アユ病魚から分離された *Pseudomonas* sp.*¹

中津川俊雄*²・飯田悦左*³

(1996年7月25日受付)

Pseudomonas sp. Isolated from Diseased Ayu, *Plecoglossus altivelis**¹

Toshio Nakatsugawa*² and Yoshisuke Iida*³

*² Kyoto Institute of Oceanic and Fishery Science,
Miyazu, Kyoto 626, Japan

*³ Freshwater Fish Branch, Hiroshima Prefectural Fisheries Experiment Station,
Shobara, Hiroshima 727, Japan

(Received July 25, 1996)

A chronic disease occurred in cultured ayu, *Plecoglossus altivelis*, from May to July in 1995 in Kyoto and Hiroshima Prefectures. Cumulative mortalities reached 16–30% during that period. One type of bacterium was isolated from the kidney of diseased ayu which characteristically showed pale gills, pale viscera, and swollen spleen and kidney. The isolates of the bacterium were confirmed to be pathogenic to ayu, Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and red sea bream, *Pagrus major*, by intramuscular injection. The organism was identified as a *Pseudomonas* species based on the biochemical properties.

Key words: *Pseudomonas* sp., ayu, *Pseudomonas* infection, *Plecoglossus altivelis*

近年我が国のアユ養殖場における魚病発生状況に変化が起きている。例えば代表的なアユ養殖県である徳島県においては、1980年代前半には魚病診断件数の50%以上を占めていたビブリオ病が年々減少し、代わって1987年に発生し始めた冷水病による被害が大きな位置を占めるようになり、1992年には冷水病は24%となり20%のビブリオ病を上回った(沢田, 1994)*⁴。更に最近では各地でシュードモナス病(若林ら, 1996)*⁵も発生している。

1995年に京都府下および広島県下の養殖アユ *Plecoglossus altivelis* において、外観症状では冷水病に類似した病魚から1種の *Pseudomonas* 属細菌が分離された。本報では、本疾病の発生状況、原因菌の分離とその細菌学的性状、薬剤感受性並びにアユ、ヒラメ *Paralichthys oli-*

vaceus およびマダイ *Pagrus major* に対する病原性について報告する。

材料および方法

発生状況調査

1995年6月上旬から7月上旬にかけ、京都府福知山市の1アユ養殖場で感染症によると思われる大量死が発生した。同年5月下旬から7月中旬にかけ、広島県広島市の1アユ養殖場で同様の大量死が発生した。京都府では6月13日と6月20日、そして広島県では5月22日と6月21日のそれぞれ2回発生状況を調査するとともに、衰弱魚を用いて細菌検査を実施した。

細菌の分離

6月13日に京都府下のアユ養殖場で衰弱アユ5尾(平均体重8g)の腎臓から常法によりサイトファーガ寒天培地を用いて細菌の分離を行った。6月20日には同養殖場で衰弱アユを採取後1時間氷蔵して、海洋センターに持ち帰り、5尾(平均体重8.5g)の腎臓からブレインハートインフュージョン(BHI)寒天培地(Difco)を用

*¹ 京都府立海洋センター業績 No. 112.

*⁴ 沢田健蔵(1994): 重要疾病の予防と治療—アユ, 養殖, 臨時増刊「最新魚病対策」, Vol. 31, No. 2, 緑書房, 東京, 132–136.

*⁵ 若林久嗣・沢田健蔵・二宮浩司・西森栄太(1996): アユの新しいシュードモナス病について, 日本魚病学会春季大会講演要旨集, 30.

いて細菌の分離を実施した。また、下顎に発赤がみられた2尾については発赤部からサイトファーガ寒天培地を用いて細菌の分離を試みた。培養温度は18°Cとした。広島県下のアユ養殖場の場合には、5月22日および6月21日に衰弱したアユ各5尾（平均体重18.0g, 25.3g）の腎臓から、また下顎に病変部がある場合には、そこから改変サイトファーガ寒天培地およびハートインフュージョン (HI) 寒天培地（栄研）を用いて細菌の分離を行い、8°Cもしくは18°Cで培養した。

供試菌

生化学的性状検査には、6月20日に京都府下のアユ病魚から分離された5株（AK-9507, -9508, -9509, -9510, -9511）および5月22日に広島県下の病魚より分離された1株（PH-9501）、計6株を供した。ティラピア病魚由来の *P. fluorescens* 03L 株（宮下, 1984）を対照として用いた。家兎抗血清の作製には AK-9510 株と PH-9501 株を供した。供試菌はトリプティケースソイ寒天培地 (TSA, BBL) あるいは BHI 寒天培地で18°Cで1日間前培養し、以下の性状検査に供した。

生化学的性状検査

坂崎ら (1988) および田村ら (1987) の方法に従い、供試菌のグラム染色性、運動性、オキシダーゼ、カタラーゼ、OF 試験、硝酸塩還元、インドール産生、硫化水素産生、アミノ酸脱炭酸、VP, MR 反応、レシトビテリン試験、ゼラチン液化、蛍光色素産生等36項目について検査した。poly- β -hydroxybutyrate (PHB) の蓄積については、Palleroni and Doudoroff の方法により検査した。また、唯一の炭素源としての有機化合物の利用能については、API バイオタイプ 100 (bioMerieux) を用いて試験した。運動性試験は、TSA 培地での培養菌についての通常の懸滴標本の観察の他に、0.5% NaCl 添加の1%トリプティケース (BBL) ペプトン水および滅菌海水で調整した1%トリプティケースペプトン水での18°Cおよび30°Cの培養菌についても観察した。さらに、Ball-Sellers の半流動培地における運動性も調べた。

塩分耐性を調べるため、NaCl 濃度を0, 2, 3, 4, 5, 6 および7%とした1%トリプティケースペプトン水にて供試菌を6日間培養し、それらの発育の有無を肉眼観察により調べた。pH 耐性試験では、pH を3.5, 4, 4.5, 5, 8, 9, 9.5, 10, 11 および12に調整した0.5% NaCl 添加1%トリプティケースペプトン水で供試菌を6日間培養し、観察を行った。培養はすべて18°Cで行った。また、温度耐

性を調べるため、0.5% NaCl 添加1%トリプティケースペプトン水を用いて、3, 5, 10, 18, 25, 30 および37°Cで供試菌を6日間培養し、観察した。なお、塩分、pH および温度耐性試験には、AK-9507~9511 株の5株を供した。

至適増殖温度を調べる目的で、9.5~39.5°Cの範囲で温度を設定したトリプトソーヤブロス（日水）中で AK-9510 株と PH-9501 株を振盪培養し、6時間後に660 nm の濁度を測定した。

抗血清の作製と血清学的性状

AK-9510 株と PH-9501 株のホルマリン死菌懸濁液を作製し、等量のフロインド完全アジュバント (Difco) を混合、乳化して家兎に接種した。2週間後に同様にアジュバントを接種し、さらに1ヶ月後から5日間隔で計3回ホルマリン死菌を接種した。50日後に採血して、家兎抗血清を作製し、スライド凝集反応（100倍希釈抗血清使用）および凝集素価の測定を試みるとともに、間接蛍光抗体法（一次抗体として100倍希釈抗血清使用）により供試菌株の抗血清に対する反応性を調べた。

薬剤感受性

田村ら (1987) のブロス法を改変し、96穴マイクロプレートを使用して薬剤感受性を調べた。培養には感受性ブイヨン培地（栄研）を用い、フロルフェニコール、スルフィソゾール（武田薬品）、カナマイシン（明治製菓）、オキシリン酸、ポリミキシンB、硫酸ネオマイシン (Sigma) の供試菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を調べた。

病原性試験

アユに対する病原性: AK-9510 株を用いて、平均体重27gの健康なアユ10尾に 2.2×10^4 または 2.2×10^5 CFU/尾、対照として10尾に等量（0.1 ml/尾）の滅菌リン酸緩衝食塩水（pH 7.2）を筋肉内接種した。PH-9501 株の場合は、 1.6×10^4 または 1.6×10^5 CFU/尾、対照としてリン酸緩衝食塩水を筋肉内接種した。接種後流水で5日間無給餌飼育し、死亡状況を観察した。飼育中の水温は26~28°Cであった。

ヒラメに対する病原性: AK-9510 株を用いて、平均体重1.1gのヒラメ0年魚10尾に 1.75×10^6 CFU/尾、対照として10尾に滅菌生理食塩水を等量（0.05 ml/尾）筋肉内接種した。流水で10日間飼育し、死亡状況を観察した。飼育中の水温は23°Cであった。

同じく AK-9510 株を用い、平均体重 3.5 g のヒラメ 0 年魚 10 尾ずつを滅菌海水で 2.5×10^4 もしくは 2.8×10^2 CFU/ml に調整した菌液中に 10 分間浸漬した。対照として、滅菌海水中に 10 尾を 10 分間浸漬した。流水で 10 日間飼育し、死亡状況をみた。飼育期間中の水温は 26~27°C であった。

マダイに対する病原性: AK-9510 株を用いて、平均体重 11.6 g のマダイ 0 年魚 20 尾に 3.5×10^4 CFU/尾、対照として 10 尾に滅菌生理食塩水 0.05 ml を筋肉内接種した。流水で 10 日間飼育し、死亡状況をみた。飼育中の水温は 26~27°C であった。

結 果

発生状況

京都府下での症例が観察された 1 養殖場では、1995 年 5 月 29 日に琵琶湖産の稚アユ（平均体重 8 g）約 50,000 尾を養殖池 1 面に放養し養殖を開始したところ、6 月 10 日頃から鰓の褪色を主徴とする疾病が発生して、その後急激に死亡が増加し、最大日間死亡数は約 2,500 尾（6 月 20 日頃）にものぼった。7 月上旬に終息するまでの累積死亡率は約 30% に達した。病魚の症状としては、鰓の褪色のほかに、鰓弁先端部の充出血、下顎の発赤や胸鰭および腹鰭基部の発赤が一部にみられる程度で、冷水病が疑われた。病魚を解剖したところ、内臓全般の褪色、脾臓の腫大および腎臓の腫脹が特徴的であった。発生時の水温は 18~20°C であった。

広島県の事例では、1995 年 1 月 10 日に人工アユを養魚場に搬入して育成を開始し、4 月 10 日に選別を行って約 10,000 尾（平均体重 6.6 g）を今回調査の対象となった養魚池に収容したところ、5 月下旬から鰓の褪色を主徴とする病魚が散見されるようになった。6 月 17 日に 120 尾の最大日間死亡数を記録し、7 月中旬に終息するまでの累積死亡率は 16% であった。病魚には鰓の褪色以外に異常はみられず、京都府の事例と同様に下顎の発赤が一部にみられる程度であった。剖検では、内臓の褪色、脾臓の腫大および腎臓の腫脹が特徴的に観察され、京都府の事例とよく一致した。発生時の水温は、16.9°C~20.0°C であった。なお、養魚場への種苗の搬入前に魚病細菌の保菌検査を実施しているが、*Cytophage psychrophila* およびその他の魚病細菌は検出されなかった。

細菌の分離

京都府下での発生事例では、6 月 13 日に現地でサイトファーガ寒天培地により試みた細菌の分離の結果、供試

した 5 尾の腎臓から、露滴状で透明、光沢があり、中央部がやや黄色がかった、辺縁が滑らかな小さいコロニーを形成する 1 種類の細菌が分離された。これらの分離菌は BHI 寒天培地では淡黄褐色がかった乳白色のより大きなコロニーを形成した。6 月 20 日に行った BHI 寒天培地を用いた分離の結果でも、供試した 5 尾の腎臓から先に分離されたものと同じ形状のコロニーを形成する細菌が分離された。サイトファーガ寒天培地を用いた、2 尾の下顎の発赤部からの細菌の分離では何も分離されなかった。広島県での事例では、改変サイトファーガ寒天培地および HI 寒天培地の両方に京都府の事例と同様の細菌が、すべての供試魚から分離された。

生化学的性状

京都府下および広島県下で分離されたアユ病魚由来の 6 株と対照とした *P. fluorescens* 03L 株の形態、生化学的性状検査、塩分、pH および温度の各耐性試験の結果を Table 1 に示した。また、API バイオタイプ 100 の検査結果を Table 2 に示した。アユ由来の 6 株は、蛍光色素産生以外ではすべての性状が互いに一致した。アユ由来株は、直径 0.6~1.0 μm（平均 0.8 μm）、長さ 1.2~2.2 μm（平均 1.7 μm）のグラム陰性桿菌で運動性がなく、オキシダーゼおよびカタラーゼ陽性、グルコースを酸化的に分解しガスを産生せず、嫌気条件では発育しなかった。PHB を蓄積せず、AK-9511 株以外は King B の培地で少し黄緑色がかった淡青色の蛍光を発した。アルギニン加水分解、硝酸塩還元、ホスファターゼおよびシモンズのクエン酸塩利用は陽性、ゼラチン液化、VP、MR、カゼイン、デンプン、Tween 80 分解、レバン産生およびレシトピテリンは陰性で、ブテリジン (vibriostatic agent 0/129) に感受性はなかった。塩分、pH および温度耐性試験では、それぞれ 0~5%、5.0~10.0、5~30°C の範囲で発育し、至適増殖温度は 30°C であった (Fig. 1)。

分離菌の血清学的性状

作製した抗 AK-9510 株および抗 PH-9501 株家兎血清の PH-9501 株および AK-9510 株に対する凝集素価は、いずれもホモ株に対する凝集素価と同じ 5120 であったが、03L 株に対する凝集素価は 4 および 16 であった。両抗血清を用いたスライド凝集反応および間接蛍光抗体法では、供試した 6 分離株すべてが陽性となった。しかし、03L 株はいずれの抗血清とも反応しなかった。

Table 1. Biochemical characteristics of *Pseudomonas* sp. from diseased ayu and *P. fluorescens* 03L from diseased tilapia

Characteristics	<i>Pseudomonas</i> sp. from ayu	<i>P. fluorescens</i> 03L	Characteristics	<i>Pseudomonas</i> sp. from ayu	<i>P. fluorescens</i> 03L
Gram stain	—	—	Anaerobical growth	—	—
Motility	—	+	Haemolysis	—	—
Form	rod	rod	Dihydroxyacetone	—	+
Size μm	$0.8 \times 1.7^{*1}$	NT ^{*2}	Tartrate (Jordan)	—	—
Cytochrome-oxidase	+	+	Acylamidase	—	—
Catalase	+	+	O/129 sensitivity	—	—
OF test	O	O	PHB accumulation	—	—
Nitrate reduction	+	—	Levan formation	—	—
Indole production	—	—	Phosphatase	+	+
Hydrogen sulfide	—	—	Phenylalanine	—	—
Lysine	—	—	Simmon's citrate	+	+
Ornithine	—	—	Gluconate oxidase	—	+
Arginine	+	+	Malonate	—	—
VP test	—	—	Growth in 0%–5% NaCl	+	NT
MR test	—	—	6%	+W ^{*4}	
Lecithinase	—	+	7%	—	
Gelatin liquefaction	—	+	Growth at pH 4.5	—	NT
Fluorescent pigment	+5/6 ^{*3}	+	5.0–10.0	+	
Starch hydrolysis	—	—	11.0	+L ^{*5}	
Casein digestion	—	+	12.0	—	
Urease	—	—	Growth at 3°C	—	NT
ONPG	—	—	5–30°C	+	
DNase	—	—	37°C	—	
Tween 80 hydrolysis	—	+			

^{*1} Cell diameter was 0.6–1.0 μm (average 0.8 μm). Cell length was 1.2–2.2 μm (average 1.7 μm). ^{*2} NT: not tested.

^{*3} AK-9511 produced no pigment on King B medium. ^{*4} Weak growth. ^{*5} Late growth.

薬剤感受性

18°C で 48 時間培養した場合の各薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) を Table 3 に示した。供試菌はフロルフェニコール、スルフィソゾールおよびオキシリン酸に対して耐性であった。

病原性

アユ: AK-9510 株および PH-9501 株をアユに筋肉内接種した試験では、接種 36 時間後から衰弱魚が観察されはじめ、いずれの株および接種濃度においても 3 日後までにすべての供試魚が死亡した。対照区の死亡率はいずれも 0% であった。衰弱魚の接種部位には充出血がみられ、瀕死魚のうち重篤なものは接種部位から頭部および尾部の両方向に広範囲の充出血が確認された。また、すべての衰弱魚または死亡魚には鰓の褪色、脾臓の腫大および腎臓の褪色が認められ、それらの腎臓からは接種菌が再分離された。

ヒラメ: AK-9510 株を接種したヒラメでは、接種 19 時間後に 3 尾が衰弱し、26 時間後までに死亡率は 100% と

なった。衰弱および死亡魚には、先と同様接種部位の充出血、鰓の褪色、鰓弁先端部の充出血、脾臓および腎臓の褪色並びに脾臓の腫大が認められた。すべての接種死亡魚の腎臓から接種菌が再分離された。

浸漬攻撃したヒラメでは、 2.5×10^4 CFU/ml 区で試験開始 5 日後に 2 尾が死亡し、6 日後に 1 尾が死亡したが、その後は死亡せず、死亡率は 30% であった。 2.8×10^2 CFU/ml 区では 10 日間の飼育中に死亡魚はみられなかった。死亡魚では、鰓の褪色、皮下筋肉の充出血および白濁、内臓の褪色、脾臓の腫大および腎臓の腫脹がみられた。死亡魚の腎臓からは供試菌が例外なく再分離されたが、生残魚の腎臓からは分離されなかった。

マダイ: AK-9510 株を接種したマダイでは、接種 40 時間後に 11 尾が衰弱、死亡し、3 日後までにすべてが死亡した。衰弱、死亡魚には、接種部位周辺の立鱗、脱鱗および出血、鰭基部の発赤、鰓の褪色、口唇部の発赤、内臓の褪色並びに脾臓の腫大が認められた。特に、脾臓には大小様々な多数の柔らかい白色粒状の菌集落（検鏡および分離培養により確認）が 20 尾中 19 尾の衰弱、死

Table 2. Utilization of organic compounds for sole carbon source of *Pseudomonas* sp. and *P. fluorescens* 03L examined by API Biotype 100 (bioMérieux)

Organic compounds	<i>Pseudomonas</i> sp. from ayu	<i>P. fluorescens</i> 03L	Organic compounds	<i>Pseudomonas</i> sp. from ayu	<i>P. fluorescens</i> 03L
D-glucose	+	+	D-tartrate	—	—
D-fructose	+	+	meso-tartrate	—	—
D-galactose	—	+	D-malate	+L	—
D-trehalose	—	—	L-malate	+	+
D-mannose	+	+	cis-aconitate	+	+
L-sorbose	—	—	trans-aconitate	—	+
D-melibiose	—	—	Tricarballoylate	—	—
Sucrose	—	—	Citrate	+	+
D-raffinose	—	—	D-glucuronate	—	+L
Maltotriose	—	—	D-galacturonate	—	+L
Maltose	—	—	2-keto-D-gluconate	—	+
Lactose	—	—	5-keto-D-gluconate	—	—
Lactulose	—	—	L-tryptophan	—	—
1-O-methyl-β-galactopyranoside	—	—	N-acetyl-D-glucosamine	—	+
1-O-methyl-α-galactopyranoside	—	—	D-gluconate	+	+
D-cellobiose	—	—	Phenylacetate	+	—
β-gentiobiose	—	—	Protocatechuate	+	+
1-O-methyl-β-glucopyranoside	—	—	p-hydroxybenzoate	+	+
Esculin	—	—	Quinate	+	+
D-ribose	+L5/6* ¹	+	Gentisate	—	—
L-arabinose	+L* ²	+	m-hydroxybenzoate	—	—
D-xylose	—	—	Benzoate	+	—
Palatinose	—	—	3-phenylpropionate	—	—
L-rhamnose	—	—	m-coumarate	—	—
L-fucose	—	—	Trigonelline	+	—
D-melezitose	—	—	Betain	+	+
D-arabitol	—	+	Putrescine	+	+
L-arabitol	—	—	4-aminobutyrate	+	+
Xylitol	—	—	Histamine	+	—
D-tagatose	—	—	DL-lactate	+	+
Glycerol	+	+	Caprate	+	+
L-tyrosine	+	+	Caprylate	+	+
myo-inositol	—	—	L-histidine	—	—
D-mannitol	—	+	Succinate	+	+
Maltitol	—	—	Fumarate	+	+
D-turanose	—	—	Glutarate	+	+
D-sorbitol	—	—	DL-glycerate	—	+
Adonitol	—	—	5-aminovalerate	+	—
Hydroxyquinoline-β-glucuronide	—	—	Ethanolamine	+	+
D-lyxose	—	—	Tryptamine	—	—
i-erythritol	—	—	D-glucosamine	—	+
1-O-methyl-α-D-glucopyranoside	—	—	Itaconate	+	+
3-O-methyl-D-glucopyranoside	—	—	DL-β-hydroxybutyrate	+	+
D-saccharate	—	+	L-asparatate	+	+
Mucate	+	+	L-glutamate	+	+
L-tartrate	—	—	L-proline	+	+
			D-alanine	+	+
			L-alanine	+	+
			L-serine	+	+
			Malonate	—	+
			Propionate	+	+
			α-ketoglutarate	+WL* ³	—

*¹ PH-9501 was negative, but other strains were lately positive. *² Lately positive. *³ Lately and weakly positive.

Fig. 1. Growth of 2 strains (AK-9510, PH-9501) of *Pseudomonas* sp. at different temperatures. Bacteria were cultured in TS broth (Trypto-Soya Broth: Nissui) by shaking at 100rpm for 6 hours.

亡魚に共通して観察された。

考 察

京都府下および広島県下のアユ病魚から分離された細菌は、グラム陰性、好気性の桿菌でオキシダーゼおよびカタラーゼ陽性、グルコースを酸化的に分解し、プテリジン 0/129 に感受性がなく、増殖因子を必要とせず、pH 3.5 で発育せず、少し黄緑色がかった淡青色の蛍光色素を産生することから、*Pseudomonas* 属に分類するのが妥当であると考えられた。

Bergey’s manual of systematic bacteriology (Palleroni, 1984) に記載された *Pseudomonas* 属細菌の分類によれば、本分離菌は、PHB を蓄積せず、蛍光色素を産生し、アルギニンを加水分解することから、*P. aeruginosa*, *P.*

Table 3. Minimum inhibitory concentrations of florfenicol, sulfisozole, oxolinic acid, kanamycin, polymyxin B and neomycin sulfate against *Pseudomonas* sp. and *P. fluorescens*

Species and strain	MIC (μg/ml) at 48 h					
	florfenicol	sulfisozole	oxolinic acid	kanamycin	polymyxin B	neomycin
<i>Pseudomonas</i> sp.						
AK-9510	>400	>400	400	3.13	0.78	0.78
PH-9501	>400	>400	400	3.13	0.78	0.78
<i>P. fluorescens</i> 03L	50	12.5	0.78	6.25	0.78	0.39

Table 4. Comparison in biochemical characteristics among the present isolates (*Pseudomonas* sp.) and *Pseudomonas* species (section I) described in Bergey’s mannual of systematic bacteriology

Characteristics	<i>Pseudomonas</i> sp. from ayu	<i>Pseudomonas</i>				
		<i>aeruginosa</i>	<i>fluorescens</i> biovars	<i>chlororaphis</i>	<i>aureofaciens</i>	<i>putida</i> biovars
Motility	—	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+
PHB accumulation	—	—	—	—	—	—
Levan formation	—	—	—/+* ¹	+	+	—
Gelatin liquefaction	—	+	+	+	+	—
Starch hydrolysis	—	—	—	—	—	—
Lecithinase	—	—	+ / ± / d* ²	+	d	—
Tween 80 hydrolysis	—	±	d / —* ³	+	d	—
Arginine	+	+	+	+	+	+
Growth at 4°C	—	—	+ / d* ⁴	+	+	d / +* ⁵
5°C	+	—	—	—	—	—
37°C	—	—	—	—	—	—
41°C	—	+	—	—	—	—

*¹ *P. fluorescens* viovlar III and V are negative, *P. fluorescens* viovlar I, II and IV are positive. *² *P. fluorescens* viovlar I, III and IV are positive, *P. fluorescens* viovlar II is + or —, *P. fluorescens* viovlar V is d (11–89% of the strains are positive). *³ *P. fluorescens* viovlar I, III, IV and V are d, *P. fluorescens* viovlar II is negative. *⁴ *P. fluorescens* viovlar I, II, III and IV are positive, *P. fluorescens* viovlar V is d. *⁵ *P. putida* viovlar A is d, *P. putida* viovlar B is positive.

fluorescens biovars, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* および *P. putida* biovars を含むグループに分類された。さらに、本分離菌は、37°C で発育せず、ゼラチンおよびデンプンを加水分解せず、レシトビテリン陰性で、シュクロースからレバンを産生しないことから、運動性の点を除けば、*P. putida* biovars に近いと考えられた (Table 4)。Palleroni and Doudoroff (1972) は非運動性の *Pseudomonas* 菌株はしばしば自然界から分離されると述べており、本分離菌は *P. putida* の非運動性株と考えられなくもない。しかし、遺伝子レベルでの検討がなされていない現段階では、*P. putida* biovars と同定することはできず、ここでは単に *Pseudomonas* sp. とするにとどめた。

我が国でこれまでに報告された魚類病原菌としての *Pseudomonas* 属細菌には、ウナギ *Anguilla japonica* (Wakabayashi and Egusa, 1972)、アユ (中井ら, 1985) およびシマアジ *Pseudocaranx dentex* (Kusuda et al., 1995) からの *P. anguilliseptica*、コイ *Cyprinus carpio* (塩瀬ら, 1974)、ティラピア *Sarotherodon niloticus* (宮下, 1984) およびチダイ *Erynnis japonica* (楠田ら, 1974) からの *P. fluorescens* あるいはその類縁菌、アマゴ *Oncorhynchus rhodurus* からの *P. chlororaphis* (Hatai et al., 1975) およびブリ *Seriola quinqueradiata* からの *P. putida* (楠田・豊嶋, 1976) がある。

そこで、ブリからの *P. putida* と本分離菌との性状を比較したが、運動性、硝酸塩還元、5°C での発育、溶血性、尿素、グルコン酸酸化、Tween 80 の諸項目において異なっていた。また、唯一の炭素源としての有機化合物の利用能では、アラビノースおよびガラクトースの結果が異なっていた。

病原性試験の結果、今回病魚から分離された *Pseudomonas* sp. は、アユに対し強い病原性を有することが確かめられ、京都府下および広島県下での養殖アユの大量死の原因と考えられた。また、アユばかりでなく、海産魚のヒラメやマダイにも強い病原性を有していることが明らかとなった。本分離菌は、塩分耐性試験では 5% NaCl でも十分増殖可能であったことから、今後本菌感染症が海産養殖魚にも発生しうる可能性がうかがわれた。

薬剤感受性試験の結果では、本菌はフロルフェニコールやオキシソリン酸等アユに使用可能な水産用抗菌剤にはまったく感受性がないうえ、他の水産用抗菌剤にもほとんど感受性がないことから、薬剤による死亡の抑制は期待できないと考えられた。

宮下 (1984) は *P. fluorescens* が感染したティラピアの

特徴的な症状として、脾臓における結節様菌集落の形成を挙げている。観察したアユ病魚においてはそのような病変は認められなかったが、実験的に感染させたマダイの脾臓には白色粒状の菌集落が観察され、原因菌と宿主の組合せによりそれぞれ異なった病理変化が生じるものと考えられた。

謝 辞

本稿の御校閲を賜りました広島大学の室賀清邦教授に深謝いたします。また、貴重な保存菌株を分与頂きました大阪府立淡水魚試験場の宮下敏夫氏に感謝いたします。

文 献

- Hatai, K., S. Egusa, M. Nakajima and H. Chikahata (1975): *Pseudomonas chlororaphis* as a fish pathogen. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **41**, 1203.
- Kusuda, R., N. Dohata, Y. Fukuda and K. Kawai (1995): *Pseudomonas anguilliseptica* infection of striped jack. *Fish Pathol.*, **30**, 121-122.
- 楠田理一・豊嶋利雄 (1976): 養殖ハマチから分離された病原性 *Pseudomonas* の性状について。魚病研究, **11**, 133-139.
- 楠田理一・豊嶋利雄・西岡 純 (1974): 養殖チダイから分離された病原性 *Pseudomonas* の性状について。魚病研究, **9**, 71-78.
- 宮下敏夫 (1984): ティラピア病魚から分離された *Pseudomonas fluorescens* および *Edwardsiella tarda*. 魚病研究, **19**, 45-50.
- 中井敏博・花田 博・室賀清邦 (1985): 養殖アユに発生した *Pseudomonas anguilliseptica* 感染症。魚病研究, **20**, 481-484.
- Palleroni, N. J. (1984): Genus 1. *Pseudomonas*. In "Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 1" (ed. by N. R. Krieg and J. G. Holt). Williams & Wilkins, Baltimore/London, pp. 141-199.
- Palleroni, N. J. and M. Doudoroff (1972): Some properties and taxonomic subdivisions of the genus *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **10**, 73-100.
- 坂崎利一・吉崎悦郎・三木寛二 (1988): 新細菌培地学講座・下, 第2版, 近代出版, 東京, 218 p.
- 塩瀬淳也・若林久嗣・富永正雄・江草周三 (1974): コイに発生した莢膜を持つシュウドモナス菌による魚病について。魚病研究, **9**, 79-83.
- 田村和満・吉崎悦郎・横沢光博・三木寛二 (1987): 図解臨床細菌検査, 坂崎利一編, 分光堂, 東京, pp. 112-152.
- Wakabayashi, H. and S. Egusa (1972): Characteristics of a *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pond-cultured eels (*Anguilla japonica*). *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **38**, 577-588.