

Aeromonas salmonicida のプロテアーゼ非産生株の病原性について

誌名	北海道大學水産學部研究彙報 = Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University
ISSN	00183458
著者	田島, 研一 絵面, 良男 木村, 喬久
巻/号	38巻2号
掲載ページ	p. 139-150
発行年月	1987年5月

Aeromonas salmonicida のプロテアーゼ非産生株の病原性について

田島 研一*・絵面 良男*・木村 喬久*

Pathogenicity of a Non-protease Secreting Strain
of *Aeromonas salmonicida*

Kenichi TAJIMA*, Yoshio EZURA*
and Takahisa KIMURA*

Abstract

Previously, in a series of studies we reported that there is a positive correlation between extracellular protease of *Aeromonas salmonicida* and furunculosis of fish. Although most of the strains of *Aeromonas salmonicida* produce extracellular protease, we found a non-protease secreting strain of *Aeromonas salmonicida* which also caused furunculosis. In the present paper we discussed the pathogenicity and toxicity of a non-protease secreting strain of *Aeromonas salmonicida* Ar-57.

The results obtained are summarized as follows:

1. Toxicity of the culture supernatant of this strain was not detected in goldfish.
2. The death of goldfish was not observed after inoculation with the ammonium sulfate (85% saturation) precipitated protein from the culture supernatant.
3. In the case of inoculation with formalin-killed cells, some goldfish died in the early phases of post-inoculation.
4. Toxicity of the cell suspension ruptured by French press was similar to that which was inoculated with formalin-killed cells. The supernatant of the ruptured cell suspension obtained by high-speed centrifugation had no effect on goldfish, whereas inoculation with precipitants obtained from any centrifugation have shown similar signs of toxicity such as those caused by formalin-killed and ruptured cells. But precipitants obtained from high-speed centrifugation had higher toxicity than that obtained from low-speed centrifugation.
5. Toxicity was not observed with suspension of spheroplasts (30 mg/fish) of strain Ar-57 even with a high dosage.

In conclusion, it can be reasonably assumed that pathogenicity or toxicity of the strain Ar-57 was caused by some components of the cell surface or the cell wall itself.

緒 言

前報 (田島ら, 1983a, b, 1984) までに *A. salmonicida* の産生するプロテアーゼと本菌感染によるせうそう病におけるその起病因子としての関連性について検討を行い, 肯定的な結果を得たことを報告してきた。ところで, *A. salmonicida* にはプロテアーゼ非産生株も存在し, 本菌によるプロテアーゼの関与しない発症にも興味を持たれるところから, 本報ではこのプロテアーゼ非産生株の起病因子について検討を行ったので報告する。

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

実 験 方 法

1. 供試菌

当講座に保存されている *A. salmonicida* 中、プロテアーゼの産生が定性的にも、定量的にも全く認められなかった Ar-57 株を本実験に供試した。

2. 供試魚及び飼育法

供試魚は、奈良県大和郡山市の金魚農場から購入した体重約 14.4 g, 体長約 9.2 cm の金魚を用いた。供試魚の飼育は前報 (1983b) と同様に実施した。

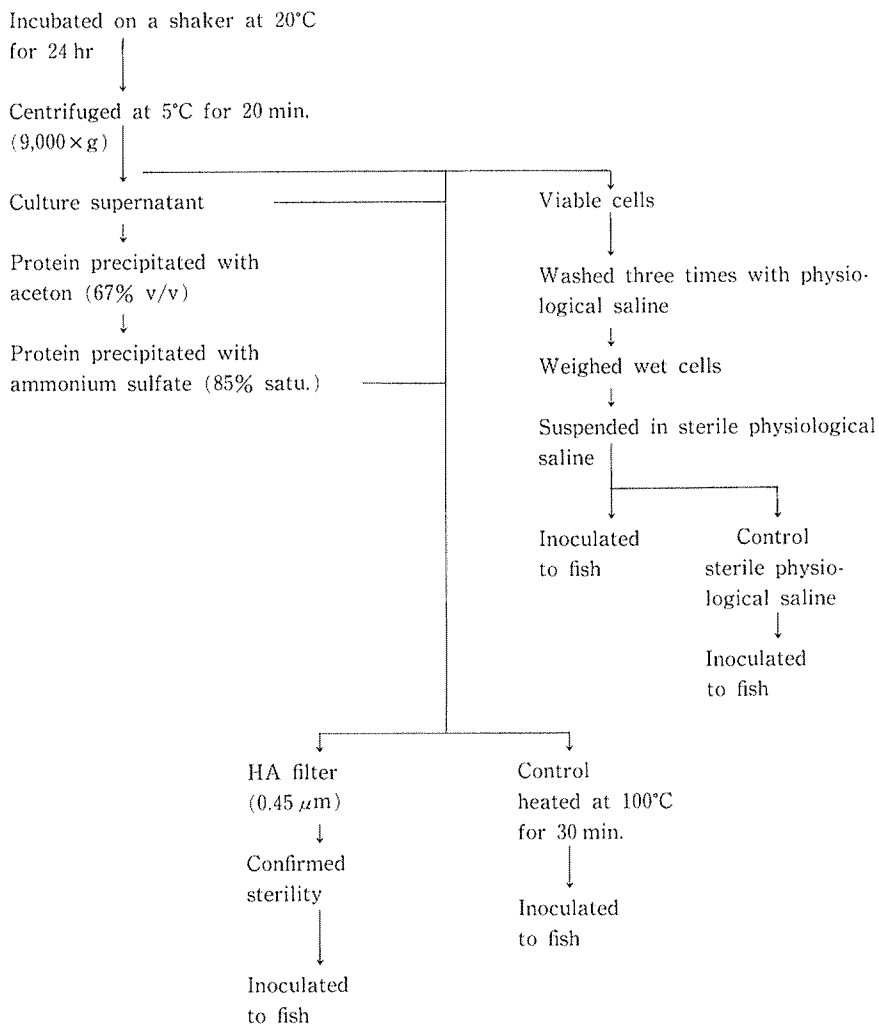


Fig. 1. Preparation of samples of *A. salmonicida* Ar-57 for pathogenicity and toxicity tests

3. プロテアーゼ活性の測定法

プロテアーゼの測定は前報 (1983a) と同様の方法で行った。

4. 蛋白質濃度測定法

蛋白質濃度の測定は前報 (1983a) と同様の方法で行った。

5. 病原性または毒性試験用各試料の調製法

1) 供試菌 (生菌) 懸濁液, 培養上清及び硫酸分画蛋白質溶液の調製法

調製法は Fig. 1 に示した。供試菌 *A. salmonicida* Ar-57 の生菌懸濁液は, プイヨン培地で 20°C, 24 時間振盪培養後, 遠心分離 (5°C, 20 min, 9,000×g) により集菌し, 菌体を滅菌生理的食塩水で 3 回洗浄後, 菌体湿重量を測定して一定濃度になるように滅菌生理的食塩水に再懸濁して調製した。

また培養上清液は前述の遠心分離後原液を, 硫酸分画蛋白質溶液は前報 (田島ら, 1983b) 同様調製後, 蛋白質濃度を一定にしたものをそれぞれ Milipore filter (HA type) を通し, この濾液を普通寒天培地に塗抹して無菌であることを確認した後に供試した。

2) ホルマリン死菌及び加熱死菌の調製法

調製法は Fig. 2 に示した。洗浄菌体を滅菌生理的食塩水に懸濁するまでの調製は 1) と同様である。ホルマリン死菌についてはその後 0.3% の割合にホルマリンを添加し, 一夜放置後, 平板塗抹により生菌の存在しないことを確認して供試した。加熱死菌は, 菌体懸濁液を 100°C, 30 分加熱したものを供試した。

3) 細胞破壊懸濁液, 細胞破壊上清液及び破壊細胞 fragments の調製法

調製法は Fig. 3 に示した。菌体懸濁液の調製は 1) と同様である。細胞破壊懸濁液の調製はこの

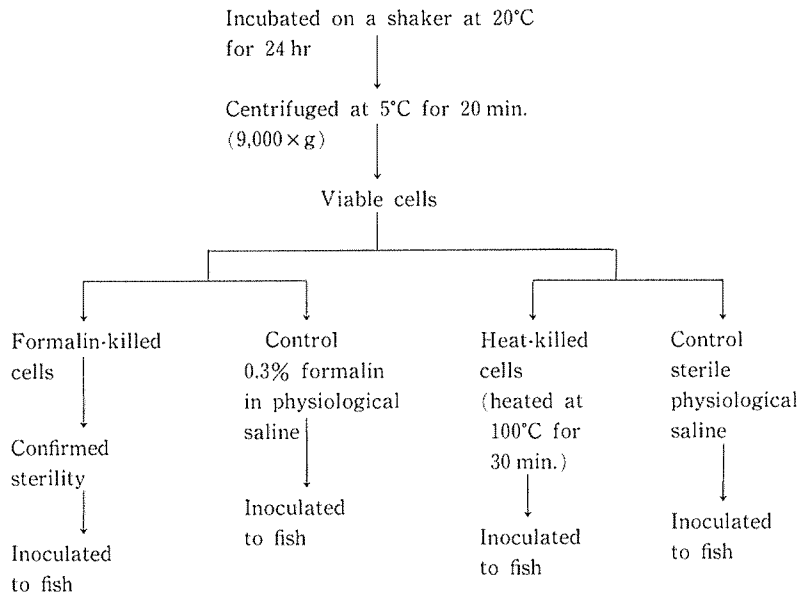


Fig. 2. Preparations of formalin-killed cells and heat-killed cells of *A. salmonicida* Ar-57

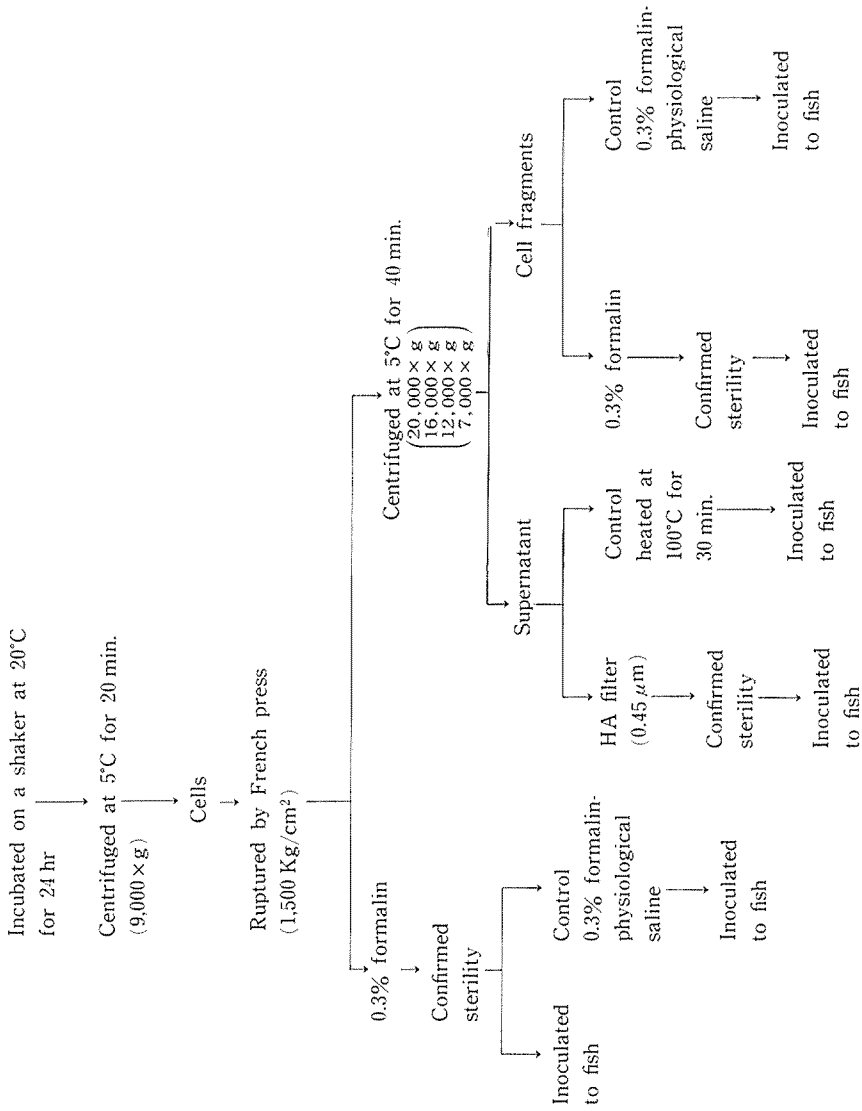


Fig. 3. Preparations of cell suspension, cell free suspension and cell fragments of *A. salmonicida* AT-57 ruptured by French press

菌体懸濁液についてフレンチプレス (1,500 kg/cm²) で菌体を破壊した後、0.3%の割合にホルマリンを添加し、一夜放置した後、生菌の存在しないことを確認して供試した。細胞破壊上清液はフレンチプレスで菌体を破壊した後、種々の回転数で遠心分離 (20,000×g, 16,000×g, 12,000×g 及び 7,000×g) し、得られた上清について Millipore filter (HA type) を通し、平板塗抹により無菌であることを確認した後供試した。破壊細胞 fragments は前述の上清を得た時のそれぞれの沈澱物でこれを一定濃度になるように滅菌生理的食塩水に再懸濁し、0.3%の割合にホルマリンを添加し、生菌の存在しないことを確認した後供試した。

6. 供試菌の spheroplasts 調製法

spheroplasts 調製に当っては大工・坂井 (1976) の報告を参照して、Table 1 に示す培地、すなわちブイヨン培地に細胞壁合成阻害剤としてペニシリン G カリウム 1,600 IU/ml, pH 調製のために Tris (hydroxymethyl) aminomethane 50 mM 及び形成される spheroplasts の浸透圧を調製するため、MgCl₂ 及び sucrose をそれぞれ 0.1 M, 2.5% の割合に添加した。この培地に供試菌を接種し、20°C で振盪培養を行い、経時的に spheroplasts の形成状態を顕微鏡下で観察すると共に、培養液の一部をもって濁度 (O.D. 610 nm) の変化を測定した。なお spheroplasts 懸濁液の調製法は Fig.

Table 1. Medium for forming spheroplasts of *A. salmonicida* Ar-57.

Meat extract	0.5%
Polypeptone	1.0%
NaCl	0.2%
Tris(hydroxymethyl)-aminomethane	50 mM
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.1 M
Sucrose	2.5%
Penicillin G-K	1,600 IU/ml
Dist. water	1,000 l

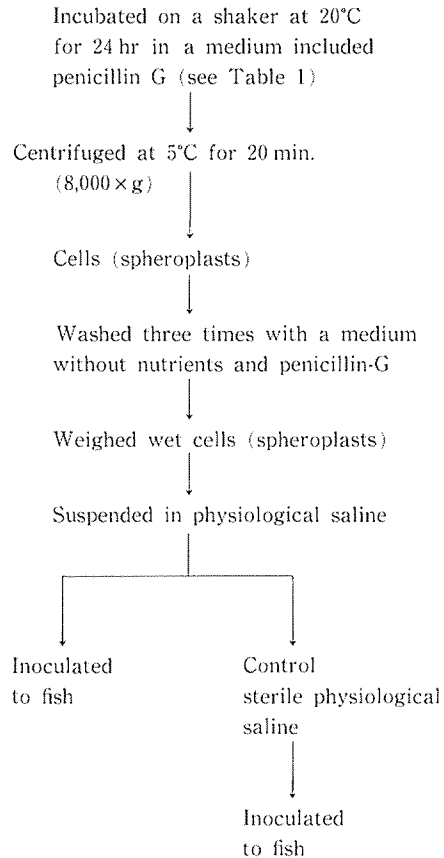


Fig. 4. Preparation of spheroplast suspension of *A. salmonicida* Ar-57

4 に示した。前述のペニシリン添加培地 (Table 1) で供試菌を 20°C, 24 時間振盪培養後, 遠心分離 (5°C, 20 min, 8,000×g) し, 集菌後, ペニシリン添加培地から meat extract, polypeptone 及び penicillin G を除いた組成の溶液を用いて菌体を 3 回洗浄した。洗浄後, 菌体湿重量を測定して一定濃度になるように滅菌生理的食塩水に懸濁して調製した。

7. 各試料の接種法及び観察法

各試料の接種方法は前報 (1983b) における金魚と同様の方法で行った。また観察法は観察期間を 10 日間とした他は前報 (1983b) と同様である。

結 果

1. 供試菌生菌の病原性

供試菌 Ar-57 株の病原性の検討結果は Table 2 に示した。接種菌量は前報 (1983b) での結果を考慮して 1 尾当り菌体湿重量にして 3 mg (193 mg/kg) 接種した。菌接種魚は接種部付近に立鱗, 膨隆等の症状が観察され, 2 日目, 8 日目及び 9 日目にそれぞれ 1 尾ずつ斃死した。斃死魚は筋肉融解及び筋肉内出血等の症状がみられた他, 皮膚の崩壊, 脱鱗等の症状も観察された。10 日間飼育後の生残魚についても解剖した結果, 同様の所見がみられた。なお, 斃死魚の菌接種部及び腎臓から接種菌の分離を行った結果, すべての斃死魚から接種菌を優勢に分離し得た。

2. 供試菌培養上清液の毒性

上清液接種による毒性の検討結果は Table 3 に示した。蛋白質相当量にして 447.8 mg/kg 接種した供試魚では 10 日間観察期間中, 何らの症状も認められなかった。また 10 日間観察後, 解剖した所見からも何ら異状も認められなかった。

3. 培養上清液硫安分画蛋白質画分の毒性

硫安分画蛋白質画分の毒性の検討結果は, Table 4 に示した。前述の方法により調製した蛋白質画分を蛋白質相当量にして 87.7 mg/kg 接種した供試魚は, 接種後 3 日目頃から接種部付近に膨隆が観察され始め, 5 日目以降には脱鱗するものもみられた。しかし 10 日間の飼育観察中斃死するものはなかった。なお 10 日間飼育後の供試魚の解剖所見ではすべての供試魚において接種部付近

Table 2. Pathogenicity of viable cells of *A. salmonicida* Ar-57 in goldfish

Dose* (mg/kg)	Fish number died**										Signs of dead or survival fish
	Days after inoculation										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
193	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5	0/5	scale loss and protrusion swelling haemorrhage in and liguefaction of muscle
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	none

*: wet cell weight (mg)/fish weight (kg)

** : fish number died/fish number tested

Table 3. Toxicity of culture supernatant of *A. salmonicida* Ar-57 in goldfish

Dose* (mg/kg)	Fish number died**										Signs of dead or survival fish
	Days after inoculation										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
447.8	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	none
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	none

*: protein (mg)/fish weight (kg)

** : fish number died/fish number tested

Table 4. Toxicity of protein obtained by ammonium sulfate precipitation from supernatant in goldfish

Dose* (mg/kg)	Fish number died**										Signs of dead or survival fish
	Days after inoculation										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
87.7	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	swelling scale loss haemorrhage in and liquefaction of muscle
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	none

*: protein (mg)/fish weight (kg)

** : fish number died/fish number tested

の皮下筋肉の融解及び筋肉内出血等の症状がみられた。内臓には何ら異状は認められなかった。

4. ホルマリン死菌及び加熱死菌の毒性

ホルマリン死菌接種による毒性試験の結果は Table 5 に示した。1尾当り菌体湿重量にして 60 mg (4,310 mg/kg) 接種した場合、接種後 1 日目に 3 尾、4 日目に 1 尾斃死した。1 日目に斃死した 3 尾は接種部付近の筋肉融解、筋肉内出血等の症状はみられなかったが、腹腔内、特に心臓付近に出血がみられた。4 日目斃死魚は腹腔内出血の他、接種部付近の立鱗膨隆及び筋肉融解・筋肉内出血等の症状がみられた。10 日間飼育後の生残魚についても 4 日目斃死魚と同様の症状が観察された。30 mg (2,155 mg/kg) 接種では、接種後 1 日目に 4 尾斃死し、1 尾は 10 日間飼育後も生残した。斃死魚、生残魚共にその症状は 60 mg 接種にみられた症状とほぼ同様の症状であった。15 mg (1,078 mg/kg) 接種では、接種後 1 日目に 1 尾斃死した他は 10 日間飼育後も生残した。斃死魚にはやはり腹腔内出血がみられた。生残した 4 尾については接種部付近の脱鱗・膨隆の他筋肉融解のみられるものも観察された。

加熱死菌接種による毒性試験の結果は Table 6 に示した。1尾当り菌体湿重量にして 60 mg (4,172 mg/kg) 接種魚で 2 尾に、30 mg (2,086 mg/kg) 接種魚で 1 尾に接種部付近に僅かに膨隆が

Table 5. Toxicity of formalin-killed cells of *A. salmonicida* Ar-57 in goldfish

Dose* (mg/kg)	Fish number died**										Signs of dead or survival fish	
	Days after inoculation											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
4,310	3/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	scale protrusion or loss, swelling haemorrhage in and liquefaction of muscle haemorrhage around heart none
2,155	4/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
1,078	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	none

*: wet cell weight (mg)/fish weight (kg)

** : fish number died/fish number tested

Table 6. Toxicity of heat-killed cells of *A. salmonicida* Ar-57 in goldfish

Dose* (mg/kg)	Fish number died**										Signs of dead or survival fish	
	Days after inoculation											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
4,172	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	none
2,086	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
1,043	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	none

*: wet cell weight (mg)/fish weight (kg)

** : fish number died/fish number tested

みられた他は、15 mg (1,043 mg/kg) 接種魚をも含め何ら症状は認められず、10 日間飼育観察後の解剖所見においても何ら異常も認められなかった。

5. 細胞破壊懸濁液、細胞破壊上清液及び破壊細胞 fragments の毒性

細胞破壊懸濁液接種による毒性結果は Table 7 に示した。1 尾当り菌体湿重量にして 60 mg (4,630 mg/kg) 接種では、接種後 1 日目に 2 尾斃死した。しかし斃死魚には外見的にも、剖見的にも異状は認められなかった。生残した供試魚は、接種後 4 日目頃より接種部付近に膨隆が見られ、なかには脱鱗するものも観察された。10 日間飼育観察後の剖見の結果、接種部付近の皮下筋肉融解及び筋肉内出血がみられた。30 mg (2,315 mg/kg) 接種では、接種後 1 日目に 1 尾斃死し、残り 4 尾は 10 日間の飼育観察後も生残していた。斃死魚及び生残魚は外見的にも剖見結果も 60 mg 接種の場合とほぼ同様の症状を呈した。15 mg (1,158 mg/kg) 接種では、斃死魚はなかったがすべての供試魚に接種部付近に膨隆がみられた他、脱鱗や筋肉内出血の認められるものもあった。

細胞破壊上清液及び破壊細胞 fragments 接種による毒性の検討結果は Table 8-1~8-2 に示した。細胞破壊懸濁液について前述のごとく遠心分離の際の回転数を変え、その時の上清液と沈澱物についてそれぞれ毒性を検討した。なおいずれの回転数においても 1 尾当りの接種量は菌体湿重量にして 60 mg (4,732 mg/kg) 相当量である。

先ず 20,000 × g の上清液 (細胞破壊上清液) 接種魚では観察期間中、何の症状もみられず、10

Table 7. Toxicity of cell suspension ruptured by French press in goldfish

Dose* (mg/kg)	Fish number died**										Signs of dead or survival fish
	Days after inoculation										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
4,630	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	swelling
2,315	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	scale loss, haemorrhage
1,158	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	in and liquefaction of muscle
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	none

* : wet cell weight (mg)/fish weight (kg)

** : fish number died/fish number tested

Table 8-1 Toxicity of cell free suspension ruptured by French press in goldfish

Centrifugal force (×g)	Fish number died*										Signs of dead or survival fish
	Days after inoculation										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
20,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	none
16,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	swelling (1/5)
12,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	swelling (1/5)
7,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	swelling and haemorrhage (3/5)
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	

* : fish number died/fish number tested

Dose: supernatant solution equivalent to wet cell weight of 4,732 mg/kg

Table 8-2 Toxicity of cell fragments ruptured by French press in goldfish

Centrifugal force (×g)	Fish number died*										Signs of dead or survival fish
	Days after inoculation										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
20,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	swelling
16,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	scale loss
12,000	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	haemorrhage in and
7,000	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	liquefaction of muscle
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	none

* : fish number died/fish number tested

Dose: cell fragments equivalent to wet cell weight of 4,732 mg/kg

日間飼育観察後の剖見結果においても何ら異状は認められなかった。沈澱物（破壊細胞 fragments）の接種魚では、観察期間中斃死魚はなかったものの、前述の細胞破壊懸濁液接種における生残魚とほぼ同様の症状が観察された。

Table 9. Pathogenicity of spheroplasts of *A. salmonicida* Ar-57 in goldfish

Dose (mg/kg)	Fish number died*										Signs of dead or survival fish	
	Days after inoculation											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
142 (no wash)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	none
" (wash)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	none
710	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	haemorrhage in and liquefaction of muscle (2/5)
1,420	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	swelling haemorrhage in and liquefaction of muscle (4/5)
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	none

*: wet cell weight (mg)/fish weight (kg)

**: fish number dead/fish number tested

16,000×g では、上清液接種魚で1尾に接種部付近に弱い膨隆がみられたが、残り4尾には何ら異状も認められなかった。沈澱物接種魚では、斃死魚はなく、生残魚は20,000×gの場合と同様の症状が観察された。12,000×gでは、上清液接種魚で1尾に接種部付近の膨隆と筋肉内出血がみられた。沈澱物接種魚では、接種後5日目に1尾、10日目に2尾斃死した。斃死魚はもとより生残魚においても外見、剖見所見共に20,000×gの場合と同様の症状が観察された。

7,000×gでは、上清液接種魚では5尾中3尾に接種部付近の膨隆及び筋肉出血がみられた。沈澱物接種魚では、接種後1日目に1尾斃死した。斃死魚及び生残魚の所見はやはり20,000×gの場合とはほぼ同様であった。

6. spheroplasts 懸濁液の毒性

spheroplasts 懸濁液接種による毒性の検討結果はTable 9に示した。1尾当り菌体湿重量にして3 mg (142 mg/kg) 接種では、接種菌の洗浄の有無にかかわらず10日間の飼育観察中何ら症状もみられず、10日後の剖見においても異状は認められなかった。15 mg (710 mg/kg) 接種魚でも観察期間中何の症状もみられなかったが、10日後の剖見では5尾中2尾に接種部付近の皮下の融解及び筋肉内出血が観察された。30 mg (1,420 mg/kg) 接種では、やはり斃死魚はなかったものの5尾中4尾に接種部付近に膨隆がみられ、10日間飼育観察後の剖見においても筋肉融解及び筋肉内出血等の症状が観察された。

なお、これまでの各試料の病原性及び毒性試験における対照魚には観察期間中何ら異状も認められなかった。

考 察

せっそう病におけるプロテアーゼ非産生株の起病因子を検索するに当り、先ず供試菌、Ar-57株の病原性について再確認を行った。その結果、本菌は金魚に対して菌接種部付近に立鱗・膨隆等の症状を呈し、その皮下筋肉の融解及び出血も認められ、また接種菌をほぼ純粋に分離し得たことから、これらの症状は供試菌接種により引き起こされた、いわゆるせっそう様病変と思われた。ただ、この病原性試験において斃死魚は供試尾数5尾中3尾であったことから、供試菌の病原性

はプロテアーゼ産生株のそれに比べ若干弱いものと思われる。

続いて培養上清液接種による毒性試験では供試魚は10日間の観察期間中何ら異状は認められず、解剖結果からも異状は認められなかった。このことはプロテアーゼ産生株における同様の試験(1983b)において、外見上、いわゆる瘤類似の患部形成は認められたものの、斃死魚もなく、他に症状がみられなかったことを考えると、プロテアーゼ産生株に比べ病原性の若干弱い本供試菌では予想される結果と思われる。

次に培養上清液の蛋白質の濃縮を試みた。すなわち、培養上清液についてアセトン沈澱、次いで硫酸分画を行い、この硫酸分画蛋白質画分についてその毒性を検討した結果、供試魚は接種後3日目頃から接種部付近に膨隆がみられ、その後脱鱗するものも観察された。しかし、10日間の観察期間中に斃死するものはなかった。なお10日間の観察後の剖見では接種部付近皮下筋肉の融解及び筋肉内出血等のせつそう病様病変がみられた。これらの症状は本菌がプロテアーゼ非産生株であることから、プロテアーゼ以外の産生物質による毒性と考えられる。なお本菌は定性的に極めて弱いエラスターゼ活性が認められていることから、本酵素に起因する毒性とも考えられる。しかし本試験における接種蛋白質量は1尾当り約150 mgであるが、プロテアーゼ産生株から同様に調製した硫酸分画蛋白質画分では1/3蛋白質量で、接種後24時間以内に筋肉融解及び筋肉内出血等の症状を呈し、すべて斃死していることから、本供試菌の産生物質は毒性物質としては比較的弱いものであろうと考えられる。また、念のため硫酸分画蛋白質画分のプロテアーゼ活性を測定したところ、活性は測定限界以下であった。そこでさらに本菌の致死毒性物質の検索を試み、先ず菌体の毒性について検討した。

ホルマリン死菌接種による毒性試験の結果、接種量にかかわらず、接種後早い時期に斃死がみられ、斃死魚には筋肉内出血のみられるものもあったが、いわゆるせつそう病様病変はみられなかった。しかし、一様に内臓、特に心臓付近に出血がみられた。その後観察期間中斃死はみられなかったが、生残魚は接種数日後接種部付近に立鱗及び膨隆等の症状を呈した。また10日間の観察期間後の剖見では接種部付近皮下筋肉の融解及び筋肉内出血が認められた。また加熱死菌接種による毒性試験では、弱い膨隆のみられるものもあったが、いずれの接種量においても斃死魚はみられずその他外見的にも剖見においても何の症状も認められなかった。以上の結果から、ホルマリン死菌接種では接種量の少ないもので15 mg/1尾と接種量が多少多いものの、いわゆるせつそう病様病変がみられたこと。接種量の多いものでは接種後早い時期に大部分が斃死したこと。さらに加熱死菌接種ではいずれの接種量においても特記すべき症状がみられなかったことから、本菌の主たる毒性は加熱によって破壊あるいは変性を受ける細胞表層物質を含め細胞壁に存在する物質に起因する毒性ではないかと推察される。なお、さらに菌体内毒性物質の存在を考慮し、次いで細胞破壊懸濁液接種を試みたが、接種量にかかわらずホルマリン死菌接種の時と同様接種後1日目に斃死がみられた。しかし斃死魚には特記すべき症状は認められなかった。その後10日間の飼育観察後の生残魚には、接種部付近の膨隆、皮下筋肉の融解及び筋肉内出血等、ホルマリン死菌接種の場合とほぼ同様の症状が観察された。さらに細胞破壊懸濁液について遠心分離し、その上清液と沈澱物についてそれぞれ毒性試験を行った結果、遠心分離の際の回転数が高い場合のその上清液接種では供試魚には何ら症状は認められず、回転数を低下させた場合に沈澱物接種の場合と同様の症状がみられた。沈澱物接種では、斃死魚もみられ、いずれの回転数の場合でも症状はほぼ類似しており、細胞破壊懸濁液接種の場合とほぼ同様の症状が観察された。これらのことから細胞内には供試魚に対して毒性を示すものは存在せず、毒性物質は細胞壁あるいは細胞膜構成成分と推察された。そこで次に供試菌の spheroplasts を作製し、毒性物質が細胞壁あるいは細胞膜のいずれに存在するかを検討した。その結果、spheroplasts 接種量が菌体湿重量にして30 mg/1尾の場合でも斃死はみられなかったが、接種量が増加するにつれ接種部付近に膨隆、皮下筋肉の融

解及び筋肉内出血等の症状がみられた。これらの症状では細胞膜に存在する毒性物質によるものか、あるいは接種した spheroplasts の魚体内での復元によるものが定かではない。いずれにしてもホルマリン死菌の 30 mg/1 尾の接種種では供試魚の 5 尾中 4 尾が斃死していることから、仮に毒性物質が細胞膜に存在するとして細胞壁のそれに比べて弱いものと思われる。

なお、最近 Udey & Fryer (1978) を始めとして、*A. salmonicida* の膜構造の相違から病原性・非病原性を論じた研究報告が続けて発表された (Hamilton et al. 1981, Kay et al. 1981, Ishiguro et al. 1981, Munn et al. 1982, Evenberg & Lugtenberg 1982, Evenberg et al. 1982, Trust et al. 1983)。すなわち、病原性の強い株は弱病原性株の細胞壁に加えて、その外側にさらに一つの層 (additional layer, A-layer) を有し、この層を保有する株は、自然凝集能、魚類培養細胞に対する吸着能、bacteriophage 吸着阻止能、宿主血清に対する抵抗能等を有するというもので、本実験における供試菌の病原性も前述の種々の毒性試験を考え合せると、前記 additional layer (A-layer) に類似した細胞表層物質によるものではないとも推察される。

文 献

- 大工勝信, 坂井 稔 (1976). 海洋細菌の無機塩要求性に関する生理学的研究-IV. spheroplasts の生理学的諸性状, 日水誌, **42(9)**, 1013-1023.
- Evenberg, D., Van Boxtel, R., B. Lugtenberg, F. Schurer, J. Blommaert, and R. Bootsma (1982). Cell surface of the fish pathogenic bacterium *Aeromonas salmonicida*. I. Relationship between autoagglutination and the presence of a major cell envelope protein. *Biochim. Biophys. Acta* **684**, 241-248.
- Evenberg, D. and B. Lugtenberg (1982). Cell surface of the fish pathogenic bacterium *Aeromonas salmonicida*. II. Purification and characterization of a major cell envelope protein related to autoagglutination, adhesion and virulence. *Biochim. Biophys. Acta* **684**, 249-254.
- Hamilton, R.C., H. Kalnins, N.R. Ackland, and L.D. Ashburner (1981). An extra layer in the surface layers of an atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from Australian goldfish. *J. Gen. Microbiol.* **122**, 363-366.
- Ishiguro, E.E., W.W. Kay, T. Ainsworth, J.B. Chamberlain, R.A. Austin, T.J. Buckley, and T.J. Trust (1981). Loss of virulence during culture of *Aeromonas salmonicida* at high temperature. *J. Bacteriol.* **148**, 333-340.
- Kay, W.W., J.T. Buckley, E.E. Ishiguro, B.M. Phipps, J.P.L. Monette, and T.J. Trust (1981). Purification and disposition of a surface protein associated with virulence of *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.* **147**, 1077-1084.
- Munn, C.B., E.E. Ishiguro, W.W. Kay, and T.J. Trust (1982). Role of surface components in serum resistance of virulent *Aeromonas salmonicida*. *Infect. Immun.* **36**, 1069-1075.
- 田島研一, 高橋恒人, 絵面良男, 木村喬久 (1983a). サケ科魚類せつそう病原菌 *Aeromonas salmonicida* の産生する病因物質について-I. *Aeromonas salmonicida* Ar-4 (EFDL) の産生するプロテアーゼの精製, 北大水産彙報, **34 (2)**, 104-110.
- 田島研一, 高橋恒人, 絵面良男, 木村喬久 (1983b). サケ科魚類せつそう病原菌 *Aeromonas salmonicida* の産生する病因物質について-II. *Aeromonas salmonicida* Ar-4 (EFDL) の産生するプロテアーゼのヤマベ (*Oncorhynchus masou* f. *ishikawai*) 及び金魚 (*Carassius auratus*) に対する毒性の比較検討ならびに細胞毒性物質について, 北大水産彙報, **34 (2)**, 111-123.
- 田島研一, 高橋恒人, 絵面良男, 木村喬久 (1984). *Aeromonas salmonicida* Ar-4 (EFDL) の産生するプロテアーゼの特性, 日水誌, **50(1)**, 145-150.
- Trust, T.J., W.W. Kay, and E.E. Ishiguro (1983). Cell surface hydrophobicity and macrophage association of *Aeromonas salmonicida*. *Curr. Microbiol.* **9**, 315-318.
- Udey, L.R. and J.L. Fryer (1978). Immunization of fish with bacterin of *Aeromonas salmonicida*. *Mar. Fish. Rev.* **40**, 12-17.