

養殖クロマグロから分離された
Photobacterium phosphoreum の病原性に関する研究

浜口 昌巳・楠田 理一*

Studies on Virulence of *Photobacterium phosphoreum* against
Blue Fin Tuna, *Thunnus thynnus*

Masami HAMAGUCHI and Riichi KUSUDA

Blue fin tuna, *Thunnus thynnus*, has been cultured in southern Japan. However, Culture methods suited with the fish is not clarified, resulting in extensive losses by various problems and diseases were caused. Some bacteria, *Vibrio anguillarum*, *Nocardia kampachi* and *Photobacterium phosphoreum* were isolated from the dead fish during culture. In fish, bacterial diseases caused by *Vibrio anguillarum* and *Nocardia kampachi* have been reported and proved to etiological agent, but the virulence of *Photobacterium phosphoreum* has not been reported.

At first, the relationship between a condition of the fish and the microflora in the intestinal tract of the fish was studied. Gas producing *Vibrio/Photobacterium* and *Acinetobacter* were predominant in the intestine of the wild fish. In the cultured fish, *Vibrio/Photobacterium*, *Acinetobacter* and *Micrococcus* were predominant. Gas producing *Vibrio/Photobacterium* were decreased in the fish under culture condition. In the diseased fish, no-gas producing *Vibrio/Photobacterium* were increased. The microflora of the fish in the intestinal tract were changed at time after feeding and with the disease. In addition, gas-producing *Vibrio/Photobacterium* was isolated from the kidney of the diseased fish. These gas producing *Vibrio/Photobacterium* identified to *Photobacterium phosphoreum* by biochemical character and GC contents. The bacterium was considered as one of pathogens against the fish. The bacterium have weak virulence against carp, gold fish, yellowtail and blue fin tuna and has an extracellular hemolytic factor (EHF). EHF was considered as one of virulent factors of *P. phosphoreum*, because of the ability of production of EHF in the clinical isolates of the bacterium from the fish organs were higher than the isolates from diet and environmental materials. EHF was produced by the bacterium on logistic growing stage in BHI medium. After purification by salting out with ammonium sulfate and ethanol, gel filtration with Sephadex G-75, ion exchanging chromatography of DEAE Sephadex A-50 and ultrafiltration, chemical character of EHF was examined. EHF composed from heat labile protein and molecular weight about 48,000. The hemolytic phenomenon of EHF against sheep blood cells were promoted by Ca^{2+} and Mg^{2+} . EHF have a lethal effect against yellowtail.

Key words: *Photobacterium phosphoreum*, *Thunnus thynnus*; hemolytic

目 次

第1節 クロマグロの腸内および環境の細菌相.....	60
第2節 クロマグロの腸内優占細菌および病魚から分離された細菌の同定.....	65

第3節	<i>Photobacterium phosphoreum</i> の魚類に対する病原性	70
第4節	<i>Photobacterium phosphoreum</i> の産生する溶血物質の産生条件	73
第5節	<i>Photobacterium phosphoreum</i> の産生する溶血物質の精製とその特性	80
第6節	総合考察	89
	要約	90
	謝辞	90
	文献	90

第1節 クロマグロの腸内および環境の細菌相

近年、クロマグロは沖合養殖の対象魚種として注目されるようになった。しかし、クロマグロの養殖においては初期減耗が大きく、養殖化を進めるためにはその原因を明かにする必要があるとされている。

初期減耗の原因については、養殖用稚魚の採捕や養殖場への輸送に伴う損傷、ストレス、栄養障害および細菌感染症などが考えられるが、これらに関する研究はほとんど行われていない。

そこで、本研究ではクロマグロ養殖初期の減耗の原因として考えられる細菌感染症における感染部位の1つである腸管に着目し、高知県沖合で採捕された養殖用クロマグロ幼魚を用いて、養殖に伴う腸内細菌相の変化、摂餌後の腸内細菌相の推移および病幼魚の腸内細菌相の変化を調べたので報告する。

実験方法

供試魚 供試魚には1981年7月30日から8月3日までに高知県の沖合で採捕された体重72.0~135.0gの野生幼魚、沖合網いけすで飼育されていた体重69.0~142.0gの養殖クロマグロ幼魚、および体重5700~7800gの養殖1年魚を用いた。なお、摂餌に伴う腸内細菌相の変化の検討には沖合網いけす飼育幼魚を投餌直後、5, 18, 24, 72時間後に取り上げて用いた。病幼魚には養殖期間中に発生した各鱗の発赤を主徴とした体重98.0~156.0gの病魚をとりあげて用いた。

腸管の採取 開腹したのち、ただちに幽門垂末端部から排泄口の前1cmの部位までの全腸を滅菌木綿糸で結んだのち、それぞれ外側で切断して内容物とともに採取した。

餌料および海水の採取 飼料中の細菌相の検討には投餌直前のイカナゴを試料として用いた。海水中の細菌相の検討には飼育いけすの中央付近において、採水器によりいけすの1/2の水深の海水を採水して試料として用いた。

腸内、餌料中および海水中の細菌数の測定 0.5gの腸、餌料および海水に4.5mlのHERBESTの滅菌人工海水を加えてホモジナイズし、得られたホモジネートを原液として10倍段階希釈系列を作成した。各段階の希釈液を吉水他(1976)に記載されているSWA寒天培地上に塗抹して、25°Cで5日間培養した。形成されたコロニー数を計測して細菌数を測定した。

供試菌の分離 細菌数測定時に形成されたコロニーのうち任意の約200株を釣菌したのち、純粋培養を繰り返して供試菌株を分離した。

供試菌の同定 Bergey's manual 9 版 (BAUMANN *et al.* 1984), 医学細菌同定の手引第 2 版 (COWAN 1975), 金子 (1971) の方法および SHEWAN *et al.* (1960) の方法を組み合わせて作成した Fig. 1 に示す同定検索法にしたがって, *Enterobacteriaceae* を除く細菌については属レベルまでの同定を行った。

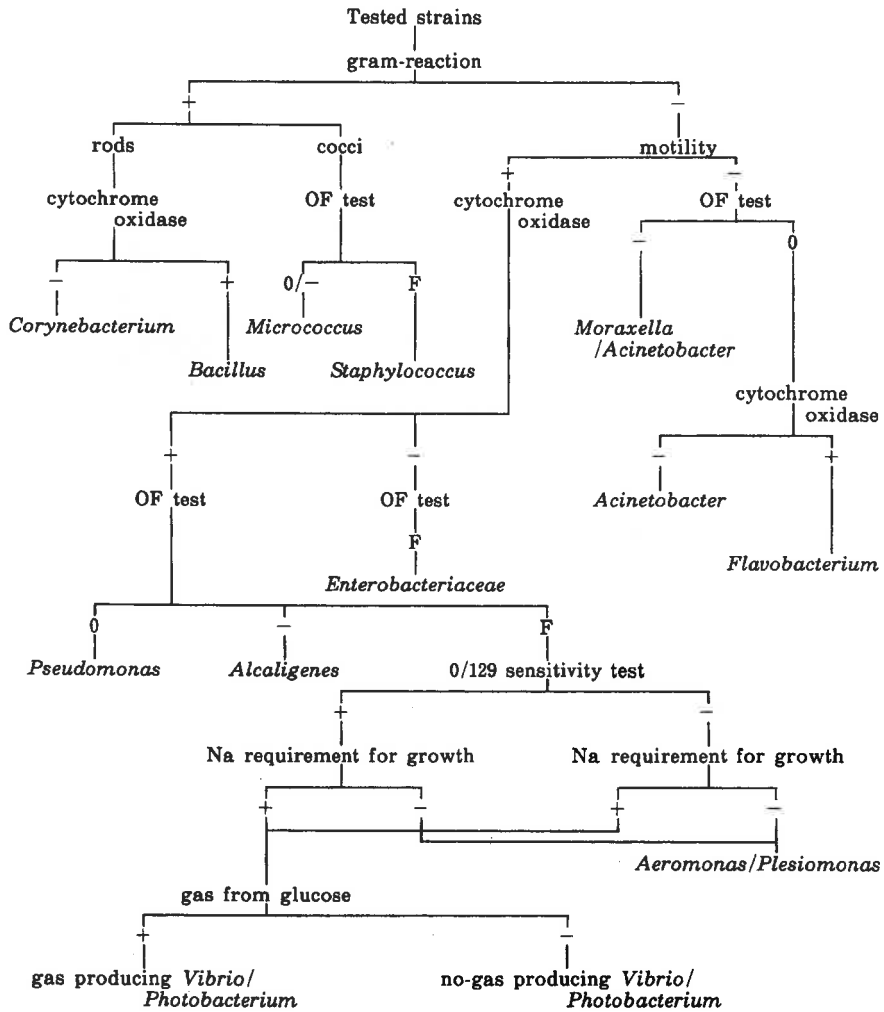


Fig. 1. Scheme for identification of bacteria.

結 果

クロマグロの腸内細菌数は Table 1 に示すとおりである。採捕直後の野生幼魚, 養殖幼魚および養殖 1 年魚の腸内細菌数は $10^6 \sim 10^7$ CFU/g となった。摂餌後の腸内細菌数の変化は摂餌後 24 時間までは 10^6 CFU/g となったが, 72 時間後には 10^3 CFU/g 以下となった。餌料は 5.6×10^6

Table 1. Viable count of bacteria in the intestine of blue fin tuna, *Thunnus thynnus*

Condition of fish	Viable count (CFU/g)
Wild	3.21×10^7
Culture for 1 weeks	4.42×10^6
Culture for 1 year	3.06×10^6
0 hr after feeding	2.98×10^6
5 hr after feeding	2.32×10^6
18 hr after feeding	1.05×10^6
24 hr after feeding	1.07×10^6
72 hr after feeding	5.24×10^3
Diseased	1.92×10^9
Diet	5.60×10^6
Sea water in net cage	3.80×10^3

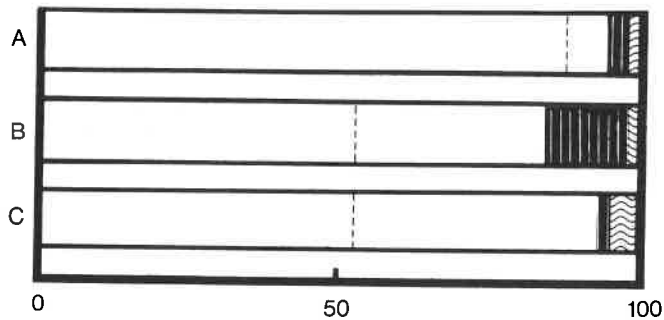


Fig. 2. Changes in the intestinal microflora of blue fin tuna, *Thunnus thynnus*, under culture. A: wild fish, B: fish cultured for 1 week, C: fish cultured for 1 year, □: *Vibrio/Photobacterium*, ■: *Necromonas/Chromobacterium*, ⊞: *Micrococcus*, ⊋: gas producing *Vibrio/Photobacterium*.

CFU/g 海水は 3.8×10^4 CFU/ml となった。いっぽう、病幼魚は 10^9 CFU/g 以上となった。

養殖に伴う腸内細菌相の変化は Fig. 2 に示すとおりである。採捕直後の野生幼魚の腸内細菌相は *Vibrio/Photobacterium* が 95.7% となり、そのうちガス産生性を示すものが 88.0%、*Necromonas/Chromobacterium* が 4.3% となった。餌付け直後の養殖幼魚では *Vibrio/Photobacterium* が 86.0% となり、そのうちガス産生性を示すものが 52.6%、*Necromonas/Chromobacterium* が 14.0% となった。養殖 1 年魚では *Vibrio/Photobacterium* が 95.4% となり、そのうちガス産生性を示すものが 52.6%、*Necromonas/Chromobacterium* が 0.6%、*Micrococcus* が 4.0% となった。

摂餌に伴う腸内細菌相の変化は Fig. 3 に示すとおりである。摂餌直後の養殖クロマグロ幼魚の腸内細菌相は *Vibrio/Photobacterium* が 88.0% となり、そのうちガス産生性を示すものが 54.0%、*Necromonas/Chromobacterium* が 9.2%、*Micrococcus* が 2.8% となった。5 時間後には *Vibrio/Photobacterium* が 56.2% となり、そのうちガス産生性を示すものが 29.4%、*Necromonas/Chromobacterium* が 16.8%、*Enterobacteriaceae* が 13.2%、*Micrococcus* が 4.3%、不明のものが 9.5% となった。18 時間後には *Vibrio/Photobacterium* が 75.3% となり、そのうちガス産生性を示すものが 39.2%、*Necromonas/Chromobacterium* が 11.7%、*Enterobacteriaceae* が 5.1%、*Micro-*

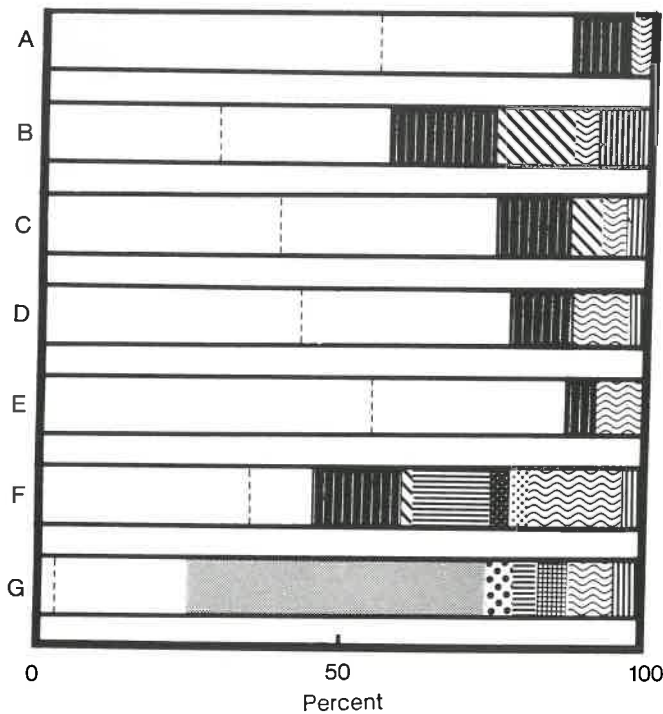


Fig. 3. Changes in the intestinal microflora of blue fin tuna at various time after feeding. A: 0 hr after feeding, B: 5 hr after feeding, C: 18 hr after feeding, D: 24 hr after feeding, E: 72 hr after feeding, F: Diet, G: Sea water, □: *Vibrio/Photobacterium*, ▨: *Necromonas/Chromobacterium*, ⊞: *Micrococcus*, ⊠: *Enterobacteriaceae*, ⊞: *Moraxella/Acinetobacter*, ⊞: *Corynebacterium*, ⊞: *Staphylococcus*, ⊞: *Pseudomonas*, ⊞: *Flavobacterium*, ⊞: *Aeromonas*, ⊞: Others, ⊞: gas producing *Vibrio/Photobacterium*.

coccus が 4.8%，不明のものが 3.1% となった。24 時間後には *Vibrio/Photobacterium* が 78.0% となり，そのうちガス産生性を示すものが 43.2%，*Necromonas/Chromobacterium* が 7.0%，*Enterobacteriaceae* が 2.8%，*Micrococcus* が 9.7%，不明のものが 2.5% となった。72 時間後には *Vibrio/Photobacterium* が 88.0% となり，そのうちガス産生性を示すものが 57.0%，*Necromonas/Chromobacterium* が 3.9%，*Micrococcus* が 8.1% となった。餌の細菌相は *Vibrio/Photobacterium* が 46.1% となり，そのうちガス産生性を示すものが 35.0%，*Necromonas/Chromobacterium* が 13.9%，*Enterobacteriaceae* が 1.5%，*Moraxella/Acinetobacter* が 13.2%，*Corynebacterium* が 2.7%，*Staphylococcus* が 3.8%，*Micrococcus* が 16.2%，不明のものが 2.6% となった。いけす内の海水の細菌相は *Vibrio/Photobacterium* が 25.0% となり，そのうちガス産生性を示すものが 3.7%，*Pseudomonas* が 50.0%，*Flavobacterium* が 3.5%，*Moraxella/Acinetobacter* が 4.0%，*Aeromonas* が 4.8%，*Micrococcus* が 7.8%，不明のものが 4.9% となった。

養殖クロマグロの正常幼魚と病幼魚の腸内細菌相の比較は Fig. 4 に示すとおりである。正常幼魚の腸内細菌相は *Vibrio/Photobacterium* が 86.0% となり，そのうちガス産生性を示すものは 53.0%，*Necromonas/Chromobacterium* が 10.5%，*Micrococcus* が 3.5% となった。病幼魚では *Vibrio/Photobacterium* が 98.1% となり，そのうちガス産生性を示すものは 32.0%，*Necromonas/Chromobacterium* が 1.9% となった。

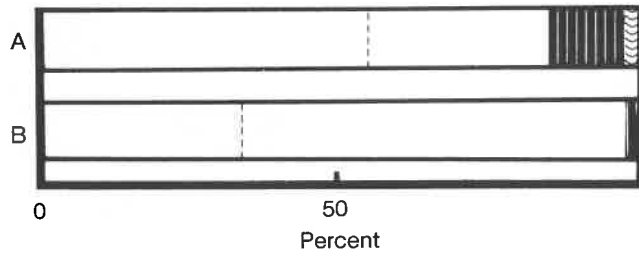


Fig. 4. Comparison of the intestinal microflora between diseased and normal blue fin tuna. A: normal fish, B: diseased fish, □: *Vibrio/Photobacterium*, ▨: *Necromonas/Chromobacterium*, ▩: *Micrococcus*, ∴: gas producing *Vibrio/Photobacterium*.

考 察

高知県沖合で捕獲された野生幼魚と捕獲後養殖されたクロマグロ正常幼魚の腸内細菌数には差異が認められず、 $10^6 \sim 10^7$ CFU/g の範囲内であった。海産魚類の消化管内には、 $10^4 \sim 10^8$ CFU/g の細菌が常在することが知られている（瀬良・石田 1975）。本研究においても、正常幼魚の腸内細菌数はこの範囲内であった。これらに対し、病幼魚では 10^9 CFU/g と増加する傾向を示した。摂餌後の腸内細菌数の変化は摂餌直後には増加するが時間の経過に伴って低下し、摂餌後72時間には 10^3 CFU/g と減少した。クロマグロ幼魚の摂餌後の時間の経過に伴う腸内細菌数の減少は、サケ科魚類（吉水他 1976）やウナギ（反町・江草 1971）と比較して顕著であった。魚類の消化時間は温度による影響が大きいとされているが、クロマグロ幼魚は本実験条件下では消化に要する時間が短く、腸内細菌数の変動も速やかではないかと考えられる。いっぽう、病幼魚の腸内細菌相は摂餌行動が認められなかったにもかかわらず、正常幼魚よりも高い値を示した。その原因としては、魚体の衰弱により腸内環境の変化や腸内細菌数を調整している免疫機構の低下などが起こり、腸内細菌数が増加するのではないかと考えられる。

クロマグロ幼魚の腸内細菌相は *Vibrio/Photobacterium*, *Necromonas/Chromobacterium* および *Micrococcus* などによって構成されることが明かとなった。奥積・堀江 (1968), 瀬良・木俣 (1972) および金子 (1971) はいずれも海産魚の腸内細菌相は *Vibrio* が主体をなすとしており、今回の結果と一致している。いっぽう、クロマグロの野生幼魚と養殖幼魚ではいずれも *Vibrio/Photobacterium* と *Necromonas/Chromobacterium* が主体をなしているが、養殖幼魚では *Micrococcus* が増加した。また、野生幼魚では *Vibrio/Photobacterium* のうちガス産生性を示すものの比率が高かったが、養殖幼魚ではその比率は低下した。以上の結果から、クロマグロの野生幼魚と養殖幼魚の腸内細菌相を構成する細菌の属はほぼ同じであるが、種レベルでは変動する可能性がある。Bergey's manual 9 版 (BAUMANN *et al.* 1984) では *Vibrio* および *Photobacterium* のうちガス産生性を示すものは *Vibrio fluvialis*, *V. gazogenes* および *Photobacterium phosphoreum* が記載されている。今回分離された *Vibrio/Photobacterium* のうち色素産生を示すものは認められなかったことから、*V. gazogenes* は除外される。このことから、野生幼魚の腸内細菌相の主体をなすのは *V. fluvialis* か *Photobacterium phosphoreum* ではないかと考えられる。養殖による餌や環境の変化が

これら2種の分離比率を低下させるのではないかと思われる。

摂餌による腸内細菌相の変化は顕著であった。摂餌直後と摂餌後72時間では *Vibrio/Photobacterium*, *Necromonas/Chromobacterium* および *Micrococcus* が主体をなしていた。しかし、摂餌後5時間ではこれらの3種に加えて、*Enterobacteriaceae* が出現した。*Enterobacteriaceae* と *Necromonas* は摂餌後5時間が最も高い比率を示し、それ以後は低下する傾向を示した。いっぽう、*Vibrio/Photobacterium* と *Micrococcus* は摂餌後経時的に増加する傾向を示した。また、野生幼魚に高い比率で認められたガス産生性の *Vibrio/Photobacterium* は摂餌5時間後は少なく、それ以後は経時的に増加した。この細菌相の変動は *Micrococcus* は海水中にも多く認められるが、*Necromonas/Chromobacterium* と *Enterobacteriaceae* は餌料中のみ認められることから、餌料によるものと考えられる。

病幼魚の腸内細菌相は野生幼魚と同様に *Vibrio/Photobacterium* が95%以上を占めていたが、そのうちガス産生性を示すものの比率は野生幼魚の30%程度となり、ガス非産生性を示すものが増加する傾向を示した。このように、病幼魚では腸内細菌相のバランスの変化が認められた。これらの変化を明かにするために、さらに、種レベルまで検討する必要があると思われる。

本研究結果から、クロマグロの腸内細菌相は養殖、摂餌後の時間および疾病にともなって変化することが明かとなった。腸内細菌はほ乳類では微量栄養素の産生や消化などの作用を示し、生体維持に関与するのでそのバランスの変化は生体に影響をおよぼすことが知られている。クロマグロの養殖化にともなう腸内細菌相の変化は魚体になんらかの影響を与えている可能性があると思われる。

第2節 クロマグロの腸内優占細菌および病魚から分離された細菌の同定

前節において、クロマグロの野生幼魚、養殖幼魚および病幼魚の腸内細菌相を検討したところ、いずれの魚体からもガスを産生する *Vibrio* ないし *Photobacterium* 属に分類される細菌が高い頻度で分離されることから、これらの細菌が腸内優占細菌であると考えられた。

そこで、本節ではクロマグロの野生幼魚、養殖幼魚および病幼魚の腸内から分離された *Vibrio* ないし *Photobacterium* 属の細菌および病魚の腎臓から分離され、病原菌と考えられる細菌について、形態、生化学的性状ならびに増殖特性を調べ、属および種の同定を行った。

実験方法

供試菌株 前節において、クロマグロの野生幼魚、養殖幼魚および病幼魚の腸内から分離されたガスを産生する *Vibrio* ないし *Photobacterium* 属に分類された68株および病幼魚の腎臓から分離された16株を無作為に選んで供試菌株とした。

形態および生化学的性状検査 常法 (COWAN 1975) により、菌の形態、運動性、鞭毛の有無、好塩性および耐塩性、O/129感受性試験、OF試験、インドール産生性、VP試験、オキシダーゼ試験、クエン酸塩の利用性試験、2,3ブタンジオールからのアセトイン産生性試験、ゼラチン

液化試験, アミノ酸脱炭酸試験, Tween 20, 40, 60, 80 の分解性試験, 硫化水素産生性試験, 発光性試験, 炭水化物分解性試験を行った。

DNA のグアニンとシトシン (GC) 含量の測定 形態および生化学的性状検査によって分類された A, B および C の 3 群の細菌から, それぞれ代表的な菌株を 1 株ずつ選んで, GC 含量を測定した。GC 含量はこれらの菌株から MARMUR (1961) の方法により分離・精製した DNA を用いて, 分光光度計 U-2300 (日立製作所) によって熱変性温度を測定し, MAUMUR and DOTY (1962) の式によって求めた。

増殖に及ぼす温度, 塩分, pH および胆汁添加の影響 GC 含量の測定に用いた 3 株の増殖に

Table 2. Characteristics of the bacteria isolated from kidney and intestine of blue fin tuna

Characteristics	Group A	Group B	Group C
Form	Rod	Rod	Rod
Motility	+	+	+
Flagella	+	+	+
O/129 sensitivity	+	+	+
Voges-Proskauer	—	—	—
Indole	—	—	—
Oxidase	—	—	—
2,3-Butandiol	+	+	+
Gelatin liquefaction	—	—	—
Gas from glucose	+	+	+
Decarboxylation of:			
Ornithine	—	—	—
Lysine	+	—	—
Arginine	+	+	+
Hydrolysis of:			
Tween 80	—	—	—
Tween 60	—	—	—
Tween 40	+	+	+
Tween 20	+	+	+
Acid from:			
Glycogen	+	—	—
Starch	+	—	—
Dextrin	+	+	—
Salicin	—	—	—
Glycerol	—	—	—
Sorbitol	—	—	—
Mannitol	—	—	—
Trehalose	+	+	—
Cellulose	+	+	—
Maltose	+	+	—
Sucrose	—	—	—
Mannose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Glucose	+	+	+
Xylose	+	+	+
Fluorescence	—	+	—
GC %	42	41	42

及ぼす温度、塩分、pH および胆汁添加の影響を、1%トリプチケース水溶液で一定量の菌体を24時間培養したのち、分光光度計 U-2300 (日立製作所) を用いて 630 nm の吸光度を測定して求めた。

結 果

供試菌株の形態、生化学的性状検査および DNA の GC 含量測定結果は Table 2 に示すとおりである。本菌群は鞭毛をもち、運動性のあるかん菌で、Vibrio static agent O/129 に感受性を示した。また、2,3ブタンジオールからのアセトイン産生、アルギニンのアルカリ化反応および Tween 20 および 40 の加水分解試験が陽性で、VP、インドール、オキシダーゼ、ゼラチン液化、オルニチン脱炭酸、Tween 60 および 80 の加水分解試験は陰性を示した。しかし、炭水化物分解性試験から本菌群は3つのグループに分かれた。すなわち、Aグループはグリコーゲン、セロビオース、デキストリン、グルコース、デンプン、トレハロース、マルトース、マンノース、ガラクトース、フルクトースおよびキシロースを分解したが、そのほかの炭水化物は分解しなかった。BグループはAグループとよく似た炭水化物分解性を示したが、グリコーゲンとデンプンの分解性に差異が認められた。Cグループはキシロース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、グルコース以外は分解しなかった。DNA の GC 含量はAおよびCグループが42%、Bグループが41%となった。

クロマグロの野生幼魚、養殖幼魚および病幼魚の消化管から分離した菌株のうち、A、BおよびCグループの比率は Fig. 5 に示すとおりである。野生幼魚および養殖幼魚ではそれぞれAグループが78.2および80.7%、Bグループが15.6および13.3%、Cグループが6.2および6.0%となった。いっぽう、病幼魚ではAグループが47%、Bグループが39.2%、Cグループが13.8%となった。いっぽう、病幼魚の腎臓から分離した菌株はBおよびCグループに属し、分離比率はそれぞれBグループが87.5%、Cグループが12.5%となった。

A～Cの各グループの代表菌株の増殖に及ぼす温度の影響は Fig. 6 に示すとおりである。3つのグループの菌株とも、5°C から 30°C までは増殖が認められたが、30°C 以上の温度では増殖

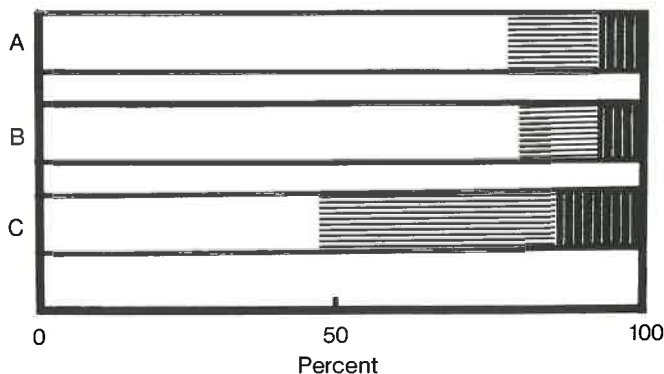


Fig. 5. Comparison of specific bacteria groups isolated from intestinal tracts of wild (A), cultured (B) and diseased (C) blue fin tuna. □: Group A, ▨: Group B, ▩: Group C.

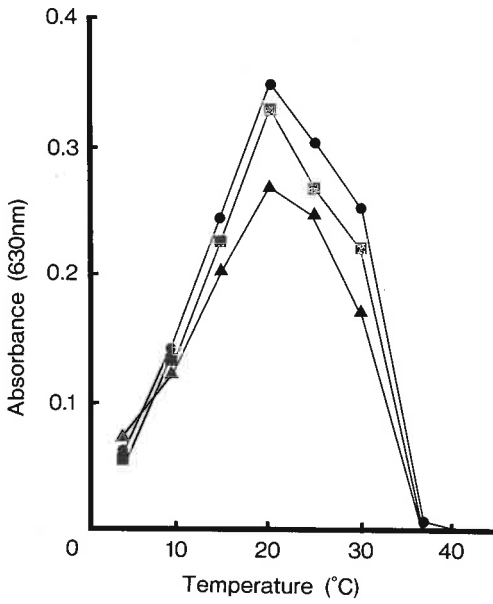


Fig. 6. Effect of temperature on growth of the bacteria. ●: Group A, ■: Group B, ▲: Group C.

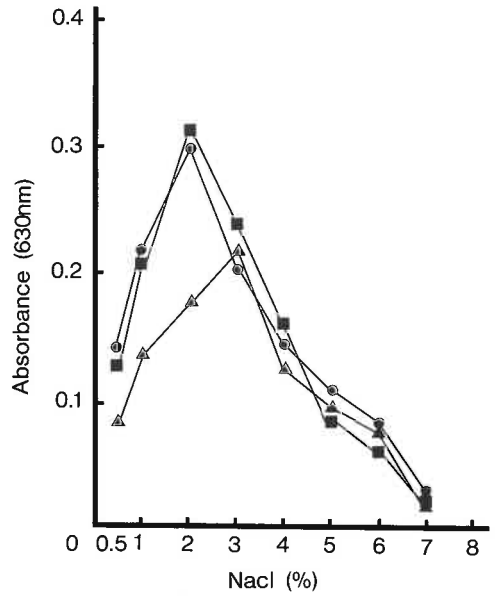


Fig. 7. Effect of NaCl concentration on growth of the bacteria. ●: Group A, ■: Group B, ▲: Group C.

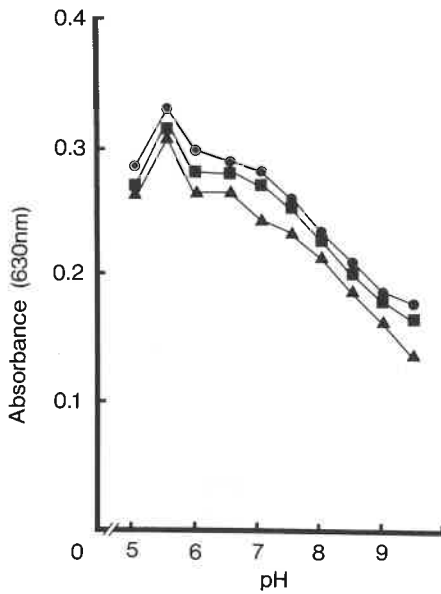


Fig. 8. Effect of pH on growth of the bacteria. ●: Group A, ■: Group B, ▲: Group C.

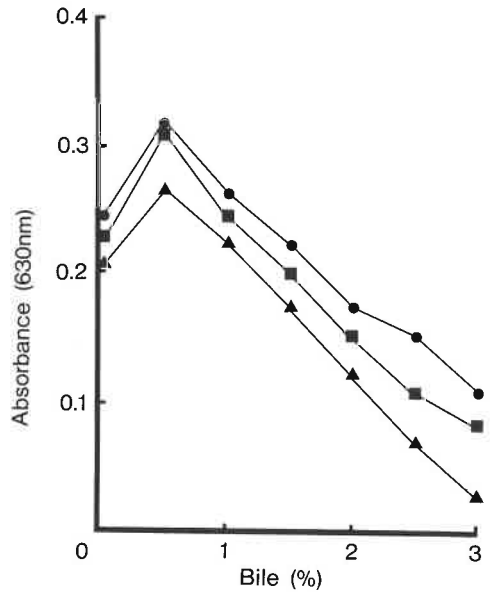


Fig. 9. Effect of bile on growth of the bacteria. ●: Group A, ■: Group B, ▲: Group C.

性は急激に低下し、42°Cではまったく増殖しなかった。本菌群の増殖至適温度は20°C付近であった。

A~Cの各グループの代表菌株の増殖に及ぼす塩分の影響はFig. 7に示すとおりである。3つのグループの菌株ともに、0および8%では増殖せず、至適塩分は2~3%であった。

A~Cの各グループの代表菌株の増殖に及ぼすpHの影響はFig. 8に示すとおりである。3つ

のグループの菌株ともに、pH 5.0 から 9.5 までの各段階において、増殖性の変化は小さかった。

A～Cの各グループの代表菌株の増殖に及ぼす胆汁添加の影響は Fig. 9 に示すとおりである。3つのグループの菌株ともに、胆汁濃度が3.0%まで増殖したが、濃度が高くなるにつれて増殖性は低下した。

考 察

前節で、クロマグロの野生幼魚、養殖幼魚および病幼魚の腸内では、ガス産生性を示す *Vibrio* 属ないし *Photobacterium* 属に分類される細菌群が腸内優占細菌種の一つであることを明かにした。Bergey's manual 9 版 (BAUMANN *et al.* 1984) には *Vibrio* 属および *Photobacterium* 属の細菌のうち、ガス産生を示す菌株は *V. fluvialis* II, *V. gazogenes* および *P. phosphoreum* の3種が記載されている。本菌群の性状とこれらの菌を比較すると、*V. fluvialis* II とはオキシダーゼ試験、4°C および 40°C での発育性、キシロース、シュクロースおよびマンニトールおよびソルビトールの分解性に差異が認められた。また、本菌の3つのグループはいずれもマンニトール非分解で増殖至適塩分が 100 mM 以上であり、DNA の GC 含量がいずれも 41～42%であることから、*Photobacterium phosphoreum* に同定するのが妥当であると思われる。しかし、Cグループの菌株についてはAおよびBグループと同種に同定すべきであるのかどうかを今後さらに検討する必要がある。

いっぽう、クロマグロ幼魚から分離した *P. phosphoreum* を炭水化物分解性の違いから3グループに分類したが、野生幼魚および養殖幼魚と病幼魚の間で、これらのグループの分離比率に差異が認められた。また、病幼魚の腎臓からはBおよびCグループのみが分離されたことから、この2群がクロマグロの病原細菌となるのではないかと思われる。金井他 (1977) は鱈赤病の症状を呈するウナギ病魚の腸内細菌相を調べ、腸管内からは本症原因菌である *Aeromonas* 属細菌が多数分離されるが、主要臓器からは分離されない病魚がかなりみられたとしている。また、腸管内に存在する *Aeromonas* がなんらかの要因によって異常増殖し、その結果、病態がさらに激しくなるとしている。したがって、BおよびCグループの分離比率の変化は病幼魚の疾病に基づく体調の変化によるものと思われることから、クロマグロの疾病を考えるうえで、BおよびCグループの分離比率について検討する必要がある。

P. phosphoreum は発光細菌として知られており、動物の発光器の中などに存在するとともに、海水中に広く分布し、海産魚の体表や腸管内にも存在することが知られている。SIMIZU and KANEKO (1973) は海産魚の腸内に最も普通に認められる細菌は *Vibrio* に属する細菌か、それに近縁の種である非発光性の *P. phosphoreum* であるとしている。いっぽう、腸内細菌には低 pH や胆汁などの消化管内の制限要因の影響を通過する必要があることが知られている。魚類の消化管内の腸内細菌に対する選択性については AISO *et al.* (1968), 瀬良・木俣 (1972), SERA and ISHIDA (1972) および吉水他 (1976) の報告があり、魚類の腸管から分離した細菌の増殖性は低 pH や胆汁の影響をあまり受けないとされている。本研究においても、クロマグロの腸内から分離される *P. phosphoreum* は pH の低下および胆汁添加によって、増殖に及ぼす影響が小さいこ

とから、腸内細菌の条件を備えているものと思われる。これらのことから、本菌はクロマグロ幼魚の生息環境中に存在しており、クロマグロの腸管内に侵入して、定着するものと思われる。

第3節 *Photobacterium phosphoreum* の魚類に対する病原性

魚類を人為管理下において集約的に飼育するとストレスの増加などによって新たな疾病が発生することが知られている。前節までに、クロマグロの養殖環境中および腸内に存在する *Photobacterium phosphoreum* が、クロマグロの条件によっては病原細菌となるのではないかと考えられた。これまでに、養殖中のクロマグロの斃死あるいは瀕死幼魚から、*Nocardia* 属、*Vibrio* 属の細菌が多数分離され、病原細菌として疑われている。そのうち、*Nocardia* 属と *Vibrio* 属についてはこれまでに魚病細菌としての報告が多数あるが、*Photobacterium* 属細菌の魚に対する病原性には不明な点が多い。

そこで、本節では本菌の各種魚類に対する病原性を産生物質の生物活性および致死性を検討することによって調べた。

実験方法

供試菌株 前節までに用いたクロマグロの腎臓由来株16株、腸内61株、海水および飼料18株の *P. phosphoreum* を用いた。

供試魚 供試魚には高知県高知市の養殖業者から購入した平均魚体重 10.6 g のコイおよび 4.3 g のキンギョ、高知県浦の内湾の養殖業者から購入した平均魚体重 6.8 g のブリ稚魚、高知県栽培漁業センターから入手した平均体重 5.9 g のクロダイおよび 6.3 g のマダイ、四国沖で採捕された平均体重 312.2 g のクロマグロを用いた。

本菌の培養ろ液の調製 供試菌株を 1.5% NaCl を添加した BHI (Difco, Na-BHI) 培地で 25°C、24時間培養したのち 1,000×g の遠心操作によって培養上清を回収した。この培養上清は 0.22 μm のミリポアフィルターでろ過し、培養ろ液とした。

超音波破壊菌体の作製 供試菌株を Na-BHI 培地で 25°C、24時間培養したのち 1,000×g の遠心操作によって菌体を回収した。菌体は滅菌した 2% NaCl 水溶液で 3 回洗浄したのち、同液に湿菌重量で 0.1 g/ml の濃度となるように懸濁した。この懸濁液を 4°C で 5 分間超音波処理をおこなったのち、1,000×g の遠心操作によって未破壊の菌体を除去した上清を超音波破壊菌体とした。

溶血性の判定 常法により綿羊保存血液 (日本生物材料センター) を用いて血液寒天培地を作製した。これに供試菌株を接種して 30°C で 48 時間培養して形成された溶血斑の有無を確認するとともに、その直径を測定した。

プロテアーゼ活性の測定 ゼラチン分解性試験用培地に供試菌株を接種してゼラチンの分解性を判定して、プロテアーゼの有無を検討した。

溶血活性の測定 ヒツジ、ウマ、ウシ、ウサギ (日本生物材料センター)、ヒト O 型、ブリ、

クロマグロおよびコイの赤血球を用いて, MUNN (1978) の方法によって行った。まず, ヒツジ赤血球をダルベッコのリン酸緩衝食塩水 (日水, PBS) で洗浄したのち, 等量の0.025%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液で完全溶血させた時の 540 nm の吸光度が 0.8 となるように同液に懸濁した。この赤血球懸濁液と PBS で 2 倍階段希釈した溶血物質を 1:2 の割合で混合し, 30°C で 1 時間反応させた。反応後, 400×g で10分間の遠心操作を行い, 上清の 540 nm の吸光度を測定し, 50%以上の溶血率を示す最大希釈倍数を unit として表記した。

致死性の判定 供試菌株を Na-BHI 寒天培地で 25°C, 24時間培養したのち, 滅菌した 2% NaCl 溶液を用いて集菌し, 630 nm の吸光度が 1.0 となるように同液に懸濁した。この菌液とそれを 2% NaCl 溶液を用いて, 2.3×10^8 CFU/ml の濃度に調製した菌液 0.1 ml を供試魚の背部筋肉に接種した。接種後10日間にわたってへい死状況を観察した。

結 果

病魚の腎臓, 腸管内容物および海水から分離した菌株の溶血性およびゼラチン分解性を検討した結果は Table 3 に示すとおりである。*P. phosphoreum* の一部のコロニーの周辺には透明帯が形成され, 溶血性が認められた。各供試菌株の溶血性陽性率には差異があり, 腎臓の分離菌株の陽性率は腸内および海水から分離した菌株と比較して有意差 ($P < 0.01$) が認められたが, 腸内と

Table 3. Hemolysis to sheep red blood cells and proteolytic activity to geratin by *Photobacterium phosphoreum* isolated from kidney of diseased blue fin tuna, intestinal contents and sea water

Isolates from:	No. of isolates	hemolysis		proteolytic activity	
		+	-	+	-
Kidney	16	14	2	0	16
Intestinal contents	62	21	41	1	61
Sea water	21	3	18	0	21

Table 4. Mortalities of various fishes injected with *Photobacterium phosphoreum* 23-1 strain

Fish	No. of tested	No. of dead fish
Carp	10	3
Gold fish	10	2
Red sea bream	10	0
Black sea bream	10	0
Yellowtail	10	1
Blue-fin tuna	3	1

Table 5. Hemolytic activity against various animal red blood cells by culture filtrate and sonicated cells of *Photobacterium phosphoreum* strain 23-1

Animals	Hemolytic activity (unit)	
	culture filtrate	sonicated cells
Human O	32	<4
Sheep	1024	<4
Horse	512	<4
Bovin	16	<4
Rabbit	1024	<4
Carp	4	<4
Eel	2	<4
yellowtail	16	<4
blue-fin tuna	64	<4

海水の分離株には有意差が認められなかった。カゼイン分解性の陽性菌株は腸内分離菌株に1株認められたのみで、その他の部位からの分離菌株には認められなかった。

各種魚類に対する *P. phosphoreum* の病原性について検討した結果は Table 4 に示すとおりである。各供試魚のうちコイおよびキンギョでは10尾中それぞれ3および2尾がへい死した。へい死魚からはいずれも *P. phosphoreum* が再分離された。へい死魚には腹部の膨満が認められた。海産魚ではブリで10尾中1尾、クロマグロで3尾中1尾のへい死が認められたが、マダイおよびクロダイにはへい死が認められなかった。

P. phosphoreum の産生する溶血物質の各種動物赤血球に対する溶血活性を検討した結果は Table 5 に示すとおりである。溶血活性は培養液中にのみ認められ、超音波破壊菌体には認められなかった。各種動物赤血球のうちほ乳類ではウサギおよびヒツジに対して、魚類ではクロマグロに対して高い溶血活性が認められた。

考 察

Photobacterium phosphoreum は Bergey's manual 第8版によると魚類等の発光器に寄生する発光細菌として記載されている。本菌の病原性については知見が少なく、牛馬の死体や肉で繁殖したり、人体に侵入して発光尿を引き起こすこともあるとされているのみである。また、Bergey's manual 第9版 (BAUMANN *et al.* 1984) においても病原細菌としての知見は認められない。前節までに、養殖過程で認められたクロマグロの病魚およびへい死魚の腎臓から分離された菌株が *P. phosphoreum* に同定されることが明かとなったが、これまでの報告例からして、その病原性はいかあっても弱いものではないかと考えられる。しかし、近年、ヒトでは感染防御性の低下した Compromised host における緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* の感染症や日和見感染など環境細菌による疾病が問題となっている。加藤 (1988) はこれらの感染症における細菌の産生する毒素の関連についての総説を表わしている。そのなかで、宿主が健康なときは通常の細菌相として生体をとる菌のなかには、宿主の感染防御性が低下したときには生体内に侵入するものがあるとしている。これらの菌の代表的なものに *Pseudomonas aeruginosa* があげられている。この菌は菌体外に外毒素 A (LIU 1974), 白血球崩壊毒素 (SCHARMANN 1974), アルカリプロテアーゼ (MORIHARA 1963), エラスターゼ (MORIHARA *et al.* 1984) および enzyme S (PAVLOASKIS and WRETLIND 1982) などを産生することが知られている。これらの菌体外産生物を利用して *P. aeruginosa* は生体内に侵入し、発病に至ると考えられる。本節の結果をまとめると *P. phosphoreum* の魚に対する病原性は 10^2 の浸漬感染で感染が成立するブリの類結節症 (楠田・浜口 1987) と比較して低いと考えられる。また、*P. phosphoreum* は溶血物質を産生し、その産生性は病魚およびへい死魚の腎臓から分離した菌で高い比率で認められることが明かとなった。BOLLIN *et al.* (1985) は *Legionella pneumophila* の病原性を臨床分離株と環境分離株で比較した結果、臨床分離株の方が高かったとしている。したがって、今回病魚から分離された *P. phosphoreum* と腸内および海水中から分離された株で溶血物質の産生性に有意差が認められた原因としては、溶血物質の産生株が病原体となるからではないかと考えられる。

このように *P. phosphoreum* は病原因子として考えられる溶血物質を産生することが認められた。溶血物質の作用については逢坂 (1974) の総説がある。溶血物質の意義については細胞膜溶解作用を持つことから、菌が生体内に侵入するのを阻止する白血球系の細胞に対する抵抗因子としてとらえられるとしている。KUSUDA and KIMURA (1978) および KIMURA and KUSUDA (1979) はブリの連鎖球菌症で病原菌の培養ろ液がブリ体内における生菌の消長に及ぼす影響を調べており、培養ろ液中の成分が連鎖球菌症の発症および菌の体内における生残性に影響するとしている。このことから、本菌の培養ろ液中に存在する溶血物質も本菌のクロマグロの体内への侵入および定着に作用するものと考えられる。また、本節で認められた各種動物赤血球の本菌の溶血物質の感受性の差異は赤血球を構成する膜成分が動物種によって異なることとされており (逢坂 1974)、それによって溶血物質の作用部位にズレが生じるためと考えられる。

以上のことから *P. phosphoreum* のクロマグロの病原性について考えると釣獲や小割内に収容することによってクロマグロにストレスがかかり、摂餌量の低下やスレなどの傷害が加わり魚体の抵抗力が低下したときに飼育環境中や体内に存在する *P. phosphoreum* のうち溶血物質産生株が溶血物質を利用してクロマグロの体内に侵入し発病およびへい死にいたらしめるものと考えられる。

第4節 *Photobacterium phosphoreum* の産生する溶血物質の産生条件

前節で、*P. phosphoreum* がクロマグロの生体防御能が低下したときに溶血物質を利用して体内に侵入し発病にいたるのではないかと疑われた。したがって、本菌のクロマグロに対する病原性を考えるうえで溶血物質の特性およびクロマグロに対する影響を検討する必要があると思われる。しかし、*P. phosphoreum* の産生する溶血物質に関する研究は少なく、ほとんど明かにされていない。

そこで、本節では *P. phosphoreum* の溶血物質を精製する前に、培地中での産生条件について検討した。

実験方法

供試菌株 第3節において溶血物質の産生性が最も高いことが明らかとなった *P. phosphoreum* 23-1 株を用いた。

培養ろ液試料の調製 供試菌株を Na-BHI 培地で 25°C、24時間培養したのち 1,000×g の遠心操作によって培養上清を回収し、0.22 μm のミリポアフィルターでろ過して培養ろ液試料とした。

溶血活性の測定 溶血活性の測定は本物質に対する感受性が高く、同一のロットの入手が容易なヒツジ (日本生物材料センター, Lot. No. 155) の赤血球を用いて、MUNN (1978) の方法によって行った。まず、ヒツジ赤血球を PBS で洗浄したのち、等量の 0.025% ラウリル硫酸ナトリウム水溶液で完全溶血させた時の 540 nm の吸光度が 0.8 となるように同液に懸濁した。この

赤血球懸濁液と PBS で 2 倍段階希釈した溶血物質を 1:2 の割合で混合し、30°C で 1 時間反応させた。反応後、400×g で 10 分間の遠心操作を行い、上清の 540 nm の吸光度を測定し、50% 以上の溶血率を示す最大希釈倍数を unit として表記した。

タンパク量の測定 LOWRY (1954) の方法によって行い、牛血清アルブミンを標準タンパクとして算出した。

菌の増殖性の測定 630 nm の吸光度を測定して行った。

生菌数の測定 生菌の希釈用には滅菌した 2% NaCl 溶液を、培養には Na-BHI 寒天培地を用いて塗抹平板法によって行った。

各種液体培地中での溶血物質の産生量の比較 液体培地には Na-BHI, Todd-hewitt (TH, Difco), Heart infusion (HI, 日水製薬), Nutrient broth (NB, 日水製薬), Tryptic soy broth (TSB, 日水製薬), GAM broth (日水製薬) および溶血性連鎖球菌のストレプトリジン O の精製用に使用されている合成培地 (SM) を用いた。1.5% NaCl を含む栄養寒天培地 (日水製薬) を用いて作製したスラントに接種して、25°C で 48 時間前培養した供試菌体の 1 白金耳量を各培地に接種した。接種後、25°C で 24 時間静置培養を行ったのち、菌体の増殖性を 630 nm の吸光度を測定して行うとともに、前述の方法で培養ろ液中の溶血活性を測定した。

培養ろ液中の溶血物質の安定性 1.5% NaCl を含む栄養寒天培地 (日水製薬) を用いて作製したスラントに接種して、25°C で 48 時間前培養した供試菌体の 1 白金耳量を Na-BHI に接種した。接種後、25°C で 24 時間静置培養を行ったのち、前述の方法で培養ろ液試料を調製した。これを滅菌した試験管に 5 ml ずつ分注し、-80, -40, -20, -5, 4, 10, 15, 25, 30, 36°C の各温度で保存して 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 70 日後に溶血活性を前述の方法で測定した。

溶血物質の産生に及ぼす培養温度の影響 Na-BHI 培地に栄養寒天培地を用いて作製したスラントに接種して、25°C で 48 時間培養した供試菌体の 1 白金耳量を接種して 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40°C の各温度で 24 時間培養したのち、培養ろ液中の溶血活性を前述の方法で測定した。

溶血物質の産生に及ぼす塩分の影響 塩分を 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9% に調製した Na-BHI 培地に 1.5% の NaCl を含む栄養寒天培地を用いて作製したスラントに接種して、25°C で 48 時間前培養した供試菌体の 1 白金耳量を各培地に接種して 30°C で 24 時間培養したのち、培養ろ液中の溶血活性を前述の方法で測定した。

溶血物質の産生に及ぼす培地の pH の影響 1 N NaOH および 1 N の HCl を用いて pH を 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9 に調製した Na-BHI 培地に 1.5% の NaCl を含む栄養寒天培地を用いて作製したスラントに接種して、25°C で 48 時間前培養した供試菌体を 1 白金耳量を各培地に接種して 30°C で 24 時間培養したのち、培養ろ液中の溶血活性を前述の方法で測定した。

溶血物質の産生に及ぼす培養時間の影響 Na-BHI 培地に 1.5% の NaCl を含む栄養寒天培地を用いて作製したスラントに接種して、25°C で 48 時間前培養した供試菌体の 1 白金耳量を接種して 30°C で 0, 0.5, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 36, 48, 72, 96 時間培養したのち、培養ろ液中の溶血活性、培地のタンパク量、菌の増殖性および生菌数を前述の方法で測定した。

溶血物質の産生に及ぼす各種物質の影響 0.05~2% の範囲内のグルコース、酵母エキス、シ

ステイン、チオ硫酸ナトリウム、フェリシアン化カリウム、Tween 80 およびトリプシンのそれぞれを添加した Na-BHI に 1.5% の NaCl を含む栄養寒天培地を用いて作製したスラントに接種して、25°C で 48 時間前培養した供試菌体の 1 白金耳量を接種して 30°C で 24 時間培養したのち、前述の方法で菌の増殖性および溶血活性を測定した。

溶血物質の産生に及ぼす各種金属イオンの影響 2 mM の Ag^+ 、 Li^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} のそれぞれを添加した Na-BHI に 1.5% の NaCl を含む栄養寒天培地を用いて作製したスラントに接種して、25°C で 48 時間前培養した供試菌体の 1 白金耳量を接種して 30°C で 24 時間培養したのち、前述の方法で溶血活性を測定した。

結 果

各種液体培地中での溶血物質の産生量を比較した結果は Table 6 に示すとおりである。各液体培地中の菌の増殖性は BHI, TH, SM, TSB, HI, NB, GAM の順となったが、溶血物質の産生量は BHI が最も高く、ついで TH, HI, NB, TSB, SM, GAM の順となり、溶血物質の産生性と菌の増殖性には相関は認められなかった。

培養ろ液中の溶血物質の安定性を検討した結果は Table 7 に示すとおりである。培養ろ液中の

Table 6. Hemolytic activity of culture filtrate of *Photobacterium phosphoreum* 23-1 grown in various media

Media (broth)	Absorbance (630 nm)	Hemolytic activity (units/ml)
Brain heart infusion	0.610	512
Todd-Hewitt	0.538	256
Heart infusion	0.278	256
Nutrient	0.236	128
Tryptic soy	0.356	128
Synthetic medium	0.521	128
GAM	0.220	32

Table 7. Stability of hemolytic activity in culture filtrates of *Photobacterium phosphoreum* at various temperatures

Temperature (°C)	Days of preservation									
	0	0.5	1	3	7	14	21	28	35	70
36	512	128	16	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4
30	512	512	512	256	256	32	<4	<4	<4	<4
25	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512
15	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512
10	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512
4	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512
-5	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512
-20	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512
-40	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512
-80	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512

溶血物質は $-80 \sim -20^{\circ}\text{C}$ では70日後まで、 $-5 \sim 30^{\circ}\text{C}$ では35日後までは活性が変化しなかったが 30°C 以上では3日後から活性が低下した。

溶血物質の産生に及ぼす培養温度の影響を検討した結果は Fig. 10 に示すとおりである。菌の増殖性は $10 \sim 37^{\circ}\text{C}$ にかけては、培養温度が上昇するにつれて上昇したが、 40°C では低下する傾向を示し、至適増殖温度は 37°C 付近となった。溶血物質の産生性は菌の増殖性が高まるにつれて上昇する傾向が認められ、至適産生温度は 37°C 付近であった。

溶血物質の産生に及ぼす塩分の影響を検討した結果は Fig. 11 に示すとおりである。菌の増殖性は塩分が3%までは、塩分が上昇するにつれて上昇したが、それ以上では塩分の上昇につれて低下する傾向を示し、至適増殖塩分は3%付近となった。溶血物質の産生性は菌の増殖性が高まるにつれて上昇する傾向が認められ、至適産生塩分は3%付近であった。

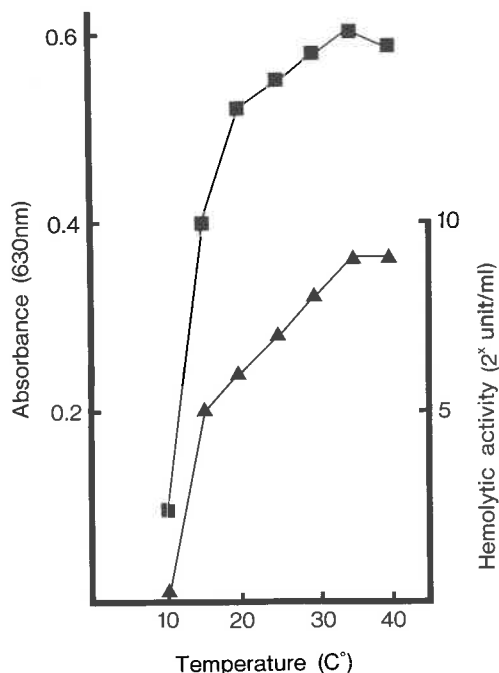


Fig. 10. Hemolytic activity of the culture filtrates of *Photobacterium phosphoreum* strain 23-1 at various cultivated temperatures. \blacksquare : viable cells, \blacktriangle : hemolytic activity.

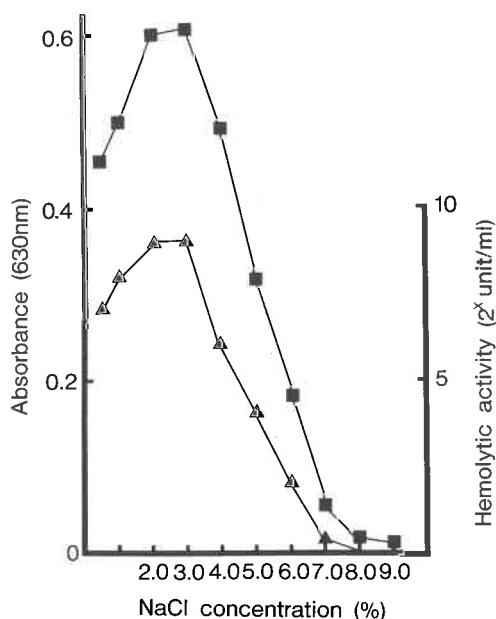


Fig. 11. Hemolytic activity of the culture filtrates of *P. phosphoreum* strain 23-1 at various concentrations of NaCl in BHI broth. \blacksquare : viable cells, \blacktriangle : hemolytic activity.

溶血物質の産生に及ぼす培地の pH の影響を検討した結果は Fig. 12 に示すとおりである。菌の増殖性は培地の pH が $6.0 \sim 8.5$ の間では、変化は認められなかったが、それ以下あるいは以上では低下する傾向を示し、至適増殖 pH は $6.0 \sim 8.5$ 付近となった。溶血物質の産生性も菌の増殖性と同様の傾向を示し、至適産生 pH は $6.0 \sim 8.5$ 付近であった。

溶血物質の産生に及ぼす培養時間の影響を検討した結果は Fig. 13 に示すとおりである。生菌数は培養6時間後から増加しはじめて、6～18時間後まで対数増殖期、18～42時間後までが定常期となったが、それ以後は減少する傾向を示した。培地の pH は対数増殖期から定常期の初期ま

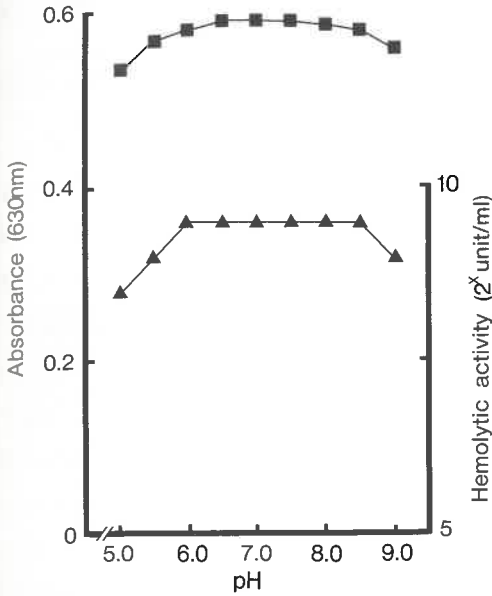


Fig. 12. Hemolytic activity of the culture filtrates of *P. phosphoreum* strain 23-1 at various cultivated pH. ●: viable cells, ▲: hemolytic activity.

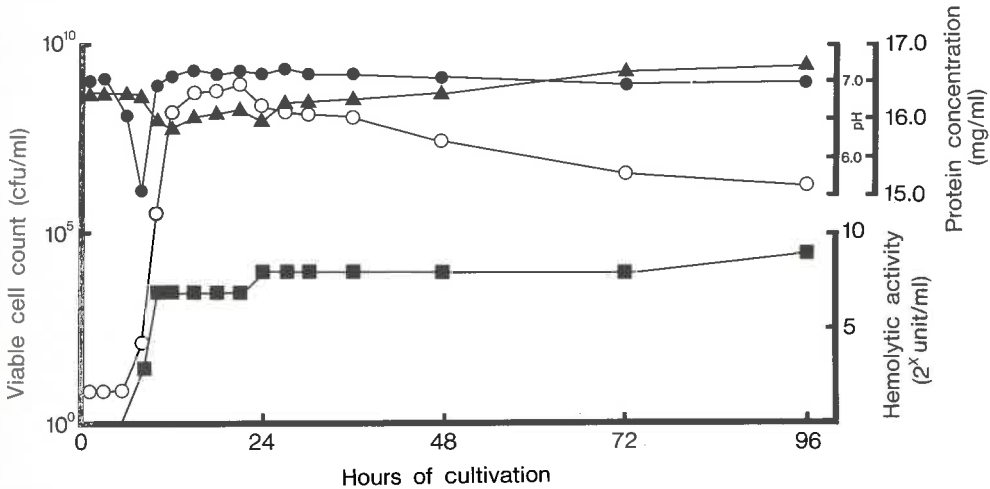


Fig. 13. Changes in hemolytic activity, protein concentration and pH of culture filtrate of *P. phosphoreum* strain 23-1 during cultivation. ■: hemolytic activity, ●: protein concentration, ▲: pH, ○: viable cells count.

では低下したが、それ以後は経時的に上昇した。培地中のタンパク量は対数増殖期の初期には減少したが、それ以後はほぼ一定の値を示した。培養液中の溶血活性は対数増殖期に入るとともに上昇したが、それ以後の上昇率は低くなった。

溶血物質の産生に及ぼす培地に添加した各種物質の影響を検討した結果は Table 8 に示すとおりである。0.05~2%の範囲内のグルコース、酵母エキス、システイン、チオ硫酸ナトリウム、フェリシアン化カリウムおよび Tween 80 には対照と比較して、溶血物質の産生性を増加させる物質は認められなかった。トリプシンを添加することによって活性は消失した。

溶血物質の産生に及ぼす各種金属イオンの影響を検討した結果は Table 9 に示すとおりである。Ca²⁺、Mg²⁺、Ag⁺、Li⁺、Co²⁺ および Mn²⁺ を培地に添加することによって、対照と比較して

Table 8. Hemolytic activity of *P. phosphoreum* 23-1 culture filtrate from BHI broth culture plus various substances

Substances	Concentration (%)	Absorbance (630 nm)	Hemolytic activity (units/ml)
Glucose	2.0	0.558	256
	1.0	0.597	256
	0.5	0.622	512
Yeast extract	2.0	0.507	128
	1.0	0.567	256
	0.5	0.590	512
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	0.558	128
	0.05	0.573	256
	0.01	0.616	512
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	0.622	512
	0.05	0.600	512
	0.01	0.602	512
Cystein	0.5	0.651	512
	0.2	0.573	512
	0.1	0.552	512
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	0.2	0.616	256
	0.1	0.601	256
	0.05	0.569	256
K ₄ Fe(CN) ₆ ·3H ₂ O	0.1	0.538	128
	0.05	0.549	128
	0.01	0.617	256
Tween 80	0.5	0.552	256
	0.25	0.562	256
	0.1	0.573	256
Trypsin	0.25	0.402	0
	0.1	0.432	0
	0.05	0.432	0

Table 9. Hemolytic activity of *Photobacterium phosphoreum* 23-1 culture filtrate from BHI broth culture plus various metal ions

Metal ion	Concentration (mM)	Relative hemolytic activity (%)
Ag ⁺	2	107.8
Li ⁺	2	105.1
Ca ²⁺	2	132.6
Mg ²⁺	2	124.4
Co ²⁺	2	100.8
Mn ²⁺	2	100.3
Ni ²⁺	2	85.3
Fe ²⁺	2	80.7
Zn ²⁺	2	77.2
Pb ²⁺	2	75.4
Control	0	100.0

溶血物質の産生性が上昇したが、それ以外のイオンでは産生性を阻害する傾向を示した。

考 察

一般に、菌体の産生する各種生理活性物質を精製するためには、複数の操作を繰り返すことによって活性物質の損失が大きいので、精製の出発材料の活性をなるべく高める方がよく、その目的のために目標とする物質の産生性の高い菌株を選択することの他に、その物質の至適産生条件を求める必要があるとされている (加藤他 1984)。

本節では *P. phosphoreum* の溶血物質の産生における培養条件の検討に先だて、培地の種類から検討を行った。その結果、*P. phosphoreum* では用いた培地の中では菌の増殖性は BHI が最も高く、また、溶血物質の産生性も最も良好であった。しかし、溶血性連鎖球菌の溶血物質の精製のために用いられた SM では、菌の増殖性が高かったにもかかわらず、溶血物質の産生性は悪かった。この現象は TSB と HI の間にも認められた。同様な現象は他の細菌でも認められており、KAWAHARA *et al.* (1989) はブリから分離した β 溶血性 *Streptococcus* sp. を用いた実験では TH では BHI と比較して菌の増殖性は低かったが、溶血物質の産生性は高かったと報告している。TH は TODD and HEWITT (1932) によって報告された溶血性連鎖球菌の溶血物質の産生用に調製された培地であることから、溶血物質の産生用に培地成分が調製されているためによるものと思われる。また、小原 (1971) は *Vibrio parahemolyticus* の溶血物質の産生性は BHI がよいとしている。しかし、太田 (1975) は *V. parahemolyticus* の溶血物質の産生性は BHI よりも MW 培地や 2% ペプトン水のほうが良かったとしており、その原因として使用したペプトンのロット差によるのではないかとしている。このように、培地成分の種類や構成によって溶血物質の産生が異なるとされていることから、本節で認められた菌の増殖性と溶血物質の産生性の差異は本菌の溶血物質産生に及ぼすそれぞれの培地成分の違いによるものと考えられるが、本菌においては BHI 中では菌の増殖性および溶血物質の産生性の両方ともよいと思われる。したがって、BHI を用いて培養温度、塩分および pH の差異による菌の増殖性および溶血物質の産生性は相関を示し、菌の増殖性がよい条件では溶血物質の産生性はよい結果となった。また、本菌の産生する溶血物質は 30°C 以下の温度では 35 日後まで活性の低下が認められなかった。溶血物質の中には溶血性連鎖球菌の産生するストレプトリジン O (SLO) のように空気中の酸素によって活性が低下するものもあるが、本菌の溶血物質はこれとは異なり、空気中の酸素によって失活せず、安定性が高いと思われる。

本菌の溶血物質の産生性はその対数増殖期に最も多いことが明かとなった。多くの細菌の生理活性物質は培養条件が良好な時は対数増殖期および定常期初期に産生されることが知られている (加藤 1988)。代表的な溶血物質に限れば溶血性連鎖球菌のストレプトリジン O (小山 1972) が対数増殖期、溶血性連鎖球菌のストレプトリジン S (SLS: 小山 1972)、*Aeromonas hydrophila* のヘモリジン (THUNE *et al.* 1986)、*Staphylococcus aureus* の α ヘモリジン (WATANABE and KATO 1974) などは定常期以降に活性が最大となるとされている。本菌では SLO などと同様に、本菌の対数増殖期に産生され、安定性が高いことから培地中に蓄積されていくものと思われる。

BHI 培地を基礎として、各種添加物の影響を調べた結果、グルコース、酵母エキス、システイン、チオ硫酸ナトリウム、フェリシアン化カリウムおよび Tween 80 の添加によって、溶血物質の産生性の上昇は認められず、トリプシンの添加によって活性は消失した。SLS は酵母エキス (小山 1972) および Tween 80 (GINSBURG *et al.* 1963) を添加することによって産生性が上昇するとされているが、本物質ではその傾向は認められなかった。本物質のトリプシンの添加による活性の消失は本物質自体がトリプシンに感受性があるか、あるいは井上 (1982) が *Moraxella bovis* の溶血物質で報告しているように、溶血物質自体がトリプシンに耐性があっても、その前駆物質がトリプシン感受性である場合には、培地中にトリプシンが存在するときは活性が消失することによるもののどちらかの理由によるものと思われる。

本菌の溶血物質は培地中に添加した金属イオンのうち Ca^{2+} および Mg^{2+} の添加によって活性の上昇が大きい結果となった。また、本物質はトリプシンに感受性を示し、タンパク質で構成されると思われることから、 Zn^{2+} および Pb^{2+} の添加による溶血活性の低下はこれらのイオンのタンパク沈澱効果によるものと考えられる。

以上の結果から、*P. phosphoreum* の産生する溶血物質の培養至適条件をまとめると次のようになる。培地は BHI が菌の増殖性および溶血物質の産生性ととも良好であることから本培地が適当と思われる。培養温度は産生至適温度が 37°C 付近であるが、この温度では溶血物質の安定性が低下するので、失活のより少ない 30°C 以下のほうが溶血物質の収量がよいと思われる。培地の塩分は高いと赤血球の収縮による溶血活性測定時の影響があるので、低い方がよいと思われることから 2% が適当と考えられる。培地の pH は 6.0~8.5 の間では溶血物質の産生性に影響がないことから、BHI 培地の pH である 7.0~7.2 でよいと思われる。培養時間は 24 時間で十分であると思われる。

第 5 節 *Photobacterium phosphoreum* の産生する溶血物質の精製とその特性

前節までに *P. phosphoreum* はクロマグロに対して条件性病原体となり、病原因子として溶血物質を産生することが明かとなった。しかし、本菌の溶血物質の物理・化学的性状についてはこれまでに検討されていない。

そこで、本研究では *P. phosphoreum* 23-1 株の産生する病原因子の 1 つと考えられる溶血物質の精製品を用いて、分子量、反応至適 pH および温度、熱安定性、各種添加物や酵素処理の影響、金属イオンの影響およびブリ稚魚に対する致死性を調べ、本菌の起病性を毒素レベルから検討した。

実験方法

供試菌株 高知県宿毛湾で養成中のクロマグロ斃死魚の腎臓から分離した *P. phosphoreum* 23-1 株を用いた。

培養ろ液試料の調製 供試菌株を Na-BHI 培地で 25°C 、24 時間培養したのち 1,000×g の遠心操作によって培養上清を回収し、 $0.22\ \mu\text{m}$ のミリポアフィルターでろ過して培養ろ液試料とした。

塩析方法 塩析にはエタノール、アセトンおよび水酸化ナトリウム溶液で pH を 7.2 に調製した塩化アンモニウム飽和溶液（飽和硫酸液）を用いた。上記の方法で調製した培養ろ液をマグネチックスターラーで攪拌しながらエタノール、アセトンおよび飽和硫酸溶液をそれぞれ 35, 50, 65, 80% の濃度になるまで滴下した。各濃度に達したのち、4°C で 1,500×g の遠心操作を 30 分間行い沈澱を回収した。沈澱の再溶解には PBS を用いた。

ゲルろ過 カラムには内径が 15 mm 高さが 1000 mm のガラス管を用いた。ろ過剤には PBS で膨潤させた Sephadex G-200 および G-75（いずれも Pharmacia）を用いた。流速は Sephadex G-200 のときは毎時 8 ml, G-75 のときは毎時 10 ml とし、溶出は各試験管ごと 3 ml とした。また、いずれのカラムも使用前にはブルーデキストラン（Pharmacia）を用いてあらかじめボイドボリュームを測定した。試料はろ過に先だって PBS で 1 昼夜透析したのちカラムに添加した。

イオン交換クロマトグラフィー カラムには内径が 25 mm, 高さが 1000 mm のガラス管を用

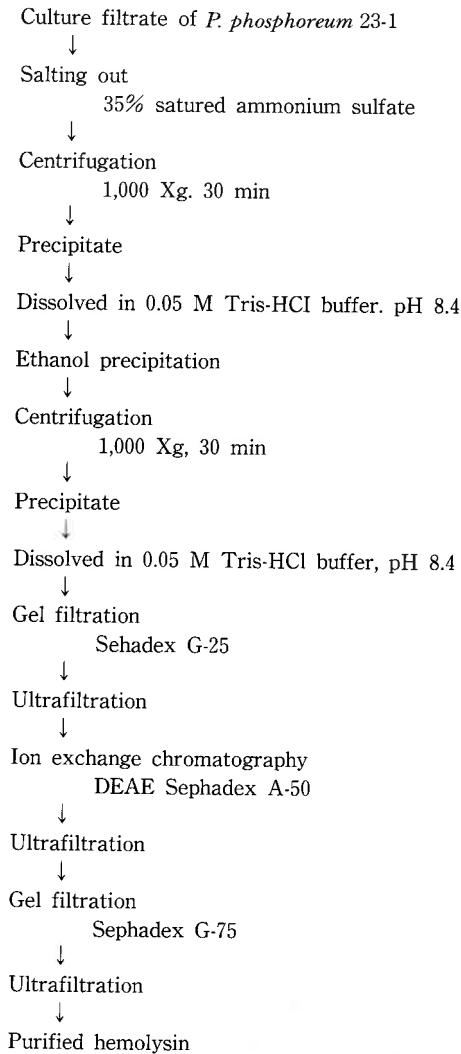


Fig. 14. Method for purification of hemolysin from *P. phosphoreum* strain 23-1.

いた。イオン交換体には 0.05 M のトリス-塩酸緩衝液で膨潤させた DEAE Sephadex A-50 (Pharmacia) を用いた。操作時の pH はあらかじめ少量のサンプルによるバッジ法によって求めた。溶出は塩化ナトリウムの濃度を直線的に変化させて行った。

限外ろ過 UM-20 (Amicon) を用いて行った。

溶血物質の精製 Fig. 14 に示す方法によって行った。すなわち、供試菌株を 1.5% NaCl 加 BHI broth (Difco) を用いて、30°C で 24 時間培養したのち、遠心分離とろ過によって除菌した培養液を出発材料として 35% 飽和硫酸沈澱法、限外ろ過、DEAE Sephadex A-50 (Pharmacia) によるイオン交換クロマトグラフィー、限外ろ過、Sephadex G-75 (Pharmacia) によるゲルろ過、限外ろ過の順に行った。

溶血活性の測定 ヒツジ赤血球を用いて、MUNN (1978) の方法によって行った。まず、ヒツジ赤血球を PBS で洗浄したのち、等量の 0.025% ラウリル硫酸ナトリウム水溶液で完全溶血させた時の 540 nm の吸光度が 0.8 となるように同液に懸濁した。この赤血球懸濁液と PBS で 2 倍階段希釈した溶血物質を 1:2 の割合で混合し、30°C で 1 時間反応させた。反応後、400×g で 10 分間の遠心操作を行い、上清の 540 nm の吸光度を測定し、50% 以上の溶血率を示す最大希釈倍数を unit として表記した。

タンパク量の測定 LOWRY (1951) の方法によって行い、標準タンパク質として用いたウシ血清アルブミン量に換算した。

分子量の測定 SDS 電気泳動とゲルろ過の 2 法によって行った。SDS 電気泳動は WEBER (1969) の方法に従い、ウシ血清アルブミン (分子量 68,000)、卵白アルブミン (分子量 45,000)、キモトリプシノーゲン (分子量 25,000)、チトクローム C (分子量 12,500) をマーカーとして用いて行った。ゲルろ過は Sephadex G-200 (Pharmacia) をろ過材として分子量測定キット (Combethick) を用いて行った。

反応至適 pH 緩衝液には酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液、リン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液およびグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液を用い、反応時の pH が 5.0~10.0 の範囲でそれぞれ異なるように調製した。そして、前述の方法により溶血活性を測定し、異なる pH での溶血活性の変化を検討した。

反応至適温度 反応温度を 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50°C の各温度とし、前述の方法で溶血活性を測定し、異なる温度での活性の変化を検討した。

温度安定性 精製溶血物質を pH 7.4 の PBS 中で 30, 35, 38, 40, 43, 45, 50, 56, 60, 90, 100°C の各温度で 10, 30 および 60 分間加熱したのち急冷し、前述の方法で溶血活性を測定し、各温度における残存溶血活性を測定した。

各種添加物の影響 16 unit の濃度の精製溶血物質を溶解した pH 7.4 の PBS に EDTA, ヨード酢酸, シアン化カリウム, 過マンガン酸カリウム, L-システイン, クエン酸ナトリウム, 2-メルカプトエタノール, トリクロル酢酸, ホルマリンをそれぞれ 1 mM となるように添加して、30°C で 30 分間反応させた。反応後、前述の方法で溶血活性を測定し、無添加の場合の溶血活性を 100% として各種添加物質の影響を調べた。

各種酵素処理の影響 16 unit の濃度の精製溶血物質を溶解した pH 7.4 の PBS にトリプシン、ババイン、リボヌクレアーゼ、アミラーゼ、リパーゼをそれぞれ 0.5 mg/ml の濃度となるように添加し、30°C で30分間反応させた。反応後、前述の方法で溶血活性を測定して、未処理の場合の溶血活性を 100% として、酵素処理の影響を調べた。

各種金属イオンの影響 16 unit の濃度の精製溶血物質を溶解した pH 7.4 の PBS に 1 mM の炭酸リチウム、塩化銀、塩化カルシウム、塩化水銀、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化コバルト、硫酸マンガン、硫酸銅、酢酸鉛、塩化亜鉛、塩化アルミニウム、硫酸鉄、塩化ニッケル、塩化鉄をそれぞれ添加し、30°C で30分間反応させた。反応後、前述の方法で溶血活性を測定して、無添加の場合の溶血活性を 100% として各種金属イオンの影響を調べた。

魚に対する致死性 体重 12~23 g のブリ稚魚の筋肉内に溶血物質を 1 尾あたり 0.1, 0.05, 0.025 mg 接種して、10 日間にわたって斃死状況を観察した。対照には滅菌 PBS を同様に接種した。

結 果

P. phosphoreum の培養ろ液を Sephadex G-200 でゲルろ過をしたときの溶出パターンは Fig. 15 に示すとおりである。溶血活性のピークは溶出量 54 ml および 108 ml の 2 部分で認められた。そのうち、後半のピークのほうが活性値が高かった。また、DEAE Sephadex A-50 を用いた予備試験の結果、溶血物質は pH 8.4 で交換体に結合した。これらの結果から、本物質の精製方法は Fig. 14 に示す方法で行った。

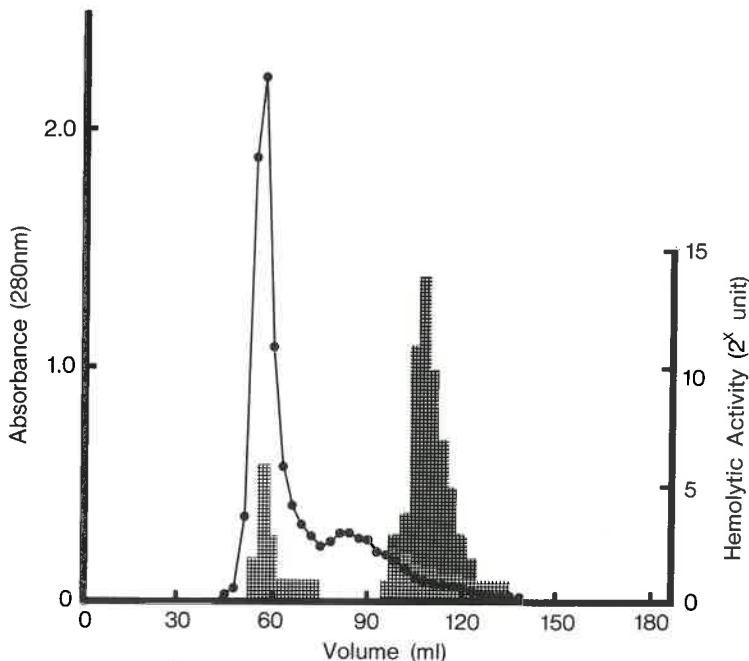
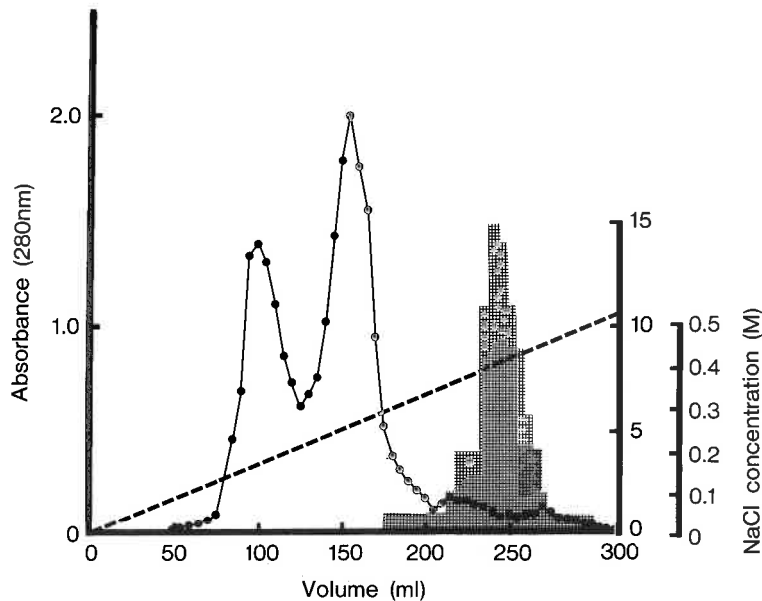


Fig. 15. Elution pattern of partially purified hemolysin from *P. phosphoreum* strain 23-1 by Sephadex G-200.

Table 10. Comparison of the hemolytic activity of the material at various steps of purification of the culture filtrate of *Photobacterium phosphoreum* strain 23-1

Fraction		Hemolytic activity (unit/ml)	Total activity (unit)	Protein (mg/ml)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)
Ethanol	35%	512	2345	9.53	53.7	61.1
	50%	32	154	20.75	1.5	4.0
	65%	8	35	51.05	0.2	0.9
	80%	—	—	72.60	—	—
Acetone	35%	16	75	7.71	2.1	2.0
	50%	4	18	9.47	0.4	0.5
	65%	—	—	28.77	—	—
	80%	—	—	46.19	—	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	35%	1024	3348	7.10	144.2	86.9
	50%	1024	3502	18.96	54.0	91.2
	65%	1024	3614	31.43	32.6	94.1
	80%	512	2186	50.80	20.2	56.9
Culture filtrate		128	3840	19.82	6.5	100.0

各精製段階の溶血活性の変化は Table 10 に示すとおりである。この操作の過程の DEAE Sephadex A-50 および Sephadex G-75 の溶出パターンは Fig. 16 および Fig. 17 にそれぞれ示すとおりである。今回用いた精製方法ではタンパク 1 mg あたりの比活性2,285倍に上昇し、溶血物質の収率は40%であった。精製溶血物質の純度を SDS ポリアクリルアミド電気泳動によって検討したところ、単一のバンドを示した。溶血物質の分子量は SDS 電気泳動により約 48,000、ゲルろ過により約 47,000 と推定された。


Fig. 16. Elution pattern of partially purified hemolysin from *P. phosphoreum* strain 23-1 by DEAE Sephadex A-50.

精製溶血物質の反応至適 pH を調べた結果は Fig. 18 に示すとおりである。各緩衝液の間で pH が重複する範囲では、使用した緩衝液の種類によって活性に差異が認められた。しかし、pH 8.0~9.0 の範囲で最も高い活性を示した。

精製溶血物質の反応至適温度を調べた結果は Fig. 19 に示すとおりである。溶血活性は反応温

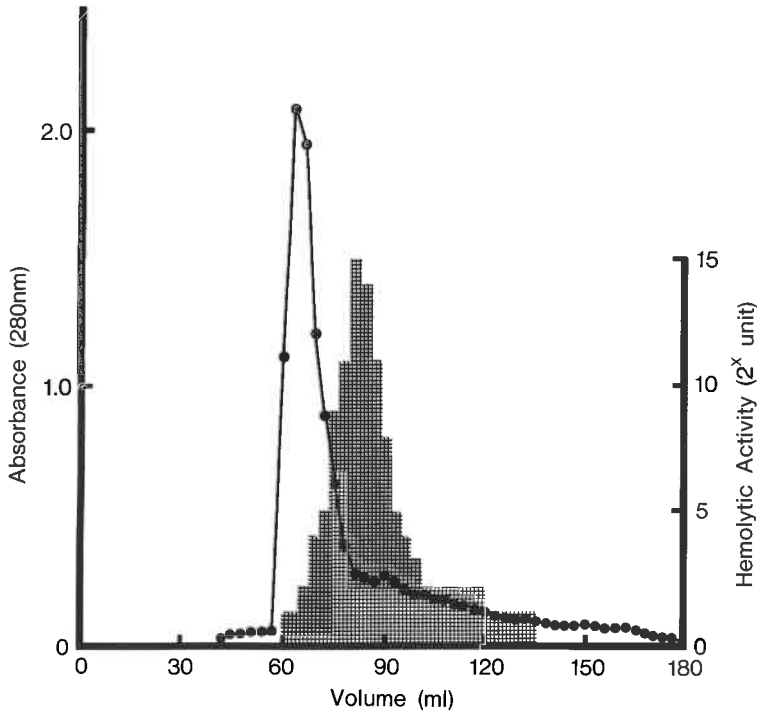


Fig. 17. Elution pattern of the partially purified hemolysin from *P. phosphoreum* strain 23-1 by Sephadex G-75.

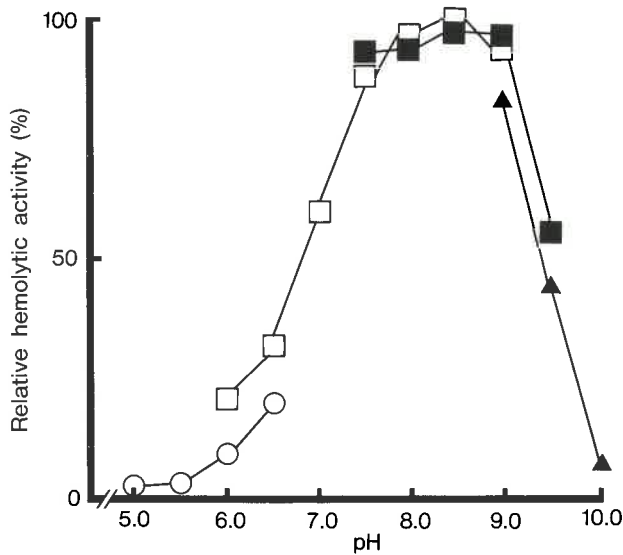


Fig. 18. Effect of pH on hemolytic activity of purified hemolysin from *P. phosphoreum* strain 23-1. ○: CH₃COONa-CH₃COOH buffer, □: Na₂HPO₄-KH₂PO₄ buffer, ■: Tris-HCl buffer, ▲: glycine-Na₂CO₃ buffer.

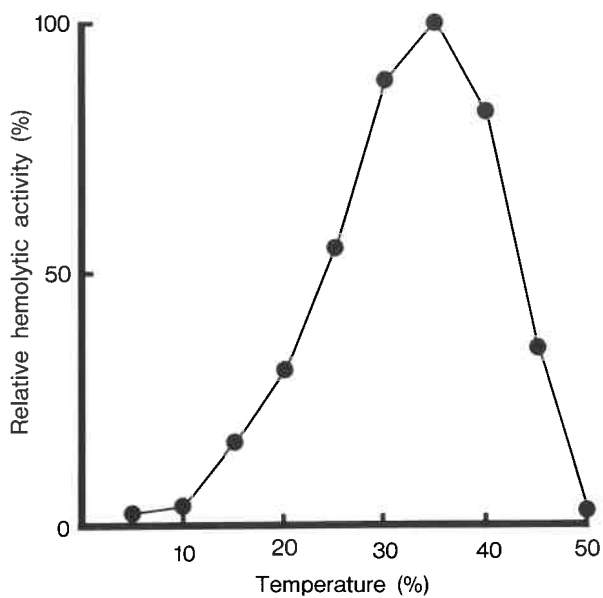


Fig. 19. Effect of temperature on hemolytic activity of purified hemolysin from *P. phosphoreum* strain 23-1.

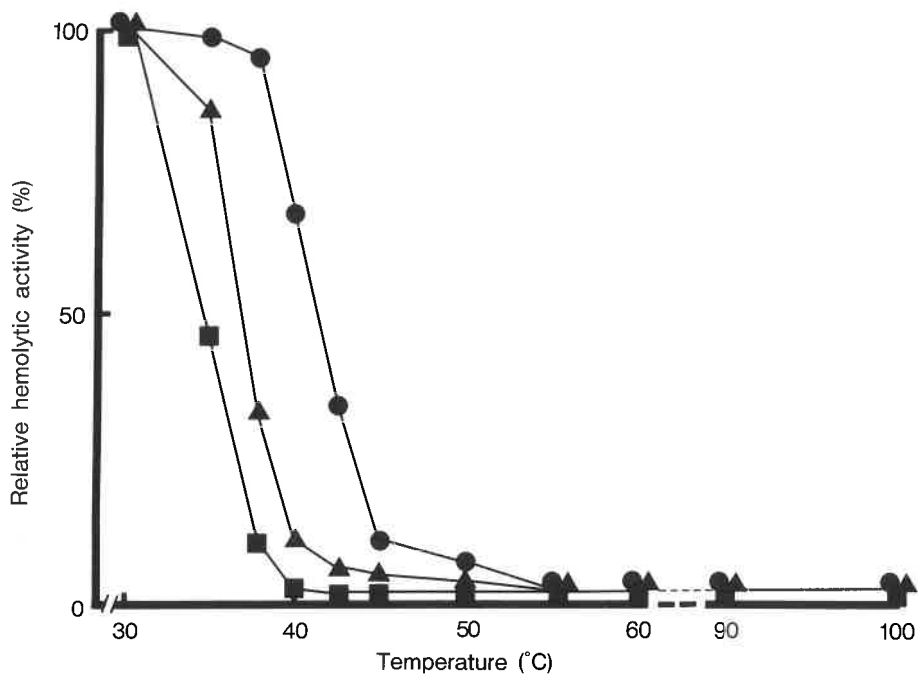


Fig. 20. Thermostability of purified hemolysin from *P. phosphoreum* strain 23-1. ●: 10 min, ▲: 30 min, ■: 60 min.

度を 35°C とした場合に最も高く、それ以上では急激に低下した。

精製溶血物質の熱安定性を調べた結果は Fig. 20 に示すとおりである。溶血活性は 45°C で 10 分間加熱することによって 90% 以上消失し、それ以上の温度では完全に消失した。

溶血活性に及ぼす各種添加物の影響は Table 11 に示すとおりである。溶血活性は EDTA、過

マンガン酸カリウム, トリクロル酢酸, ホルマリンにより溶血活性は低下した。

溶血活性に及ぼす各種酵素処理の影響は Table 12 に示すとおりである。溶血活性はトリプシンおよびパパインによって低下した。

溶血活性に及ぼす金属イオンの影響は Table 13 に示すとおりである。溶血活性は Hg^+ , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} によって阻害されたが, Li^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} では促進された。

精製溶血物質のブリ稚魚に対する致死性を調べた結果は Table 14 に示すとおりである。各10尾の供試魚のうち, 1尾あたり 0.1 mg 接種区では4尾, 0.05 mg 接種区では2尾がへい死したが, 0.025 mg 接種区と対照区では斃死は認められなかった。

Table 11. Effect of various substances on activity of purified hemolysin from *Photobacterium phosphoreum* strain 23-1

Substances	Concentration (mM)	Relative activity (%)
EDTA-2Na	1	12.4
CH_2ICOOH	1	95.6
KCN	1	89.5
KMnO_4	1	5.6
L-Cysteine	1	97.8
Na-Citrate	1	115.6
2-Mercaptoethanol	1	45.6
TCA	1	12.6
HCHO	1	13.4
Control	0	100.0

Table 12. Effect of various enzymes on activity of purified hemolysin from *Photobacterium phosphoreum* strain 23-1

Enzyme	Concentration (IU)	Relative activity (%)
Trypsin	5	5.6
Papain	5	7.6
Pepsin	5	8.8
RNase	5	89.5
Amylase	5	97.6
Lipase	5	87.7
Control	0	100.0

Table 13. Effect of metal ion on activity of purified hemolysin from *Photobacterium phosphoreum* strain 23-1

Metal ion	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Li^+	1	114.6
Ag^+	1	107.9
K^+	1	107.5
Hg^+	1	1.1
Ca^{2+}	1	114.1
Mg^{2+}	1	106.6
Mn^{2+}	1	102.9
Co^{2+}	1	76.6
Fe^{2+}	1	8.2
Ni^{2+}	1	3.5
Cu^{2+}	1	1.9
Pb^{2+}	1	1.4
Zn^{2+}	1	0.5
Al^{3+}	1	5.9
Fe^{3+}	1	0.5
Control	0	100.0

Table 14. Mortality of yellowtail injected with purified hemolysin from *Photobacterium phosphoreum* strain 23-1

Dose (mg/fish)	Number of tested fish	Number of dead fish	Mortality (%)
0.1	10	5	50
0.05	10	2	30
0.025	10	0	0
0	10	0	0

考 察

Photobacterium phosphoreum の溶血物質の精製方法については本菌の培養液中の溶血物質の大半が35%の飽和硫酸濃度で沈澱することから第1段階として飽和硫酸による塩析方法を用いた。ついで、Sephadex G-200 によるゲル濾過の結果から本物質の分子量が100,000 ダルトン以下であることが推測されたので DEAE Sephadex A-50 および Sephadex G-75 を選択した。さらに、ゲル濾過およびイオン交換にともなう試料の希釈があるので、それぞれの操作の後、限外濾過を行った。これらの方法を組み合わせて、本物質の精製を行った。これらの方法によって *Photobacterium phosphoreum* 23-1 株の産生する溶血物質を精製してその特性を調べた結果、分子量は約47,000~48,000 であり、反応至適 pH および温度はそれぞれ 8.5, 35°C 付近であった。この物質は極めて易熱性であり、トリクロル酢酸、ホルマリン、トリプシン、パパインなどによる前処理によって活性が低下することから、タンパク質を主成分とするのではないかと考えられる。また、EDTA による前処理によって活性が低下し、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} の添加によって活性が促進されることから、生体内に比較的大量に存在するこれらの金属イオンが本物質の溶血現象の発現に関与するものと考えられる。生理活性の発現に Ca^{2+} および Mg^{2+} が関与する溶血物質には *Clostridium perfringens* の α -ヘモリジンが知られている。この溶血物質はフォスフォリパーゼであり、 Ca^{2+} および Mg^{2+} の添加によって赤血球膜上のリン脂質を分解することによって溶血活性を発現する。本菌の溶血物質もこのような物質に類似した作用で溶血を発現するのではないかと考えられる。

これまでに *Photobacterium phosphoreum* の産生する溶血物質の研究はなされていないが、本属と近縁である *Vibrio* 属や *Aeromonas* 属の産生する溶血物質については多くの知見がある。まず、ビブリオ属では、三輪谷 (1982) が *V. parahemolyticus* の耐熱性溶血物質は分子量 42,000 であり、ペプシン、 α -キモトリプシンおよびナガーゼによって失活するが熱に対しては安定で Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} によって活性が促進されると報告している。LARRY and KREGER (1985) は *V. vulnificus* の溶血物質は分子量 56,000 であり、56°C で10分間の加熱によって活性は消失するが、各種プロテアーゼに対しては比較的耐性があるとしている。MUNN (1980) は *V. anguillarum* の溶血物質は 4~37°C の間では 37°C で最も活性が高く、56°C で10分間の加熱処理によって活性が消失するとしている。いっぽう、*Aeromonas* 属細菌では THUNE *et al.* (1986) は *A. hydrophyla* の B-hemolysin を精製し、分子量 51,000 であったとしている。*A. salmonicida* の溶血物質に関しては多数の報告があるが、近年 NOMURA *et al.* (1988) によって精製された hemolysin は高分子の glycoprotein からなる物質であるとしている。これらの報告と本菌の溶血物質を比較すると、*V. parahemolyticus* の耐熱性溶血物質および *A. hydrophyla* の B-hemolysin と分子量、各種プロテアーゼに対する感受性、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} および Mn^{2+} によって活性が促進されるなどの類似性がある。しかし、温度安定性は異なり本菌の溶血物質は *V. vulnificus*、*V. anguillarum* と同様に易熱性である。また、本菌の溶血物質には *V. parahemolyticus* の耐熱性溶血物質の特徴の一つである Arrhenius 効果は認められなかった。

魚病細菌の産生する物質の魚に対する致死性については多くの研究者によって検討されている。

INAMURA *et al.* (1984) はキンギョに対する *V. anguillarum* の菌体外プロテアーゼの致死量は魚体重 1 g あたり 80 μ g としている。SHIEH (1982) は Atlantic salmon に対する *A. salmonicida* の菌体外プロテアーゼの致死量は魚体重 1 g あたり 140 μ g としている。また、NOMURA *et al.* (1988) は精製した salmolsin のニジマス稚魚に対する致死活性を報告している。THUNE *et al.* (1981) は channel catfish に対する *A. hydrophila* の菌体外プロテアーゼの LD₅₀ は魚体重 1 g あたり 19 μ g としている。それらに比べると弱いと思われるが、本菌の溶血物質もブリ稚魚に対して致死性を示すことから、病原因子の一つとして作用しているものと考えられる。しかし、溶血活性はブリよりクロマグロの赤血球に対して高く、ブリよりもクロマグロに対して高い致死活性を持つものと思われたが、本実験期間中にはクロマグロが採捕されなかったので測定できなかった。

以上の結果から、*Photobacterium phosphoreum* の産生する溶血物質は比較的分子量で安定性が高く、Ca²⁺ および Mg²⁺ によって活性が促進される物質であることが明かとなった。

第6節 総合考察

P. phosphoreum は養殖クロマグロの腸内、餌料および海水中から分離されたことから、環境中に常在し、その1部がクロマグロの腸管内に侵入して腸内細菌相を構成していることが明かとなった。とくに、人為的な飼育を行っていない捕獲直後のクロマグロ幼魚では腸内細菌の大部分を本菌が占めていたことから、本魚種の正常腸内細菌相の構成菌と考えられる。しかし、本菌の分離比率は養殖開始とともに低下し、また養殖過程で発生した病魚の腸管でも低下する傾向が認められた。腸内細菌は消化、微量栄養素の産生および病原体の増殖防止などの作用が知られており、生体の健康状態の維持に関与している。したがって、クロマグロの腸内細菌相が養殖および疾病によって変化することは、魚体にとって不利な条件が生じ、このような状態での飼育が継続すると、魚体の活力や抵抗力が低下して各種疾病が生じる可能性が上昇するのではないかと考えられる。

いっぽう、病魚の臓器から分離された *P. phosphoreum* は腸内、餌料および海水分離株と比較して溶血物質の産生能が高かった。この溶血物質は分子量が約 47,000~48,000 程度のタンパク質によって構成されており、易熱性であり Ca²⁺ および Mg²⁺ によって活性が促進された。さらに、ブリに対して致死性が認められたことから、魚類に対して毒性を発揮すると考えられる。ヒトでは腫瘍の治療や火傷の患者などのように生体防御能の低下した状態で、健康状態では感染力のない皮膚の常在菌や環境中に普通に存在する菌による感染症が問題となっている。また、このような菌の臨床分離株における毒素を含む各種生理活性物質の産生性は、環境から分離された株と比較して高まっているとされている。したがって、クロマグロにとって *P. phosphoreum* は溶血物質を持つ感染の危険性がある菌ではあるが、魚が健康な状態では正常腸内細菌相を構成し、生体維持のために有益であると思われる。しかし、先にあげた理由によりクロマグロの生体防御能が低下したとき、病原性を示すようになったと思われる。これらのことから、クロマグロの養殖にあたっては魚体に負担をかけないように過密や手荒な取扱いを避ければ、本菌のような感染

力の弱い菌による減耗が避けられるのではないかと考えられる。

要 約

- 1) クロマグロの養殖にともなう腸内細菌相の変化を検討した。その結果、野生幼魚の腸内細菌はガス産生性を示す *Vibrio/Photobacterium* が主体をなしていたが、養殖にともなって *Micrococcus* やガス非産生性 *Vibrio/Photobacterium* の増加が認められた。いっぽう、クロマグロの病魚では、ガス非産生性の *Vibrio/Photobacterium* の比率が上昇するとともに、摂餌状態に関係なく、腸内細菌数の増加が認められた。また、クロマグロの腸内細菌相は摂餌後の時間経過によって速やかに変化することが明かとなった。
- 2) クロマグロの腸内からの分離比率が高く、さらに病魚の腎臓から分離されたガス産生性および非産生性 *Vibrio/Photobacterium* の同定を行った。その結果、各種生化学的性状および GC 含量から *Photobacterium phosphoreum* に同定された。
- 3) クロマグロ病魚の腎臓から分離された *P. phosphoreum* の病原性を検討するために、各種魚種に対する致死性および産生物質の生物活性を測定した。その結果、*P. phosphoreum* は各種魚種に対する病原性は弱いと菌体外に溶血物質を産生することが明かとなった。また、溶血物質の産生性は病魚の腎臓分離株で環境および腸内分離株と比較して有意に高かった。
- 4) *P. phosphoreum* の溶血物質の精製を行う前に、人工培地中での本物質の産生性について検討した。その結果、本物質は BHI を培地としたとき、培養温度が 37°C、塩分濃度が 3%、pH が 6.5~8.5 の範囲で産生量が多かった。また、本物質は培地中での安定性が高く、25°C 以下であれば活性は 35 日後まで変化しなかった。
- 5) *P. phosphoreum* の溶血物質の分子量は約 47,000~48,000 であり、反応至適 pH および温度はそれぞれ 8.5, 35°C 付近であった。この物質は極めて易熱性であり、トリクロル酢酸、ホルマリン、トリブシン、パバインなどによる前処理によって活性が低下することから、タンパク質を主成分とするのではないかと考えられる。また、EDTA による前処理によって活性が低下したが、Ca²⁺、Mg²⁺ の添加によって活性が促進された。

謝 辞

本研究の遂行にあたって協力をいただいた木村哲夫氏に謝意を表します。

文 献

- AISO, K., U. SHIMIZU and H. HASUO, 1968: Microflora in the digestive tract of inshore fish in Japan. *J. Gen. Microbiol.*, **52**, 361-364.
- ARVIDSON, S., T. HOLME and T. WADSTROM, 1971: Influence of cultivation conditions on the production of extracellular proteins by *Staphylococcus aureus*. *Acta Path. Microbiol. scand. Section B.*, **79**, 399-405.
- BAUMANN, P., M. J. GAUTHIER and L. BAUMANN, 1984: Bergey's manual of systematic bacteriology, 9th ed, Wil-

- liams and Wilkins, Baltimore.
- BOLLIN, G. E., J. F. PLOUFFE, M. F. PARA and R. E. PRIOR, 1985: Difference in virulence of environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.*, **21**, 674-677.
- COWAN, S. T., 1975: 医学細菌同定の手引き (坂崎利一訳), 近代出版, 東京, 1-249.
- GRAY, L. D. and A. S. KREGER, 1985: Purification and Characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.*, **48**, 62-72.
- GINSBURG, I., T. N. HARRIS and N. GROSSOWICZ, 1963: Oxygenstable hemolysins of group a streptococci. I. The role of various agents in the production of the hemolysins. *J. Exp. Med.*, **118**, 905-917.
- INAMURA, H., K. MUROGA and T. NAKAI, 1984: Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum*. *Fish Pathol.*, **19**, 89-96.
- 井上 勇, 1982: *Moraxella bovis* の溶血物質の特性について. 日本細菌学雑誌, **37**, 765-774.
- JENSEN, S. E., L. PHILLIPS, J. T. TSENG, G. W. STEMKE and J. N. CAMPBELL, 1980: Purification and characterization of exocellular proteases produced by a clinical isolate and a laboratory strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.*, **26**, 77-86.
- 金子精一, 1971: 活魚の微生物学的研究, *New Food Industry*, **13**, 28-33.
- 加藤 敏, 1988: 細菌感染症成立に関与する菌体外酵素. 日本細菌学雑誌, **43**, 621-628.
- KAWAHARA, E., H. SAKO, S. NOMURA and R. KUSUDA, 1989: Hemolysin production by beta-hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Fish Pathol.*, **24**, 219-223.
- KIMURA, H. and R. KUSUDA, 1979: Studies on the pathogenesis of streptococcal infection in cultured yellowtails *Seriola* spp.: effect of the cell free culture on experimental streptococcal infection. *J. Fish Dis.*, **2**, 501-510.
- 楠田理一・浜口昌巳, 1987: プリ類結節症に対する浸漬法ワクチンの処理回数と経口法併用による有効性の比較. 日水誌, **53**, 1005-1008.
- KUSUDA, R. and H. KIMURA, 1978: Studies on the pathogenesis of streptococcal infection in cultured yellowtails *Seriola* spp.: the fate of *Streptococcus* sp. bacteria after inoculation. *J. Fish Dis.*, **1**, 109-114.
- 小山次郎, 1972: タンパク毒素, 上, 講談社, 東京.
- LALLIER, R., F. BERNARD and G. LALONDE, 1984: Difference in the extracellular products of two strains of *Aeromonas hydrophila* virulent and weakly virulent for fish. *Can. J. Microbiol.*, **30**, 900-903.
- LIU, P. V., 1974: Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.*, **127**, 94-102.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, 1951: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MARMUR, J., 1961: A procedure for the isolation of DNA from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, **3**, 208-218.
- MARMUR, J. and P. DOTY, 1962: Determination of the base composition of DNA from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.*, **5**, 109-118.
- 三輪谷俊夫, 1982: 細菌の産生する即時型致死毒の病態生理学的研究. 日本細菌学雑誌, **37**, 811-828.
- MORIHARA, K., 1963: *Pseudomonas aeruginosa* proteinase. 1. Purification and general properties. *Biochim. Biophys. Acta.*, **73**, 113-124.
- MORIHARA, K., H. TSUZUKI, M. HARADA and T. IWATA, 1984: Purification of human plasma α_1 -proteinase inhibitor and its inactivation by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Biochem.*, **95**, 795-804.
- MUNN, C. B., 1978: Haemolysin production by *Vibrio anguillarum*. *FEMS Microbiol. L.*, **3**, 265-268.
- MUNN, C. B., 1980: Production and properties of a haemolytic toxin by *Vibrio anguillarum* in fish diseases. Third COPRAQ-session. pp. 252, Springer-Verlag, Berlin, 69-74.
- NOMURA, S. and H. SAITO, 1982: Production of the extracellular hemolytic toxin by an isolated strain of *Aeromonas salmonicida*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **48**, 1589-1597.
- NOMURA, S., M. FUJIO, M. YAMAKAWA and E. KAWAHARA, 1988: Purification and characterization of salmolyisin, an extracellular hemolytic toxin from *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.*, **170**, 3694-3702.
- 逢坂 昭, 1974: 出血因子と溶血因子——その本態と作用——. 蛋白質・核酸・酵素, **13**, 1007-1025.
- 太田建爾, 1975: 腸炎ビブリオ腸管病原毒素の産生条件の検討と毒素の熱安定性. 1. 産生毒素の定量的測定法と毒素の産生条件について. 感染症学雑誌, **49**, 825-833.
- 奥積昌世・堀江 進, 1968: 海産魚腸管内の細菌相について. 日水誌, **35**, 93-100.
- SCHARMANN, W., 1974: Formation and isolation of leucocidin from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.*,

- 93, 283-291.
- SCHARMANN, W., 1976: Purification and characterization of leucocidin from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.*, **93**, 292-302.
- SERA, H. and Y. ISHIDA, 1972: Bacterial flora in the digestive tracts of marine fish—III, Classification of isolated bacteria. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **38**, 853-858.
- 瀬良 洋・石田祐三郎, 1975: 微生物の生態2, 東大出版会, 東京, 53-70.
- 瀬良 洋・木俣正夫, 1972: 海産魚類消化管の細菌相—I, 日水誌, **38**, 50-55.
- SHEWAN, J. M., G. HOBBS and W. HODGKISS, 1960: The *Pseudomonas* and *Achromobacter* groups of bacteria in the spoilage of marine white fish. *J. appl. Bact.*, **23**, 463-468.
- SHIEH, T. H., 1982: Lethal toxicity of *Aeromonas salmonicida* protease to atlantic salmon. *Microbiol., Letters*, **20**, 137-139.
- SHIMIZU, U. and E. KANEKO, 1973: A numerical taxonomy of *Vibrio* and *Aeromonas* from normal and diseased marine fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **39**, 688-703.
- 反町 稔・江草周三, 1971: 養殖ウナギの腸内好気性細菌について, 魚病研究, **6**, 1-7.
- 竹田美文・加藤 巖編, 1984: 蛋白毒素, 医歯薬出版, 東京.
- THUNE, R. L., T. E. GRAHAM, L. M. RIDDLE and R. L. AMBORSKI, 1982: Extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*: partial purification and effects on age-0 channel cat-fish. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **111**, 749-754.
- THUNE, R. L., M. C. JOHNSON, T. E. GRAHAM and R. L. AMBORSKI, 1986: *Aeromonas hydrophila* B-hemolysin: purification and examination of its role in virulence in 0-group channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.*, **9**, 55-61.
- TODD, E. W. and L. F. HEWITT, 1932: A new culture medium for the production of antigenic streptococcal hemolysin. *J. Path. Bacteriol.*, **35**, 973-974.
- 吉水 守・木村喬久・坂井 稔, 1976: サケ科魚類の腸内細菌相に関する研究—II, 日本水産学会誌, **42**, 963-873.
- WEBER, K. and M. OSBORN, 1969: The reliability of molecular weight determinations of dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412.
- WEBER, K., J. R. PRINGLE and M. OSBORN, 1972: Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods enzymol.*, **26**, 3-27.