催熟蓄養中のサクラマスならびにカラフトマスに発生 した癰瘍病様疾病の原因菌に関する分類学的研究—Ⅱ 血清学的性状を基礎とした分類学的研究

木村 喬久※

(1969年2月8日受理)

著者は前報¹⁾において、本病原菌をその形態学的、生化学的ならびに生物学的性状から分類学上の検討を行い、*Aeromonas salmonicida* の一新亜種と考えることが最も妥当であろうと推論した。

本報において前報の推論の妥当性を、本菌の免疫血清学的性状から検討したので、その経過について報告する。

A. salmonicida の血清学的特異性に関しては、古く1930年 BLAKE & ANDERSON²⁾ が *Bacillus salmonicida* (*A. salmonicida*) の血清学的均一性を、そのウサギ抗血清による補体結合反応により明らかにしており、一方 DUFF³⁾ はその S, R および G 型集落に対するウサギ抗血清の凝集反応による抗原分析から、本菌種を血清学的に2型に群別し得ると報告している。また最近 RABB *et al.*⁴⁾ は抗 *A. salmonicida* ニワトリ血清のスライド凝集反応により、該菌を他の類縁魚病原菌と容易に鑑別し得ることを報告し、LIU⁵⁾ は ELEK⁶⁾ の寒天培地内沈降反応を改良した方法により、*Aeromonas* 属細菌の細胞外抗原を比較検討し、*A. salmonicida* は他の *Aeromonas* 属とはほとんど交叉しない特異的細胞外抗原を産生することを報告している。

実験Ⅰ 本菌加熱死菌のウサギ抗血清の特異性

1) 実験方法

免疫抗原：本菌の代表株としてイ-a-1株を供試し基礎斜面培地で25°C、24時間培養しその菌体を光電比濁

表1 *Aeromonas salmonicida* の一新亜種(イ-a-1株)の加熱死菌ウサギ抗血清における凝集素の特異性

Table 1. Specificity of agglutinin in the rabbit antiserum against the heat killed cell of the new subspecies of *Aeromonas salmonicida*(strain イ-a-1)

Antigen tested (Agglutininogen)	Dilution of antiserum (1:)									
	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600
New subsp. of <i>Aeromonas salmonicida</i>										
イ-a-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
ロ-a-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
ロ-b-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
ロ-c-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> IAM 1018	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. punctata</i> ATCC 11163	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>A. salmonicida</i> EFDL	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
<i>A. liquefaciens</i> EFDL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> EFDL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio piscium</i> var. <i>japonicus</i> NMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = agglutinate. - = no agglutinate.

※ 北海道大学水産学部微生物学教室

法により約 10^8 /ml の濃度に滅菌生理的食塩水に懸濁せしめ、これを 100°C 、30分間加熱して免疫抗原として使用した。

抗血清：常法⁷⁾のごとく4～5日毎に免疫抗原量を漸次増量しながら5回ウサギの耳静脈内に接種し、最終接種後10日目、初回接種後30日目に全採血を行い、血清を分離し供試した。

抗体価測定法：常法どうり 56°C 、30分間の非動化を行った抗血清について、試験管内凝集反応（定量的凝集反応）により抗体価の測定および抗血清の特異性を観察した。なお反応は 37°C 、2時間 4°C に20時間納置した後に判定した。

反応抗原：表1にしめすごとく本病の原因菌4株ならびに対照として *A. salmonicida* およびその他の類縁魚病原菌7株の生菌懸濁液（約 10^8 /ml 濃度）をそれぞれ反応抗原として供試した。なおそれぞれの反応抗原は自発凝集性はないことを確認の上供試した。

2) 結果および考察

以上のごとき方法で本菌の加熱死菌の接種により得られた抗血清の特異性を観察した結果は表1にしめすごとくで、本血清は本病の原因菌4株に対しまったく同程度の凝集価をしめし、血清学的均一性が推察されたが、対照菌株に対しては *A. salmonicida* の2株においてのみ本菌とまったく同程度の凝集価が観察された。すなわち本菌と対照の *A. salmonicida* とは凝集反応において同一特異性をしめすことが観察された。

実験Ⅱ 加熱死菌抗血清に対する免疫抗原（イ-a-1株）および *A. salmonicida* (ATCC 14174株) の生菌による交叉吸収試験

実験Ⅰにおいて、対照菌株の *A. salmonicida* は抗血清に対し、免疫抗原のイ-a-1株とまったく同程度の交叉凝集性をしめすことが明らかにされたので、さらに両者の耐熱性菌体抗原（O抗原）の相似性を検討するため次のような方法により交叉吸収試験を試みた。

1) 実験方法

実験Ⅰにおいて得られた抗血清の40倍稀釈液を2本の試験管に用意し、一方にイ-a-1株、他方には *A. salmonicida* ATCC 14174株の 25°C 、24時間基礎培地斜面培養菌体を多量に懸濁せしめ、 37°C に2時間納置した後4,000rpm、15分間遠心分離し、得られた上清に再び、それぞれの菌体を濃厚に懸濁せしめ、 37°C に2時間および 4°C に20時間納置後、再び4,000rpm、30分間遠心分離し、完全に清澄な上清を吸収血清として供試

表2 *A. salmonicida* の一新亜種（イ-a-1株）の加熱死菌ウサギ抗血清の凝集素吸収試験
Table 2. Absorption test of agglutinin in the rabbit antiserum against the heat killed cell of the new subspecies of *A. salmonicida*(strain イ-a-1)

Antigen tested (Agglutininogen)		イ-a-A (A)			<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174 (B)		
Absorbed with		non	A	B	non	A	B
Dilution of absorbed serum (1:)	169	+	—	—	+	—	—
	320	+	—	—	+	—	—
	640	+	—	—	+	—	—
	1280	+	—	—	+	—	—
	2560	+	—	—	+	—	—
	5120	+	—	—	+	—	—
	10240	—	—	—	—	—	—
	20480	—	—	—	—	—	—

表3 *A. salmonicida* の一新亜種 (イ-a-1 株) 並びに *A. salmonicida* ATCC 14174株のホルマリン死菌ウサギ抗血清における凝集素の特異性
 Table 3. Specificity of agglutinin in the rabbit antisera against formalin-killed cell of the new subspecies of *A. salmonicida* (イ-a-1) and *A. salmonicida* ATCC 14174.

Anti-serum	Antigen tested (Agglutininogen)	Dilution of antiserum (1:)										
		400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400	204800	409600
Anti イ-a-1	New subsp. of <i>A. salmonicida</i> イ-a-1	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
	□-a-1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	□-b-1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	□-c-1	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
	<i>A. hydrophila</i> IAM 1018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. punctata</i> ATCC 11163	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-
	<i>A. salmonicida</i> EFDL	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	<i>A. liquefaciens</i> EFDL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. fluorescens</i> EFDL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>V. piscium</i> var. <i>Japonicus</i> NMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti <i>A. salmonicida</i>	New subsp. of <i>A. salmonicida</i> イ-a-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	□-a-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	□-b-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
	□-c-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>A. hydrophila</i> IAM 1018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. punctata</i> ATCC 11163	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>A. salmonicida</i> EFDL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>A. liquefaciens</i> EFDL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. fluorescens</i> EFDL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>V. piscium</i> var. <i>Japonicus</i> NMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

した。なお対照血清として、40倍稀釈した同一血清を同温度で同時間納置して供試した。その他の方法は実験と同様である。

2) 結果および考察

以上の方法により調製した2種の吸収血清をそれぞれ2分し、イ-a-1株および *A. salmonicida* ATCC 14174 株の各生菌懸濁液を反応抗原として吸収結果を観察した成績は表2に示すごとくで、抗血清はいずれの吸収抗原によっても完全に吸収されることが明らかにされた。すなわち本病原菌と *A. salmonicida* の耐熱性抗原は共通抗原であることが推察された。

実験Ⅲ イ-a-1株および *A. salmonicida* ATCC 14174 株のホルマリン死菌のウサギ抗血清の特異性

以上の実験結果より明らかなごとく、本菌と *A. salmonicida* とは耐熱性抗原において差異が認められなかった。次にホルマリン死菌の接種により得られた抗血清で両者の易熱性抗原についての検討を行った。ここでは先ず両者のホルマリン死菌に対するウサギの免疫応答ならびにその抗血清の特異性について検討した。

1) 実験方法

免疫抗原としてイ-a-1株ならびに *A. salmonicida* ATCC 14174 株の25°C、24時間培養菌体を、実験Ⅰと同様にそれぞれ滅菌生理的食塩水に懸濁せしめ、これに0.5%の割合にホルマリンを添加し37°C、24時間納置後、生菌の残存しないことを確認の上、免疫抗原として使用した。免疫方法は実験Ⅰに準じ、またその実験方法もすべて実験Ⅰに準じて行った。

2) 結果および考察

以上のような方法で、両免疫抗原の接種により得られた抗血清は、抗イ-a-1株血清の場合1:81,920、抗 *A. salmonicida* 血清で1:327,600のごとききわめて高力価をしめした。このような高力価の抗血清においては非特異的抗体の生産が懸念されるが、実験Ⅰの場合と同様にそれぞれの抗血清の特異性を観察した結果、表3に示すように、本菌と *A. salmonicida* の両者間には、前述の耐熱性抗原の接種により得られた抗血清の場合と同様に交叉凝集性が認められたが、その他の対照菌抗原に対してはまったく交叉反応は認められず、明らかな特異性が観察された。

実験Ⅳ ホルマリン死菌抗血清に対する本菌(イ-a-1株)および *A. salmonicida* (ATCC 14174 株) による交叉吸収試験

実験Ⅲの結果から、ホルマリン死菌を接種したウサギ抗血清においても、本菌と *A. salmonicida* とはまったく同価の交叉凝集性をしめすことが明らかとなったので、両者の易熱性抗原について比較検討するために、次のような方法により実験Ⅱの場合と同様の交叉吸収試験を試みた。

1) 実験方法

実験Ⅲにおいて得られた本菌抗血清の100倍稀釈液を用意し、生菌による吸収は実験Ⅱと同様の方法で、また耐熱性抗原(O抗原)による吸収試験は、両菌株の25°C、3日間培養菌体を生理的食塩水に懸濁せしめ、15ポンド、30分間の加熱により易熱性抗原物質を完全に破壊した後、3,000rpm、15分間遠心分離後上清をすて、更に反復沈渣を生理的食塩水で洗滌し、これを吸収抗原として、上記の生菌の場合と同様の操作で吸収を行った。反应用抗原は実験Ⅰにのべた生菌抗原の外に上述の吸収用耐熱性抗原と同様にして調製した菌体を光電比濁法により生菌抗原と同濃度になるように生理的食塩水に懸濁せしめて供試した。その他の実験方法は前述の実験と同様に行った。

2) 結果および考察

以上のようにして実施した吸収試験の結果は表4に示すとおりで、イ-a-1株の生菌による吸収血清は、イ

表4 *A. salmonicida* の一新亜種 (イ-a-1株) のホルマリン死菌ウサギ抗血清の凝集素吸収試験

Table 4. Absorption test of agglutinin in the rabbit antiserum against the formalin-killed cell of the new subspecies of *A. salmonicida* (strain イ-a-1)

Antigen tested (Agglutininogen)		A	B	A	B	A	B	AO	BO	A	B	AO	BO
Absorbed with*		A		B		AO				non			
Dilution of absorbed serum (1:)	200	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
	400	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
	800	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
	1600	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
	3200	-	-	±	-	±	-	-	-	+	+	+	+
	6400	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	12800	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	±	+
	25600	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-
	51200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	102400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	304800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	409600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* A=intact cell of the new subsp. of *A. salmonicida* (strain イ-a-1)

B=intact cell of *A. salmonicida* ATCC 14174

AO=heat killed cell of the new subsp. of *A. salmonicida* (strain イ-a-1)

BO=heat killed cell of *A. salmonicida* ATCC 14174

-a-1株は勿論 *A. salmonicida* もまったく凝集しないが、これに反し *A. salmonicida* の生菌による吸収血清は、*A. salmonicida* を凝集しないにもかかわらずイ-a-1株に対しては凝集性が残存した。また本菌(イ-a-1株)の耐熱性抗原による吸収血清においても同様に本菌の生菌抗原に対する凝集が観察された。以上の結果から、本菌の耐熱性抗原に対する抗体は、*A. salmonicida* により完全に吸収され、本菌の耐熱性抗原と *A. salmonicida* のそれとは共通抗原であることが推察されるが、本菌の易熱性抗原に対する抗体は、*A. salmonicida* の生菌によっても吸収されないことから、*A. salmonicida* は本菌と共通する易熱性抗原を有しないことが推察された。

実験V 細胞外抗原 (Extracellular Antigen) に関する検討

前述のごとく LIU は *A. salmonicida* は他の *Aeromonas* 属細菌とほとんど交叉しない特異的細胞外抗原を産生することを報告している。

本実験においては、本菌について *A. salmonicida* ならびにその類縁菌を対象として、次のような方法により同様の検討を試みた。

1) 実験方法

供試抗血清：実験Ⅲにおいて得られたホルマリン死菌抗血清を供試した。

供試菌：イ-a-1株の外、対照として図1に示すごとく *A. salmonicida* ATCC 14174 株および4種の類縁菌を供試した。

試験法：LIU⁵⁾の方法にしたがい次の組成の平板培地を使用した。

Tryptose	0.1%
Casamino acid	0.3%

Glycerol	0.5%
Na ₂ HPO ₄	0.3%
NaCl	0.2%
寒 天	1.2%

PH 7.4

また試験法は LIU の原法を若干改変し、次のごとき方法により寒天内沈降反応を行った。すなわち培地の中央に供試血清中に浸漬した抗菌剤感受性試験用ディスク（直径 8 mm）をはりつけ、一夜 25°C の恒温器内に納置して培地面を十分に乾燥せしめた後、図 1 にしめすごとくディスクの周囲に中央から 20mm はなして各供試菌を点滴し、25°C、15日間培養の間にディスクと集落の中間培地中に出現する沈降線の有無を観察した。

2) 結果および考察

以上のごとき方法で、本菌の細胞外抗原の存否を観察した結果は図 1 にしめすごとく、先ず本菌の抗血清を供

図 1 ELEK の培地内沈降反応（変法）による *A. salmonicida* の一新亜種と近縁魚病原菌との菌体外抗原の比較

Fig. 1. Extracellular antigenic relationships between the new subspecies of *A. salmonicida* and other related organisms with the modified ELEK's agar diffusion test.

A : paper disk dipped in antiserum against the new subspecies of *A. salmonicida* (strain イ-a-1)

B : paper disk dipped in antiserum against *A. salmonicida* ATCC 14174

1 : spot culture of strain イ-a-1

2 : " " *A. salmonicida* ATCC 14174

3 : " " *A. hydrophila* IAM 1018

4 : " " *A. punctata* ATCC 11163

5 : " " *A. liquefaciens* EFDL

6 : " " *V. piscium* var. *japonicus* NMC

試した場合は図 1-A のごとく、本菌集落とディスクとの間に 2 本の明瞭な沈降線が出現し、対照菌においては *A. salmonicida* のみに 1 本の沈降線が観察され、その他の対照菌では沈降線の出現は全くみられなかった。また一方 *A. salmonicida* の抗血清を供試した場合には、Fig. 1-B にしめすごとく、本菌および *A. salmonicida* のいずれにおいても 1 本の沈降線が出現し、他の対照菌においてはまったく沈降線の出現は認められなかった。

以上の実験結果から、本菌と *A. salmonicida* は少なくとも一つの共通細胞外抗原を有し、また本菌はさらにもう一つの細胞外抗原を有することが推察された。

本病原菌の分類に関する総合的考察

前察¹⁾において、著者は本病原菌の形態学的、生化学的ならびに生物学的諸性状から、本菌は *Aeromonas* 属に属し、本菌属中の *A. salmonicida* に近似することを指摘したが、細菌分類上の重要性状であるインドール

産生、VP 反応およびその他の若干の性状において相違点が認められることから、本菌は完全に *A. salmonicida* と同菌種と同定することは困難であり、また SCHUBERT⁸⁾ の提案する *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* とも相違することから、本菌を *A. salmonicida* の一新亜種と考えることが至当であると提案した。

本報においては本菌の血清学的特異性について検討し、本菌は *A. salmonicida* と共通し且つ他の類縁菌に見出し得ない耐熱性菌体抗原 (O 抗原) を有すると共に、*A. salmonicida* に欠如する易熱性抗原を有し、また *A. salmonicida* と共通する細胞外抗原の外に特異的細胞外抗原を産生することを明らかにした。

以上の血清学的抗原分析の結果から、本菌は他の *Aeromonas* 属細菌とは明らかに異なり且つ *A. salmonicida* と共通する抗原をもつことが明らかであるが、一部の抗原構造において *A. salmonicida* と異なり、前記したごとく本菌を *A. salmonicida* の一新亜種と考えた著者の推論の妥当性が確認された。

著者は、前報ならびに本報における分類学的検討の結果を総括し、本菌を *A. salmonicida* (LEHMANN and NEUMANN, 1896) GRIFFIN, SNIESZKO and FRIDDLE, 1953. の一新亜種と結論し、International Code of Nomenclature of Bacteria, 1966⁹⁾ に準拠して次のごとく命名することを提案したい。

すなわち本菌はサクラマス *Oncorhynchus masou* (BREVOORT) から最初に分離されたサケ科魚類の病原菌であることから、サクラマスの種小名 (specific epithet) を本菌の亜種小名 (subspecific epithet) に引用し、これに英語の kill に相当するテラン語接尾動詞の cida を付し、本菌を *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*, KIMURA, 1969. nov. subsp. と命名することを提案する。

要 約

催熟蓄養中のサクラマスならびにカラフトマスに発生する癰瘍病様疾病の原因菌について血清学的特異性を検討した結果、本菌には *Aeromonas salmonicida* と共通し且つ他の類縁菌に見出し得ない耐熱性菌体抗原を有すると共に、*A. salmonicida* に欠如する易熱性の抗原を有し、また *A. salmonicida* と共通する細胞外抗原の外に本菌は特異的細胞外抗原を産生することを明らかにし得た。

すなわち、本菌は血清学的にも他の *Aeromonas* 属細菌とは明らかに異なり且つ *A. salmonicida* とは共通する抗原性を有するが、一部の抗原構造において *A. salmonicida* と異なることから、著者が前報において本菌を *A. salmonicida* の一新亜種とした推論の妥当性が確認し得た。

以上の結果ならびに前報における著者の推論を総括して本菌を *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, KIMURA, 1960, nov. subsp. と命名することを提案した。

終りに本研究遂行にあたり終始御指導を賜った北海道大学水産学部・坂井稔教授に厚く感謝いたします。

また本研究に供試した対照菌株の一部を分与賜った東京大学・飯塚広教授、新潟大学医学部・斉藤豊博士ならびに米国 Eastern Fish Disease Laboratory, Dr. G. L. BULLOCK の諸氏に厚く謝意を表します。

文 献

- 1) 木村喬久：本誌，3，(1969)。
- 2) I. BLAKE and E. J. M. ANDERSON：Fish. Scotlnd Salmon Fish, 1, 3 (1530)。
- 3) D. C. B. Duff：J. Bact., 38, 51 (1539)。
- 4) L. RABB et al：Progress. Fish-Cult., 26, 118 (1564)。
- 5) D. V. LIU：J. gen. Microbioi., 24, 145 (1961)。
- 6) S. D. ELEK：British Med. J., March, 13, 483 (1948)。
- 7) 伝染病研究所学会：細菌学実習提要，478，丸善，東京 (1958)。
- 8) R. H. W. SCHUBERT：Intl. J. Syst. Bact., 17, 273 (1967)。
- 9) International Code of Nomenclature of Bacteria：ibid, 16, 459 (1966)。

A New Subspecies of *Aeromonas salmonicida* as an Etiological Agent
of Furunculosis on "Sakuramasu" (*Oncorhynchus masou*)
and Pink Salmon (*O. gorbuscha*) Rearing for Maturity
Part 2 On the Serological Properties

Takahisa KIMURA

Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University
Hakodate, Hokkaido, Japan

In the previous paper, the organism was designated as a new subspecies of *Aeromonas salmonicida* according to the morphological and physiological properties.

In this study, the serological relationship between this organism and related organisms was investigated. As the results, the organism was clearly crossed to *A. salmonicida* in the heat stable antigenicity, but the both were different from each other in the heat labile and extracellular antigenicities. The present author's proposition of a new subspecies of *A. salmonicida* for the organism was warranted by the above results.

Therefore, the author designated the organism as *Aeromonas salmonicida* nov. subsp. *masoucida*,