最近流行している穴あき病様疾病のコイから分離された 非定型 *Aeromonas salmonicida* の性状

加来佳子・山田義行・若林久嗣*

(1999年 5月31日受付)

Characterization of Atypical *Aeromonas salmonicida* Isolated from an Epizootic Ulcerative Disease in Carp (*Cyprinus carpio*)

Yoshiko Kaku, Yoshiyuki Yamada and Hisatsugu Wakabayashi*

Department of Aquatic Bioscience, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
The University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

(Received May 31, 1999)

ABSTRACT—Since 1996, an epizootic ulcerative disease has affected both coloured- and common carp in Japan. We isolated atypical *Aeromonas salmonicida* from ulcerative lesions in the skin of diseased fish. It took more than 5 days for the isolates to make visible colonies on heart infusion agar at 18°C. All isolates were Gram-negative, facultatively anaerobic, non-motile, short rods, which reacted positively to rabbit anti-*A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC14174 serum by fluorescent antibody technique. However, the isolates differed from typical *A. salmonicida* in the following characters: coloured carp isolates were negative in the catalase test, and common carp isolates were negative in the oxidase test. Sequence analysis of 16S rRNA genes indicated that they could be identified as atypical *A. salmonicida*, and that coloured carp isolates differed in only one base of the sequences from common carp isolates. Subcutaneous injections of common carp with a representative strain of each type confirmed its virulence in producing ulcerative lesions on the skin.

Key words: *Aeromonas salmonicida*, ulcerative disease, 16S rRNA, carp, *Cyprinus carpio*

1996年頃からニシキゴイ (*Cyprinus carpio*) およびマゴイ (*C. carpio*) 養殖場に皮膚の病変を特徴とする疾病が流行し大きな被害を出している。この疾病は1970年代にキンギョに流行し (高橋ら, 1975), Elliot and Shotts (1980) によって非定型 *Aeromonas salmonicida* が原因菌であることが明らかにされた「穴あき病」に類似しているものの、ニシキゴイでは当才魚などの小型のコイでも発病する、加温越冬池では高水温ほど症状の進行が速い、患部の大小に関係なく斃死するなどの異なる特徴が

指摘されている*1。また病魚から非定型 *A. salmonicida* が分離できないと言われてきた。しかしながら、ニシキゴイにおいてエンロフロキサシンなど一部の抗生物質による治療効果が認められている点を重視し、細菌性、特に *A. salmonicida* ないしは類似の細菌が原因である可能性を検討した結果、新潟、石川県下のニシキゴイ病魚、群馬、茨城県下のマゴイ病魚からそれぞれ既往の菌株とは明らかに性状の異なる非定型 *A. salmonicida* が分離されたので、その性状を調べた。

東京大学大学院農学生命科学研究科

* Corresponding author

E-mail: ahisa@hongo.ecc.u-tokyo.ac.jp

*1 全日本錦鯉振興会パンフレット (1997) 「新穴あき病について」, p 1–4. 全日本錦鯉振興会ホームページ (<http://www.echigo.ne.jp/~koi/>) 上においても公開。

材料および方法

病魚および供試菌株

1997年9月から1998年3月に新潟、石川県下のニシキゴイ養殖場および群馬、茨城県下のマゴイ養殖場でみられた発病魚（魚体重7.9～1900 g）の体表患部から5%牛胎児血清（FBS）あるいは5%ウサギ脱繊維血を添加したブレインハートインフュージョン（BHI; ニッスイ）寒天培地を用いて菌分離を試み、簡易的な性状試験を行った結果、いずれの養殖場の病魚からも雑多な細菌に混じって *A. salmonicida* と思われる菌株が体表患部から分離された。そこで、これら分離菌株から代表株を選択し詳細な性状試験を行った（Table 1）。

Table 1. Strains used in this study

Strain	Isolation		
	Locality	Date	Fish
T83-k-sw-2*	Niigata	Jan. 1997	coloured carp
NI-441	Niigata	Sep. 1997	coloured carp
IS-205	Ishikawa	Mar. 1998	coloured carp
GU-187	Gunma	Dec. 1997	common carp
IB-277	Ibaraki	Dec. 1997	common carp

* This strain was supplied by Mr. Matoyama.

培養性状

分離菌株の発育に好適な培地を得ることを目的に、BHI、ハートインフュージョン（HI; ニッスイ）、トリプトソーヤ（TS; ニッスイ）寒天、Furunculosis (Fu) Agar およびそれぞれの培地に5% FBS あるいは1%ピルビン酸ナトリウムを添加した培地、ヒツジ、ウマ、ウサギ血液寒天培地（生培地；日生材）における発育を肉眼観察により比較した。さらに NI-441 株については、各培地上におけるコロニー形成数の測定を行った。すなわち、HI 寒天にて18°Cで1週間前培養した菌体を湿重量1 mg/mL となるよう滅菌リン酸緩衝液（PBS; Mg, Ca 不含）に懸濁し、この菌液中の生菌数を各試験培地を使用して寒天平板塗抹法により測定した。なお生菌数の測定は18°Cにて10日間培養後に行った。

また発育温度域は HI 液体培地を用いて2週間培養後に判定し、発育塩分濃度は0.5～5%に食塩を添加した HI 寒天を用いて18°Cで2週間培養した後に判定した。

生物学的性状

生物学的性状を調べるに際し、菌株の前培養に用いる基礎培地が各種性状試験結果に及ぼす影響の有無を検討した。すなわち HI, BHI, TS および Fu 寒天にて前培養した菌体を用いて各種性状試験を行い、判定結果に違いが生じるかどうかを調べた。性状試験は基礎培地に0.3% Yeast Extract (Difco) を添加して常法に準じて行い、さ

らに API20E SYSTEM (BioMerieux) による簡易試験を行った。なお、いずれの試験においても18°Cで1週間培養して判定した。

A-layer 蛋白の有無については0.01%クマシーブリリアントブルーを添加した HI 寒天を使用し、濃青色のコロニーを形成した菌株を A-layer 産生と判定した。また、抗 *A. salmonicida* ATCC14174 家兎血清を用いた間接蛍光抗体法により抗原抗体反応を調べた。薬剤感受性は感性ディスク N 培地（ニッスイ）に0.3% Yeast Extract を添加した基礎培地を用い、クロラムフェニコール、ベンジルペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン（昭和薬品化工株式会社）の4剤についてはディスク拡散法にて、オキシリン酸（SIGMA）については寒天平板希釈法にて調べた。

16S rRNA 遺伝子による系統解析

PCR により増幅した DNA 断片からのダイレクトシーケンシングにより、分離菌株の16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。すなわち、Weisburg *et al.* (1991) のプライマーを用いて増幅した DNA 断片から、Hiraishi (1992) が用いたシーケンシング用のプライマーを用いて塩基配列の決定を行った。なお、PCR による増幅に用いた機器、試薬および反応系の詳細については Yamada and Wakabayashi (1998) と同じである。また塩基配列の決定には ABI377 DNA シーケンサー（Applied Biosystem）および Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystem）を用い、プロトコルに従って行った。決定した塩基配列の系統解析は多重アライメントと系統樹作成のためのプログラムとして開発された ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) で行った。

病原性試験

分離菌株のマゴイに対する病原性を皮下注射によって調べた。供試魚として茨城県内水面水産試験場から入手した平均体重8～9 g のマゴイを使用した。代表株としてニシキゴイ由来菌株では NI-441 株を1尾あたり 3.1×10^4 , 3.1×10^3 , 3.1×10^2 , および 3.1×10 CFU となるように、またマゴイ由来菌株では GU-187 株を1尾あたり 7.8×10^4 , 7.8×10^3 , 7.8×10^2 , および 7.8×10 CFU となるように各10尾ずつの体幹部に接種し、対照区の魚には PBS のみを接種した。接種魚は平均水温21.5°Cで飼育し、10日間にわたって観察した。なお、実験期間中に死亡した魚については症状の観察と菌の接種部位からの菌の再分離を行った。

結 果

培養性状

いずれの菌株も基礎培地としては HI 寒天において最

Culture media used for viable counting*¹

Fig. 1. The viable counts of a strain NI-441 suspension by plate counting on various media. The bacterial cells were suspended at a concentration of 1mg/mL in PBS (Mg, Ca free), and immediately inoculated on each of the agar plates. *¹ Symbols: BHI, brain heart infusion (Nissui); HI, heart infusion (Nissui); TS, trypto-soya (Nissui); Fu, furunculosis; + S, add 0.5% fetal bovin serum; + P, add 1% sodium pyruvate; blood agar (Nisseizai). *² ND, not detected. Vertical bars indicate standard deviation.

も良好な発育を示し、培地添加物を加えた培地では、血液寒天培地に発育促進効果が認められた。しかしながら、いずれの培地においてもコロニーが確認されるまでには18°Cで5日以上を要し、1週間の培養で直径約1mm前後の微小なコロニーが形成された。なお、いずれの菌株も良好な発育を示した血液寒天やHI寒天では自己凝集は非常に弱かったのに対し、BHIあるいはTS寒天で培養した菌体には強い自己凝集が認められた。

また、PBSに懸濁したNI-441株の生菌数を各試験培地で測定した数値は、HI寒天、血清添加HI寒天、ピルビン酸添加培地および血液寒天培地では約 3×10^8 CFU/mLで、一元配置分散分析法 (one-factor ANOVA) を用いた検定で、 $P = 0.4686$ となり、これらの間には有意差が認められなかった。一方、その他の培地では検出限界の 10^4 CFU/mL未満となり、供試培地により生菌数に大きな違いが認められた (Fig. 1)。なお、ピルビン酸を添加した場合、菌が発育しなかったBHI、TS寒天においても 3×10^8 CFU/mL前後のコロニーが形成され、菌株のコロニー形成能を回復させる効果を示した。しかしながらピルビン酸を添加した場合、HI寒天も含め形成されるコロニーはかろうじて肉眼で観察できる程度の大きさとどまり、培養期間を2週間あるいは3週間に延長してもコロニーの発達は見られなかった。そのためピルビン酸の添加には、時間の経過に伴い菌の増殖を停止させる

作用が現れることが示唆された。

いずれの菌株も3~26.5°Cで発育が可能であり、16.5~20°Cで最も良好な発育が認められた。また塩分濃度は3%まで発育可能であった (Table 3)。

生物学的性状

前培養に用いた基礎培地が各種性状試験に及ぼす影響を検討した結果、マゴイ由来菌株において顕著な影響が認められた。すなわち、HI寒天で培養した場合にのみ供試した25株全てからカタラーゼの産生が認められ、またHI寒天およびFu寒天を用いた場合にのみ全ての株から褐色色素産生が認められた (Table 2)。なお、表には示さなかったが、BHIやTS寒天で前培養したマゴイ由来菌株は、その後の各種性状試験においても発育が不良となり、HI寒天で前培養した場合よりも判定が困難となった。一方、ニシキゴイ由来菌株では結果自体には影響は

Table 2. Effects of culture media on phenotypic characters of the isolates from common carp

Production of:	Culture medium			
	HI	Fu	BHI	TS
catalase	25/25*	2/25	2/25	2/25
brown pigment	25/25	25/25	3/25	3/25

* Number of positive strains / total strains tested.

Table 3. Phenotypic characteristics of the isolates from ulcerative lesions in coloured carp or common carp

Character	isolates from coloured carp			from common carp	
	T83-k-sw-2	NI-441	IS-205	GU-187	IB-277
Gram stain	—*1	—	—	—	—
Motility	—	—	—	—	—
Form	SR	SR	SR	SR	SR
OF test	F	F	F	F	F
Auto-aggregation	+	+	+	+	+
O/129 sensitivity	R	R	R	R	R
A-layer	+	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	—	—	—	—	—
Acid production in TSI	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
Production of: Oxidase	+	+	+	—	—
Catalase	—	—	—	+	+
Indole	—	—	—	—	—
H ₂ S	—	—	—	—	—
Brown pigments	—	—	—	+	+
Growth at: 3°C	+	+	+	+	+
10°C	+	+	+	+	+
15°C	+	+	+	+	+
25°C	+	+	+	+	+
26.5°C	w	w	w	+	+
30°C	—	—	—	—	—
Growth on NaCl: 0.5%	+	+	+	+	+
1.0%	+	+	+	+	+
2.0%	+	+	+	+	+
3.0%	w	w	w	+	+
3.5%	—	—	—	—	—
Antibiotic sensitivity to:					
Benzylpenicillin	R	R	R	R	R
Chloramphenicol	R	R	R	R	R
Streptomycin	R	R	R	S	S
Gentamicin	S	S	S	S	S
Oxolinic acid	R	R	R	S	S
Hemolytic activity to: Sheep	+	+	+	+	+
Rabbit	+	+	+	+	+
Horse	—	—	—	—	—
API20E					
β-Galactosidase	—	—	—	—	—
Arginine dihydrolase	—	—	—	—	—
Lysine decarboxylase	—	—	—	—	—
Ornithine decarboxylase	—	—	—	—	—
Simmons citrate	—	—	—	—	—
H ₂ S production	—	—	—	—	—
Urease	—	—	—	—	—
Tryptophan deaminase	—	—	—	—	—
Indole	—	—	—	—	—
Voges Proskauer	—	—	—	—	—
Gelatin hydrolysis	—	—	—	—	—
Glucose	+	+	+	+	+
Mannitol	—	—	—	+	+
Inositol	—	—	—	—	—
Sorbitol	—	—	—	—	—
Rhamnose	—	—	—	—	—
Sucrose	+	+	+	+	+
Melibiose	—	—	—	—	—
Amygdalin	—	—	—	—	—
Arabinose	—	—	—	—	—
Oxidase	+	+	+	—	—
API20E profile	0004204	0004204	0004204	0004120	0004120
FAT*2 with anti- <i>A. salmonicida</i> serum	+	+	+	+	+

*1 Symbols: +, positive; —, negative; SR, short rods; F, fermentative; R, resistance; S, sensitive; A/A, acid slant/butt; w, weakly positive.

*2 FAT, fluorescent antibody technique.

認められなかったものの、BHI やTS 寒天で前培養すると、性状試験の判定がしにくくなる場合があった。

HI 寒天にて前培養した菌体を用いた各種性状試験の結果を Table 3 に示した。供試菌株のうちニシキゴイ由来菌株である T83-k-sw-2, NI-441 および IS-205 で性状が一致し、またマゴイ由来菌株である GU-187 および IB-277 で性状が一致した。すべての供試菌株に共通する主な性状として、グラム陰性、非運動性、短桿菌、通性嫌気性、O/129 抵抗性、自己凝集能、A-layer 産生、さらに間接蛍光抗体法で抗 *A. salmonicida* 血清反応陽性という性状が挙げられ、これらは *A. salmonicida* の性状と一致した。しかしながら、ニシキゴイ由来菌株はカタラーゼ陰性、マゴイ由来菌株はオキシダーゼ陰性であることから、それぞれの菌株は表現型の異なる *A. salmonicida* の非定型株と考えられた。

ニシキゴイ由来菌株35株およびマゴイ由来菌株25株の薬剤感受性について調べた結果、ニシキゴイ由来菌株はストレプトマイシン耐性およびオキシリン酸耐性（最小発育阻止濃度：3.13–2.56 $\mu\text{g/mL}$ ）であり、一方のマゴイ由来菌株ではストレプトマイシン感受性、オキシリン酸感受性（最小発育阻止濃度：0.05–1.0 $\mu\text{g/mL}$ ）であった。

16S rRNA 遺伝子による系統解析

16S rRNA 遺伝子の部分的な塩基配列（1467 bp）を決定したところ、ニシキゴイ由来菌株とマゴイ由来菌株でそれぞれ均一であることが分かった。すなわち、NI-441, T83-k-sw-2, IS-205 が同じ配列、GU-187, IB-277 が同じ配列をそれぞれ示した。また、この両者における差異はわずか1塩基であった。決定したシーケンスと最も高い相同性を示した配列は、既知の16S rRNA 遺伝子の中では *A. salmonicida* subsp. *smithia* であり、系統解析の結果は供試菌株を *A. salmonicida* と同じグループに分類させた（Fig. 2）。すなわち、供試菌株は *A. salmonicida* に分類され、分離された魚種により遺伝子型の異なる非定型株であった。

病原性試験

NI-441 株、GU-187 株ともに 10^4 CFU の菌体を接種した区では約3日間で全ての魚が死亡し、その他の試験区でも1週間以内に殆どの魚が死亡した。また、菌接種によって死亡した魚にはいずれの菌株においても経過日数に伴う共通した症状の変化が見られた。すなわち、接種2–3日後に死亡した魚では無症状もしくは菌の接種部分が隆起して若干赤みを帯びる程度であったが、接種5日前後になると菌の接種部周辺の鱗が広くはがれ落ちていた（Fig. 4A）。また、接種後10日以降まで生残した魚は自然発病魚^{*1}（P. 155 の脚注）に似た穴あき症状を

Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of the isolates and selected species^{*1}. The tree was constructed by the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987). The bootstrap option, with 1000 bootstrapped runs, in the CLUSTAL W program was used to give the degree of confidence intervals for each node on the phylogenetic tree. ^{*1}Accession numbers of sequences used for phylogenetic analysis: *Pseudomonas aeruginosa* [Z76651]; *Pseudomonas putida* [D84020]; *Escherichia coli* [J01695]; *Vibrio anguillarum* [X16895]; *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* [Z78105]; *Aeromonas allosaccharophila* [S39232]; *A. caviae* [X60408]; *A. encheleia* [AJ224309]; *A. enteropelogenes* [X71121]; *A. eucrenophila* [X60411]; *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* [X60404]; *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* [X60409]; *A. ichthiosmia* [X71120]; *A. jandaei* [X60413]; *A. media* [X60410]; *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* [X60406]; *A. salmonicida* subsp. *masoucida* [X60407]; *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* [X60405]; *A. salmonicida* subsp. *smithia* [AJ009859]; *A. schubertii* [X60416]; *A. sobria* [X60412]; *A. trota* [X60415]; *A. veronii* biogroup *veronii* [X60414]; *A. veronii* biogroup *sobria* [X60414]. ^{*2}The nucleotide sequence data will appear in the DDBJ, EMBL and GenBank databases with the following accession numbers: NI-441, T83-k-sw-2, IS-205 (AB027005) and GU-187, IB-277 (AB027006).

示した（Fig. 4B）。なお、接種7日後までの死亡魚からの再分離率は100%であったが、症状が進行し穴あき状態に達するに従い二次感染菌も混入し、再分離率は低下した。

Fig. 3. Survival of common carp after subcutaneous injection with strains. **A:** strain NI-441 isolated from coloured carp. **B:** strain GU-187 isolated from common carp.

Fig. 4. Development of the external lesions of common carp injected subcutaneously with strain NI-441. **A:** Scales around the injected site deciduated widely after 5 days. **B:** An ulcerative lesion developed after 10 days.

考 察

穴あき病様疾病に罹病したニシキゴイおよびマゴイから分離された菌株は、その表現形質および 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析結果から、非定型 *A. salmonicida* に同定された。そしてマゴイに対する皮下注射によって、強い病原性が認められ、また長期間生残した接種魚には自然発病魚に類似した穴あき症状を呈する魚が認められた。マゴイに対して強い病原性が認められたことは、現在発生している穴あき病様疾病において病魚の斃死率が高いという事実と符合し、また長期間生残した接種魚に穴あき症状が生じたことは、これらの分離菌株と同種の非定型 *A. salmonicida* が、最近流行している穴あき病様疾病の一次原因となり得ることを示唆すると思われる。しかしながら、同様の疾病がウィルスを原因とするケースも報告されていることから^{*2}、ウィルス検査を実施していない本研究では疾病の原因菌として断定することは難しく、また加温越冬池では高水温ほど症状の進行が速いといわれている点は、分離した非定型 *A. salmonicida* だけで説明することは困難である。そのため、最近流行している穴あき病様疾病については、今後、ウィルスが原因である可能性、また非定型 *A. salmonicida* が原因である場合に症状の進行における二次感染菌の影響なども考慮して、さらに多数の症例について原因の特定を進める必要があると考えられる。

分離されたニシキゴイ由来菌株はカタラーゼ陰性、マゴイ由来菌株はオキシダーゼ陰性であり、キンギョなどコイ科魚類の穴あき病の原因菌として確認されてきた非定型 *A. salmonicida* とは異なる。このような性状を持つ非定型株は国外ではカタラーゼ陰性株がハンガリーのコイ (Csaba *et al.*, 1981) から、またオキシダーゼ陰性株は米国のギンザケ (Chapman *et al.*, 1991) およびデンマークの turbot (Pedersen *et al.*, 1994) から分離されている。*A. salmonicida* における表現型の多様化はこれまでヨーロッパで顕著に認められているが (Wiklund and Dalsgaard, 1998)、国内においても近年、塩分耐性を獲得した菌株が種々の海産魚で報告されている (中津川ら, 1994; 飯田ら, 1997; 泉川・植木, 1997)。そして今回分離されたカタラーゼ陰性株およびオキシダーゼ陰性株は一方がニシキゴイ、他方がマゴイであり、養殖環境が著しく異なるとはいえ、ほぼ同時期に流行病を発生させたことから、日本においても *A. salmonicida* が多様化しており、今後さらに *A. salmonicida* の多様化が進む可能性があると思われる。これらの非定型株の起源が何処にあるのか、また性状が変化した理由は何かについて解明していく必要があるのではないかと考えられる。

^{*2} 宮崎照雄 (1999) ニシキゴイの新穴あき病 (ウィルス血症に伴う穴あき病). 養殖, 36 (1), 86-87, 緑書房, 東京.

分離菌株はいずれも発育が著しく遅く、また供試培地の中では唯一 HI 寒天にて良好な発育を示すという特異的な培養性状を示した。近年、国内では *A. salmonicida* の分離培養に BHI, TS, Fu 寒天培地などが主に使用される傾向にあり、HI 寒天を用いることは少なくなっている。つまり、これまでに穴あき病様疾病に罹病したコイから非定型 *A. salmonicida* が分離されなかった要因の一つに分離に適さない培地の使用が考えられる。分離菌株において定型株と比較して欠けていた性状であるカタラーゼは、高圧滅菌により培地に蓄積する過酸化水素および大気条件下での菌自身の代謝により発生する過酸化水素を消去する自己防御の働き、一方のオキシダーゼは呼吸酵素としての働きを持ち、いずれも酸素条件下での発育に影響を及ぼすと推察される酵素である。また Ezura (1992) の報告と同様に、過酸化物を消去する働きを持つビルビン酸の添加によってコロニー形成数に促進効果が認められたことから、分離菌株は培地上に蓄積される過酸化物により発育が抑制されたのではないかと考えられる。分離菌株が HI 寒天で良好な発育を示した理由として、他の基礎培地と比較して加圧滅菌時の過酸化物の蓄積が少ないこと、また培養時に発生しにくいことが推察される。マゴイ由来菌株では BHI や TS 寒天で培養した場合に、性状試験の結果にも影響がみられたことから培養条件については今後さらに至適条件を検討する必要がある。特に Dalsgaard *et al.* (1998) は、試験に用いる菌の培養状態や試験時の条件を標準化せずに異なる研究機関において行われた非定型 *A. salmonicida* の性状試験で、同一の結果が得られた性状は非運動性とオルニチンデカルボキシラーゼ陰性のわずか 2 項目で、標準化した後でさえ 100% 一致する結果は得られなかったことを報告している。マゴイ由来菌株で得られた結果は、Dalsgaard *et al.* (1998) の報告を支持するものであり、非定型 *A. salmonicida* の性状試験には細心の注意を払う必要があると思われる。

A. salmonicida は良好な発育を示す定型株においても viable but non-culturable (VBNC) な状態に陥ることが知られている菌種である (Austin and Austin, 1993)。Ezura (1992) の研究で明らかにされたように、その原因の一つは酸素ストレスによるものであり、*A. salmonicida* の至適培養条件は場合によっては微好気あるいは嫌気培養であるのかもしれない。実際、本研究においても分離菌株の OF 試験では、嫌気的環境においてより速い発育とブドウ糖の分解が行われていた。以上のように *A. salmonicida* における培養学的性状や培養条件が性状試験に及ぼす影響は、この菌種の至適培養条件の再検討が必要であることを意味しており、今後、国内においても標準化を図る必要があると考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、病魚のサンプリングにご協力いただいた新潟内水面水産試験場の細谷久信氏、茨城県内水面試験場の熊丸敦郎氏、群馬県水産試験場の林不二雄氏、ならびに菌株の提供をいただいた新潟県内水面水産試験場の的山央人氏に深謝します。

文 献

- Austin, B. and D. A. Austin (1993): Section 7. *Aeromonadaceae* representatives (*Aeromonas salmonicida*). In "Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish", 2nd ed., Ellis Horwood Ltd., Chichester, pp. 86–170.
- Chapman, P. F., R. C. Cipriano and J. D. Teska (1991): Isolation and phenotypic characterization of an oxidase-negative *Aeromonas salmonicida* causing furunculosis in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Wildl. Dis.*, **27**, 61–67.
- Csaba, G., B. Körmendy and L. Békési (1981): Observations on the causative agent of carp erythrodermatitis in Hungary. In "The Proceedings of an International Seminar on Fish, Pathogens and Environment in European Polyculture, Szavas, Hungary", pp. 95–110.
- Dalsgaard, I., B. K. Gudmundsdóttir, S. Helgason, S. Høie, O. F. Thoresen, U.-P. Wichardt and T. Wiklund (1998): Identification of atypical *Aeromonas salmonicida*: inter-laboratory evaluation and harmonization of methods. *J. Appl. Microbiol.*, **84**, 999–1006.
- Elliott, D. G. and E. B. Shotts, Jr. (1980): Aetiology of an ulcerative disease in goldfish, *Carassius auratus* (L.): microbiological examination of diseased fish from seven locations. *J. Fish Dis.*, **3**, 133–143.
- Ezura, Y. (1992): Enhanced recovery of starved or injured *Aeromonas salmonicida*. In "Proceedings of the OJI International Symposium on Salmonid Diseases", pp. 194–200.
- Hiraishi, A. (1992): Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. *Lett. Appl. Microbiol.*, **15**, 210–213.
- 飯田貴次・坂田千夏・川津浩嗣・福田 穰 (1997): 海産魚の非定型 *Aeromonas salmonicida* 感染症。魚病研究, **32**, 65–66.
- 泉川晃一・植木範行 (1997): クロソイに発生した非定型 *Aeromonas salmonicida* 感染症。魚病研究, **32**, 67–68.
- 中津川俊雄 (1994): ムシガレイから分離された非定型 *Aeromonas salmonicida*。魚病研究, **29**, 193–198.
- Pedersen, K., H. Kofod, I. Dalsgaard and J. L. Larsen (1994): Isolation of oxidase-negative *Aeromonas salmonicida* from diseased turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis. Aquat. Org.*, **18**, 149–154.
- Saitou, N. and M. Nei (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406–425.
- 高橋耿之介・川名俊雄・中村多恵子 (1975): キンギョの穴あき病に関する研究—I. 発病部位について。魚病研究, **9**, 174–178.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994): Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-

- specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.*, **22**, 4673–4680.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, **173**, 697–703.
- Wiklund, T. and I. Dalsgaard (1998): Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. *Dis. Aquat. Org.*, **32**, 49–69.
- Yamada, Y. and H. Wakabayashi (1998): Enzyme electrophoresis, catalase test and PCR-RFLP for the typing of *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol.*, **33**, 1–5.