認められず、類結節症と呼ぶのは適当ではないように思われる。また、1988年には伊予灘海域で本症による天然ウマヅラハギ *Thamnaconus modestus* の大量死も観察されている (松岡・室賀, 1993)。

本症の対策として、抗生物質や合成抗菌剤の経口投与が行われており、アンピシリンやフロルフェニコールなど様々な薬剤が使用されてきた。しかし、いずれの薬剤に対しても耐性菌株が出現し、本症による被害は減少してはいない (松岡・室賀, 1993)。また、本症に対する予防免疫も研究されてはいるが (KUSUDA and SALATI, 1993)、有効な予防法は未だ開発されていない。MAGARINOS *et al.* (1994) は本菌の海水中および底泥中における生残性について検討しているが、わが国では本菌の生態に関する研究はほとんどなされていない。そのような研究を実施するには対象となる細菌の有効な検出法を確立する必要がある。近年、医学など多くの分野において、病原微生物の同定や検出を目的として polymerase chain reaction (PCR) などの分子生物学的手法が取り入れられており、魚病研究の分野においても *Flexibacter maritimus* (TOYAMA *et al.*, 1996) や *Piscirickettsia salmonis* (MAUEL *et al.*, 1996) の同定や検出に使用しうることが報告されている。

* 愛媛県魚病指導センター, 宇和島市坂下津 798 (現愛媛県水産局水産課)

Aoki *et al.* (1995) は *Ph. damsela* subsp. *piscicida* の染色体 DNA における種特異的塩基配列を標的にした PCR 法を報告している。本研究では、*Ph. damsela* 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を基に本種に特異的な塩基配列を検索し、本菌検出用の PCR システムを作成し、その特異性および検出感度について検討した。さらに、本法を用いて養殖魚や天然魚から実際に *Ph. damsela* の検出を行い、その生態の一端について検討を行った。

材料および方法

プライマー

Ph. damsela (= *Ph. damsela* subsp. *damsela*) を含む *Photobacterium* 属細菌 6 種、*Vibrio* 属細菌 39 種、および *Aeromonas* 属細菌 11 種の計 56 種の 16S rRNA 遺伝子データ解析用プログラム Dnasis および Genetix を用いて長さ 20~23 塩基で GC:40~60% の PCR プライマーに適した配列を選び出し、上流プライマーとして K-F1 (5'-CGAGCGGCAGCGACTTAAC-3') を作製した。下流プライマー R-GEN (5'-GATTACCAGGGTATCTAATC-3') は *Vibrio* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子の保存領域から選出された配列で (GENMOTO *et al.*, 1996)、塩基配列番号 (nt) 786~805 に相補的な配列を有する。なお、上記のプライマーはどれも 20 pmol/ μ l に調整し、使用するまで -20℃ で保存した。

供試菌株

本研究では、*Ph. damsela* subsp. *piscicida* (SP 91142)、*Ph. phosphoreum* (HUF9311)、*Ph. damsela* subsp. *damsela* (ATCC 33539^T)、*Vibrio anguillarum* (HUF95001^T)、*V. fischeri* (ATCC 7744^T)、*V. mediterranei* (ATCC 43341^T)、*V. natriegens* (ATCC 14048^T)、*V. ordalii* (ATCC 33509^T)、*V. alginolyticus*、*V. campbellii*、*V. carchariae*、*V. parahaemolyticus*、*V. pelagius*、*V. proteolyticus* および *V. tubiashii* を PCR の特異性の検討に供した。*Ph. damsela* subsp. *piscicida*、*Ph. damsela* subsp. *damsela*、*V. anguillarum*、*V. fischeri*、*V. mediterranei*、*V. natriegens* および *V. ordalii* は 25℃ で、その他の菌は 20℃ でそれぞれ 2% NaCl トリプトソージャブイオン (2TSB) を用いて OD 600=0.7 となるまで 12~18 時間振盪培養し、対数増殖期に達した細菌を実験に用いた。

核酸抽出および PCR

試料 (培養菌体、脾臓ホモジネート、もしくはそれを培養して得た菌体) に終濃度が各々 0.5 mg/ml および 0.5% (w/v) となるようプロテイナーゼ K および Tween 20 を添加し 37℃ で 10 分間処理した。さらに TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 飽和フェノールで 2 回、クロロフォルム・イソアミルアルコール (24:1) 混液で 1 回核酸抽出を行った後、水層を回収し、90℃・5 分間熱変性後急冷させ PCR に供した。

抽出核酸を 1 mM dNTP, 5 mM MgCl₂, 25U M-MLV 逆転写酵素 (USB), 10U リボスクレアーゼ阻害剤 (Toyobo) および 1.0 μ M R-GEN プライマーを含む PCR 反応液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl) 中で 42℃・30 分間反応させ、標的遺伝子に対する cDNA を合成した。さらに 99℃ で 10 分間処理した後、2 mM MgCl₂, 2.5U AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer), 0.2 μ M R-GEN および K-F1 プライマーを含む PCR 反応液中で、72℃・10 分間および 95℃・2 分間反応させた後、95℃・1 分間、62℃・1 分間および 72℃・1 分間の反応を 35 サイクル、さらに 72℃・5 分間の反応により標的遺伝子を増幅した。

PCR 産物は 1.5% アガロースゲル-TAE (400 mM Tris-酢酸, pH 8.0, 1 mM EDTA) で電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、UV-トランスイルミネーターで観察した。分子量マーカーとして ϕ X 174/Hae III (New England Biolabs) を用いた。

人為感染魚からの *Ph. damsela* の検出

魚体通過させた *Ph. damsela* subsp. *piscicida* (SP91142 株) を 2% NaCl トリプトソージャ寒天培地 (2 TSA) で培養後 PBS に懸濁したものを 20 l の海水に添加し、これに 80 尾 (平均体重 11.1 g) のブリを収容し、エアレーションしながら 5 分間浸漬攻撃した。この時の攻撃菌濃度は 2.3×10^3 CFU/ml、水温は 24.2℃ であった。攻撃後、ブリを 2 つの流水水槽 (54 l) に 30 尾と 50 尾に分けて収容し、エアレーションしながら 10 日間飼育した (水温 24.3~24.6℃)。30 尾飼育区では発病および死亡経過を観察し、50 尾飼育区では、攻撃の翌日から 3 日間にわたり毎日 10 尾ずつ採取し、無菌的に脾臓を摘出後 PBS を加えて磨砕した後、2 TSA

を用いた菌分離および RT-PCR による菌の検出に供した。

養殖魚および天然魚からの *Ph. damsela* の検出

養殖魚としては1996年7月に愛媛県宇和海内に位置する遊子、下波、および宇和島の計3か所の養殖生け簀より採取した外観上健康なブリ0歳魚を実験に供した。なお、採取時にはそれらの生け簀周辺で既に類結節症の発生が確認されていた。供試魚の脾臓を無菌的に摘出し滅菌 PBS を加えて磨砕した後、100 μ l ずつを 2TSA を用いた菌分離、直接 RT-PCR による菌の検出、および以下に示す増菌 RT-PCR に、それぞれ供した。増菌 RT-PCR では、脾臓磨砕液を 2TSB 5 ml に接種し25°Cで24時間振盪培養した後、遠心分離 (7,000 \times g, 10 分間) により得た残渣から核酸を抽出し RT-PCR を行った。

天然魚としては、1996年5月に宇和海で養殖用種苗として採捕された直後のブリ稚魚および混獲されたウマヅラハギと伊予灘で同年4月、5月および7月に採捕されたウマヅラハギ、カワハギ *Stephanolepis cirrhifer*、マアジ *Trachurus japonicus*、ブリ、マダイ、スズキ *Lateolabrax japonicus*、マトウダイ *Zeus faber*、およびマサバ *Scomber japonicus* を採捕直後に氷冷して持ち帰り検査に供した。魚体重 2 g 以下の天然魚は全魚体を、また 2 g 以上の天然魚については脾臓のみを摘出した後、PBS を加えて磨砕し増菌 RT-PCR に供した。なお、一部の試料は 2TSB で増菌後 RT-PCR に供するまで-80°Cで凍結保存した。

結 果

Ph. damsela 16S rRNA 遺伝子を標的とした RT-PCR

Ph. damsela subsp. *damsela*, *Ph. damsela* subsp. *piscicida*, *Ph. phosphoreum* および12種の *Vibrio* 属細菌からの抽出核酸をプライマー K-F1 および R-GEN を用いた RT-PCR に供し、アガロース電気泳動した結果を Fig. 1 に示した。*Ph. damsela* 両亜種の抽出核酸からは標的遺伝子の大きさに相当する約 750 bps の増幅産物が得られたが、他の細菌の抽出核酸からは増幅産物は得られなかった。

Table 1 Detection of *Photobacterium damsela* (*Ph. damsela* subsp. *piscicida*) from experimentally infected yellowtail by RT-PCR and bacterial isolation

Fish No.	Results of detection of <i>Ph. damsela</i>					
	Days after challenge ^{*1}					
	1 day		2 days		3 days	
Isolation ^{*2}	RT-PCR	Isolation	RT-PCR	Isolation	RT-PCR	
1	-	+	-	+	+	+
2	-	+	+	+	+	+
3	-	+w ^{*3}	-	+	+	+
4	-	+w	-	+w	-	+w
5	-	+w	-	+w	-	+w
6	-	+w	-	+w	-	+w
7	-	+w	-	+w	-	-
8	-	-	+	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
Cont. ^{*4}	-	-	-	-	-	-

*1 : Fish were immersed in a bacterial suspension of 2.3×10^3 CFU/ml for 5 min.

*2 : Results of isolation of *Ph. damsela* subsp. *piscicida* on 2TSA after 48h at 25°C.

*3 : Weakly positive.

*4 : Negative control.

Ph. damsela 用 RT-PCR の検出限界菌数

Ph. damsela subsp. *piscicida* の培養液の10倍希釈列を作製し、生菌数を求めると同時に各希釈列から抽出した核酸を RT-PCR および PCR に供し、アガロース電気泳動した結果を Fig. 2 に示した。RT-PCR では 10^1 CFU 以上で標的遺伝子の増幅像が確認されたが、PCR では 10^3 CFU 以上でしか増幅像が確認されなかった。

人為感染魚からの *Ph. damsela* の検出

浸漬攻撃後10日間の観察期間中に30尾中1尾のブリが死亡した。なお、その死亡魚からは *Ph. damsela* subsp. *piscicida* が再分離された。また攻撃翌日から3日間にわたり10尾ずつ採取し、菌分離および RT-PCR による菌の検出を行った結果を Table 1 に示した。攻撃1日後には、いずれの魚からも培養法では *Ph. damsela* subsp. *piscicida* は検出されなかったのに対し、RT-PCR 法では陽性と微陽性合わせて7検体から *Ph. damsela* subsp. *piscicida* が検出された。Table 1 に示されたように2日後、3日後においても RT-PCR の検出率は培養法よりも高かった。

養殖ブリからの *Ph. damsela* の検出

類結節症未発生生け簀の養殖ブリ0才魚から菌分離、RT-PCR および増菌 RT-PCR により *Ph. damsela* の検出を試みた結果を Table 2 に示した。何れの地区においても調査時期の早い試料では *Ph. damsela* の検出率が極めて低かったが、7月20日以降になると高率に *Ph. damsela* が検出された。一方、菌分離、RT-PCR および増菌 RT-PCR 間で *Ph. damsela* の検出率を比較すると、菌分離では66検体中1検体のみが陽性であったのに対し、RT-PCR では12検体が、また増菌 RT-PCR では26検体が陽性となった。また、培養法においては多くの雑菌の発育により *Ph. damsela* の存在が確認できない試料もあったが、その様な試料においても PCR あるいは増菌 RT-PCR では陽性を示すものがみられた。

天然魚からの *Ph. damsela* の検出

天然魚からの *Ph. damsela* の検出結果は採捕時期や場所にほとんど関係なかったため、魚種別にまとめて Table 3 に示した。ブリ、ウマヅラハギ、およびマアジからは、いずれも約80%という高い検出率で *Ph. damsela* が検出された。また、マダイやカワハギからも、検査尾数は少なかったものの、*Ph. damsela* 陽性個体が認められた。

Table 2 Detection of *Photobacterium damsela* from cultured juvenile yellowtail by RT-PCR and bacterial isolation

Sampling location	Sampling date (1996)	Number of fish examined	Number of fish positive in		
			bacterial isolation ^{*1}	direct PCR ^{*2}	indirect PCR ^{*3}
Yusu	Jul. 9	8	0	0	0
	Jul. 17	10	0	0	0
	Jul. 26	10	1	7	9
Shitaba	Jul. 10	9	0	0	0
	Jul. 20	9	0	2	5
Uwajima	Jul. 11	10	0	0	2
	Jul. 27	10	0	3	10
Total		66	1	12	26

*1: Bacterial isolation was conducted from spleen on 2TSA by incubating for 48h at 25°C.

*2: Spleen samples were directly submitted to PCR test.

*3: Spleen samples were incubated in 2TSB for 24h at 25°C prior to PCR test.

Table 3 Detection of *Photobacterium damsela* from wild fish by indirect RT-PCR^{*1}

Fish species	Detection rate (%)	(Number of fish positive/examined)
<i>Seriola quinqueradiata</i>	81	(22/27)
<i>Thamnaconus modestus</i>	78	(28/36)
<i>Trachurus japonicus</i>	82	(9/11)
Others ^{*2}	44	(4/9)

^{*1}: Spleen samples were incubated in 2TSB for 24h at 25°C prior to PCR test.

^{*2}: *Pagrus major*, *Lateolabrax japonicus*, *Stephanolepis cirrhifer*, *Zeus faber* and *Scomber japonicus* were included.

考 察

本研究では、ブリの類結節症の原因菌である *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (= *Pasteurella piscicida*) の微量検出を最終目的に、まず 16S rRNA 遺伝子を標的とする PCR 検査法の確立を試みた。*Ph. damsela* subsp. *piscicida* の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列が *Ph. damsela* subsp. *damsela* の 16S rRNA 遺伝子と全く同じであるという報告(GAUTHIER *et al.*, 1995) に基き、*Ph. damsela* に特異的な塩基配列を検索し、上流プライマー K-F1 を合成した。また下流プライマーには、多くの *Vibrio* 属細菌の 16S rRNA に共通した配列を有する R-GEN を用いた (GENMOTO *et al.*, 1996)。K-F1 と類似する塩基配列を有する魚介類関連 *Vibrio* 属細菌12種および *Ph. phosphoreum* の抽出核酸を K-F1 および R-GEN の両プライマーを用いた RT-PCR に供した結果、*Ph. damsela* 両亜種からの抽出核酸からは標的遺伝子領域に相当する約 750 bps の PCR 産物が増幅されたが、その他の細菌の抽出核酸からの増幅産物は認められなかった (Fig. 1)。したがって、両プライマーを用いた PCR は *Ph. damsela* に特異的であることが明らかとなった。

K-F1 および R-GEN の両プライマーを用いた PCR および RT-PCR の検出限界菌数を求めたところ、PCR では 10³CFU 以上、RT-PCR では 10¹CFU 以上で検出可能で、RT-PCR は PCR に比べ100倍高い感度を有することが確かめられた (Fig. 2)。これは、PCR が rDNA のみを標的とするのに対し、RT-PCR は rDNA のみならず細胞当たり10¹コピーも存在すると考えられる rRNA 遺伝子をも標的とするという違いによるものと考えられた。

Ph. damsela subsp. *piscicida* を人為的に感染させたブリでは、まず肝臓および脾臓に本菌が観察されることが報告されている (KAWAHARA *et al.*, 1989)。そこで培養法および RT-PCR による検出率を *Ph. damsela* subsp. *piscicida* で攻撃したブリの脾臓を用いて比較検討した。その結果、培養法では攻撃1日後では菌は全く検出されず、攻撃後2および3日後においても菌が検出された検体は20~30%に過ぎなかった。しかし RT-PCR 法を用いると、攻撃1日後において70%の検体が陽性を示し (Table 1)、*in vivo* 実験において RT-PCR は培養法よりも高感度に *Ph. damsela* subsp. *piscicida* を検出し得ることが示された。環境水中や泥中では *Ph. damsela* subsp. *piscicida* 菌体の多くが培養されない状態にあると報告されている (MAGARINOS *et al.*, 1994)。前述のごとく *in vitro* 実験では本 RT-PCR の検出限界は 10¹CFU であり、培養法による検出感度と同程度であったが、*in vivo* では RT-PCR の感度が培養法を上回ったことから、環境水中や泥中と同様に魚体内においても培養されにくい状態にある *Ph. damsela* subsp. *piscicida* がかなり存在しているのではないかと考えられた。

培養法、RT-PCR および増菌 RT-PCR を用いて外見的に健康な養殖ブリ稚魚から *Ph. damsela* の検出を試みた結果、培養法では66検体中1検体のみが陽性であったが、直接 RT-PCR 法では12検体が陽性となり (Table 2)、RT-PCR の有効性が裏付けられた。さらに増菌 (間接) RT-PCR 法では26検体が陽性となり、前処理として増菌することにより更に感度が向上することが示された。これは寒天培地では増殖しなかった *Ph. damsela* 菌体が液体培地を用いた振盪培養では増殖し、さらに増殖した菌体を遠心分離により濃縮することより感度が高められたものと考えられる。本増菌 RT-PCR を用いて採捕直後の天然ブリ稚魚、混獲されたウマヅラハギ、さらに周辺にブリ養殖施設の存在しない伊予灘で捕獲されたマアジ等の保菌検査

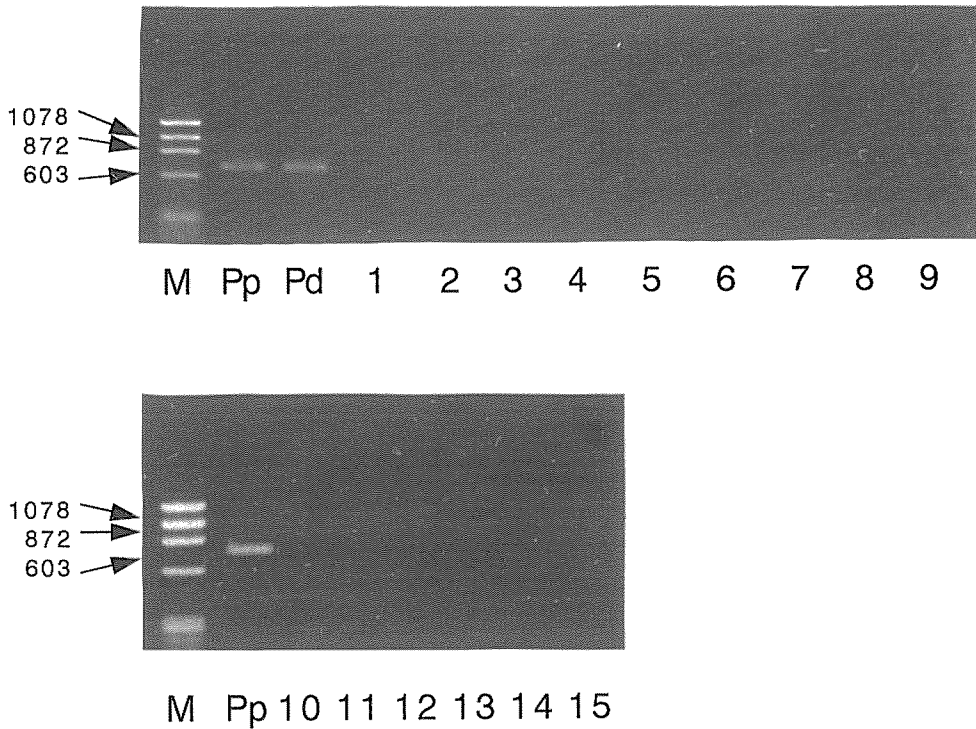


Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the PCR products amplified from nucleic acids of *Photobacterium damsela* and other bacteria.

M: marker (ϕ X174/*Hae* III), Pp: *Ph. damsela* subsp. *piscicida*, Pd: *Ph. damsela* subsp. *damsela*, 1: *Vibrio alginolyticus*, 2: *V. campbellii*, 3: *V. carchariae*, 4: *V. parahaemolyticus*, 5: *V. pelagius*, 6: *V. proteolyticus*, 7: *V. tubiashii*, 8: *Ph. phosphoreum*, 9: Control, 10: *V. ordalii*, 11: *V. natriegens*, 12: *V. mediterranei*, 13: *V. fischeri*, 14: *V. anguillarum*, 15: Control.

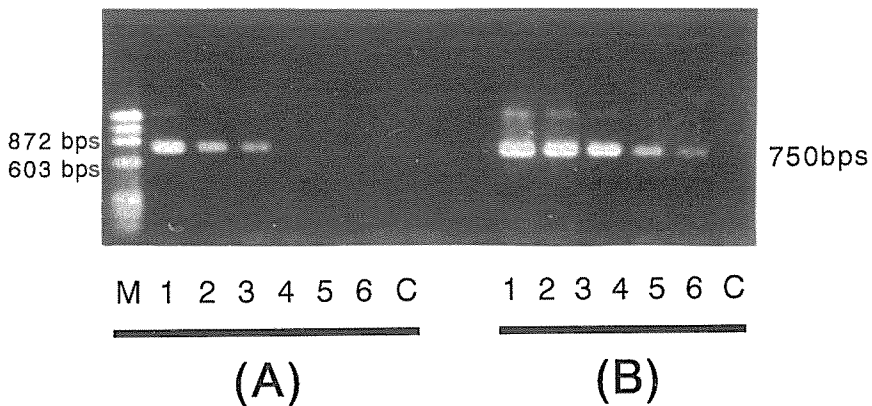


Fig. 2 Detection limit of bacterial number (CFU) of *Photobacterium damsela* (*Ph. damsela* subsp. *piscicida*) by PCR and RT-PCR with primers K-F1 and R-GEN.

A: PCR, B: RT-PCR, M: marker (ϕ X174/*Hae* III), 1: 10^5 CFU, 2: 10^4 CFU, 3: 10^3 CFU, 4: 10^2 CFU, 5: 10^1 CFU, 6: 10^0 CFU.

を行った結果、本菌が高率に検出され (Table 3), *Ph. damsela* 保菌魚が天然魚にも広く分布している可能性が示唆された。現在までのところわが国ではブリ病魚からの *Ph. damsela* subsp. *damsela* の報告例は一例しかないが (SAKATA *et al.*, 1989), 本 RT-PCR は *Ph. damsela* subsp. *piscicida* のみならず *Ph. damsela* subsp. *damsela* をも検出しうるという点が問題として残る。すなわち、今回外見的健康魚に *Ph. damsela* が存在することが明らかになったが、それらが類結節症の原因となる *Ph. damsela* subsp. *piscicida* なのか、それともわが国ではほとんど問題となったことのない *Ph. damsela* subsp. *damsela* であるかは不明である。先に触れた *Ph. damsela* subsp. *piscicida* 染色体 DNA の PCR 法 (AOKI *et al.*, 1995) においても両亜種は区別できないことが最近報告され、*Ph. damsela* subsp. *piscicida* の保有する亜種特異的プラスミドを標的とした PCR 法が提案されている (AOKI *et al.*, 1997)。

謝 辞

本研究の遂行にあたり試料の提供を戴いた遊子漁協堀田利明氏および宇和島漁協鈴木幸吉氏に深謝いたします。

文 献

- AOKI, T., I. HIRONO and A. HAYASHI, 1995, The fish-pathogenic bacterium *Pasteurella piscicida* detected by the polymerase chain reaction (PCR). In "Diseases in Asian aquaculture II" (ed. by M. SHARIFF, J. R. ARTHUR and R. P. SUBASINGHE). Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, pp. 347-353.
- AOKI, T., D. IKEDA, T. KATAGIRI and I. HIRONO, 1997, Rapid detection of the fish-pathogenic bacterium *Pasteurella piscicida* by polymerase chain reaction targetting nucleotide sequence of the species-specific plasmid pZP1, *Fish Pathol.*, **32**, 143-151.
- GAUTHIER, G., B. LAFAY, R. RUIMY, V. BREITTMAYER, J. L. NICOLAS, M. GAUTHIER and R. CHRISTEN, 1995, Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (SNIESZKO *et al.*) JANSSEN and SURGALLA to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 139-144.
- GENMOTO, K., T. NISHIZAWA, T. NAKAI and K. MUROGA, 1996, 16S rRNA targeted RT-PCR for the detection of *Vibrio penaeicida*, the pathogen of cultured kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Dis. Aquat. Org.*, **24**, 185-189.
- 浜口昌巳・薄浩則・楠田理一, 1991, イソギンポに発生した *Pasteurella piscicida* 感染症. 魚病研究, **26**, 93-94.
- KAWAHARA, E., K. KAWAI and R. KUSUDA, 1989, Invasion of *Pasteurella piscicida* in tissues of experimentally infected yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 499-501.
- KUSUDA, R. and F. SALATI, 1993, Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **3**, 69-85.
- 楠田理一・山岡政典, 1972, 養殖ハマチの細菌性類結節症の原因菌に関する研究 - I. 形態学的ならびに生化学的性状による種の同定. 日水誌, **38**, 1325-1332.
- 松岡 学・室賀清邦, 1993, 愛媛県下の養殖海産魚における細菌性疾病発生の歴史 (1966~1992年). 広島大学生物生産学部紀要, **32**, 109-118.
- 松岡 学・和田有二・河本 泉・内藤 馨・土居静雄, 1990, アユ稚魚の *Pasteurella piscicida* 感染症. 魚病研究, **25**, 253-254.
- MAGARINOS, B., J. L. ROMALDE, J. L. BARJA and A. E. TORANZO, 1994, Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 180-186.
- MAUEL, M. J., S. J. GIOVANNONI and J. L. FRYER, 1996, Development of polymerase chain reaction assays for detection, identification, and differentiation of *Piscirickettsia salmonis*. *Dis. Aquat. Org.*,

- 26, 189-195.
- MUROGA, K., T. SUGIYAMA and N. UEKI, 1977, Pasteurellosis in cultured black seabream (*Mylio macrocephalus*). *J. Fac. Fish. Anim. Husb., Hiroshima Univ.*, **16**, 17-21.
- NAKAI, T., N. FUJIE, K. MUROGA, M. ARIMOTO, Y. MIZUTA and S. MATSUOKA, 1992, *Pasteurella piscicida* infection in hatchery-reared juvenile striped jack. *Fish Pathol.*, **27**, 103-108.
- SAKATA, T., M. MATSUURA and Y. SHIMOKAWA, 1989, Characteristics of *Vibrio damsela* isolated from diseased yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 135-141.
- TOYAMA, T., K. KITA-TSUKAMOTO and H. WAKABAYASHI, 1996, Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. *Fish Pathol.*, **31**, 25-31.
- 植木範行・萱野泰久・室賀清邦, 1990, キジハタ稚魚に発生した *Pasteurella piscicida* 感染症. 魚病研究, **25**, 43-44.
- 安永統男・畑井喜司雄・塚原淳一郎, 1983, 養殖マダイから分離された *Pasteurella piscicida* について. 魚病研究, **18**, 107-110.

Detection of *Photobacterium damsela* from Yellowtail by RT-PCR

Satoru MATSUOKA*, Keiko HIROSE, Yoshie SOUMYO,
Toyohiko NISHIZAWA and Kiyokuni MUROGA

*Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University,
Kagamiyama, Higashihiroshima 739, Japan*

An RT-PCR detection technique was developed for *Photobacterium damsela* (= *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* and *Ph. damsela* subsp. *piscicida*) from apparently healthy yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) and other wild fishes, based on the analysis of a species-specific sequence in 16S rRNA of *Ph. damsela*. Specificity of the RT-PCR with K-F1 (sense primer) and R-GEN (antisense primer) was confirmed by using *Ph. damsela* subsp. *damsela* and *Ph. damsela* subsp. *piscicida*, 12 strains of fish-associated *Vibrio* species. Sensitivity of the RT-PCR was improved by combining a pre-culture of the sample (spleen homogenate) with tryptic soy broth (NaCl 2%). This RT-PCR revealed the presence of *Ph. damsela* from wild yellowtail, filefish (*Thamnaconus modestus*) and horse mackerel (*Trachurus japonicus*) caught in the sea as well as apparently healthy cultured yellowtail.

Key words: *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Pasteurella piscicida*, PCR, rRNA, carrier

* Ehime Prefectural Fish Disease Control Center, Sakashizu, Uwajima 798, Japan