「獣医学と魚病」に関するシンポジウム記録(Ⅱ)

〔日本学術会議獣医学研究連絡会主催, 獣医学会共催, 昭和58年11月28日, 日本学術会議講堂〕

魚類由来ビブリオが産生するニジマスおよびマウス致死毒

児玉 洋^{*1)} MOHAMED MOUSTAFA^{*1)} 石黒信良^{*2)} 見上 彪^{*1)} 伊沢久夫^{*1)}

Extracellular Toxic Substance of Fish *Vibrio* for Rainbow Trout and Mice
 HIROSHI KODAMA (Department of Epizootiology, Faculty of Veterinary
 Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060) et al.

SUMMARY

The biological activities of cell-free culture filtrates of three pathogenic strains of *Vibrio* commonly associated with vibriosis in fish (*V. anguillarum* NCMB6 and NCMB571 strains, and *Vibrio* sp. N7802 strain) were examined to determine their relations to the pathogenesis. Extracellular materials from culture filtrates of NCMB571 and N7802 strains separated by DEAE-cellulose chromatography followed by Sephadex G200 chromatography showed lethal toxicity for rainbow trout and mice. Cytopathogenicity was observed in CHSE-214 chinook salmon embryo-derived cell line inoculated with culture filtrate of NCMB571 strain. NCMB6 and NCMB571 strains produced hemolysin against erythrocytes of eleven animal species, including fish. Hemolysin of NCMB571 strain was thermolabile, but toxic material was comparatively thermostable. These strains of *Vibrio* also produced alkaline proteolytic enzyme. On the contrary, N7802 strain was found to be a poor producer of both hemolysin and protease. These results indicated that the extracellular products, such as toxic material, hemolysin and protease, produced by *Vibrio* may be responsible for pathogenesis of vibriosis in fish. However, the lethal toxicity of culture filtrate of N7802 strain did not seem to be related to hemolysin or protease.

要 約

魚類のビブリオ病を起こす3株の強毒ビブリオの培養上清濾液の溶血活性, 蛋白分解酵素活性ならびにニジマスおよびマウス致死活性を調べ, 発病病理の一端の解明を試みた。DEAE-セルロースおよびセファデックス G 200 クロマトグラフィーを用い, *Vibrio anguillarum* NCMB 571 株および *Vibrio* sp. N 7802 株培養上清濾液より分離した材料は, ニジマスとマウスに対し致死活性を示した。NCMB 571 株培養上清濾液を接種したマスノスケ胚由来株化細胞 CHSE-214 に細胞変性効果が見られた。*V. anguillarum* NCMB 6 株および NCMB 571 株由来材料は, 魚類を含む11種の動物由来赤血球を溶血した。NCMB 571 株が産生する溶血素は易熱性であるが, 致死活性物質は熱に対しより抵抗性を示した。また, これらの株はアルカリ域で活性を示す蛋白分解酵素を産生した。これに対して, N 7802 株は溶血素ならびに蛋白分解酵素をほとんど産生しなかった。これらの結果は, 魚類由来ビブリオが産生する毒性物質, 溶血素あるいは蛋白分解酵素などの菌体外産物がビブリオ病の病理発生に関与していることを示唆する。N 7802 株が産生する致死活性物質は溶血素あるいは蛋白分解酵素とは異なると考えられた。

Vibrio anguillarum をはじめとして水生動物より分離されるビブリオは, 多種類の海水^{11, 21, 30, 32)} および淡水魚類^{12, 17, 25)} に致死的な伝染病を起こし, 日本ではとくにアユ, ニジマス, ブリおよびタイの被害が大きい。皮膚, ヒレ

あるいは筋肉および内臓諸器官に出血壊死性の病変を呈して病魚は死亡する²⁹⁾。現在まで試作ワクチンの予防効果に関する研究がなされたが^{5, 10, 13)}, わが国ではワクチンは試用の段階にあり, 野外試験が計画されている。

ところで, 魚類より分離される細菌のあるものは種々の生物学的活性物質を産生する。すなわち溶血素^{1, 3)}, 蛋白分解酵素^{1, 3, 22)}, acyltransferase^{2, 24)} あるいは血球凝集

*1) 北海道大学獣医学部(札幌市北区北18条西9丁目)

*2) 共立商事株式会社中央研究所(茨城県稲敷郡基崎村高見原)

素¹⁷⁾などである。さらにエンテロトキシン¹⁷⁾、白血球毒^{3,8)}をはじめとする毒性物質^{1,19,22,34)}の産生も知られるにおよび、これらの毒性物質と菌体外産物との関連性が論議されている。

しかし、ビブリオにおいては腸管粘膜への付着による菌の増殖¹⁶⁾、溶血素^{25,26)}あるいはプラスミド⁴⁾と病原性との関連が推測されているのみである。そこでわれわれは今回の研究において、ビブリオ培養上清濾液よりニジマスおよびマウス致死物質の精製を行い、また溶血素および蛋白分解酵素の性状を調べ、致死物質と菌体外産物の関連性を調べることににより、病理発生的一端を明らかにしようと試みた。

1. 材 料 と 方 法

1) 供 試 菌 株

3株の強毒ビブリオ (*V. anguillarum* NCMB 6株および NCMB 571株, *Vibrio* sp. N 7802株)は小松功氏(共立商事中央研究所, 茨城県)より分与された。それら菌株の主な性状、培養条件およびニジマスに対する毒力を表1に示す。より詳細な性状については絵面ら⁹⁾の報告を参照されたい。N 7802株はビブリオ病に冒されたニジマスより分離されたもので、絵面ら⁹⁾の分類では phenon II, serotype J-O-1 に属する。また、生化学的性状および DNA 相同試験により *V. anguillarum* と異なる一群のビブリオに対して SCHIEWE ら³²⁾が *V. ordalii* として提案したものと性状が一致する。

2) 菌の培養および濃縮培養上清濾液の調製

ビブリオ濃縮培養上清濾液の調製法を図1に示す。前培養した菌液 5 ml を 1 l の培地 [1.5% 食塩を含むハートインフュージョン (HI) ブイヨン (日水製薬, 東京)] に加え、ときどき振盪しながら 25℃ で培養した。所定時間培養の後、遠心により菌を除き (5,000 g, 20分; 久保田, KR-180, 東京), 上清をザイツ濾過器で濾過した。濾液に粉末硫酸を 50% 飽和になるように加え、ときどき攪拌しながら 4℃ で 1 晩放置した後、遠心 (6,000 g, 60分) により沈査を集めた。沈査をリン酸緩衝食塩液 (PBS;

ビブリオ培養液 (1.5% 食塩を含む HI ブイヨン)
— 遠心 (5,000 g, 20分)

培養上清

— ザイツ濾過

培養上清濾液

— 硫酸塩析 (50% 飽和); 4℃, 1 夜

— 遠心 (6,000 g, 60分)

沈査

— 0.01 M PB (pH 7.0) に対し透析

— ポリエチレングリコールで濃縮

— 0.01 M PB (pH 7.0) に対し透析

濃縮培養上清濾液

— DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー

— 濃縮

— 0.15 M PBS (pH 7.2) に対し透析

DII 画分

— セファデックス G 200 ゲル濾過

— 濃縮

— 0.15 M PBS (pH 7.2) に対し透析

GI および GII 画分

図1 ビブリオ濃縮培養上清濾液の調製法およびニジマスならびにマウス致死活性物質の分離方法

0.15M, pH 7.2) に溶解し、同緩衝液に対して透析を行った。さらにポリエチレングリコールを用いて濃縮し、これを濃縮培養上清濾液とした。

3) クロマトグラフィー (図1 参照)

(1) DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー: 0.01 M リン酸緩衝液 (PB; pH 7.0) で平衡化した DEAE-セルロースカラム [3.5×25 cm; ブラウン社, 米国] に同緩衝液に対し透析した濃縮培養上清濾液を吸着させた。セルロースに吸着しない蛋白を流出させたのち、0~1.0M 食塩を加えた PB により連続的に蛋白を流出させた。各画分に含まれる蛋白および糖は、それぞれ LOWRY ら²³⁾および DUBOIS ら⁷⁾の方法に従って定量した。

(2) セファデックス G 200 ゲル濾過: DEAE-セルロースクロマトグラフィーで分離した材料をセファデックス G 200 カラム [2.5×90 cm; ファーマシヤ社, スエ

表1 供試した魚類由来ビブリオ菌株とその主な性状

性 状	菌 株		
	<i>V. anguillarum</i> NCMB 571株	<i>V. anguillarum</i> NCMB 6株	<i>Vibrio</i> sp. N 7802株
由 来	ニジマス	大西洋タラ	ニジマス
分 類 (絵面ら*)	phenon I, serotype J-O-3	phenon I, serotype J-O-1	phenon II, serotype J-O-1
50% 致死量**	2.1×10 ⁴	試験せず	2.7×10 ⁴
溶血素産生	++	+++	弱
蛋白分解酵素産生	++	+++	弱
培 養 条 件***	25℃, 30 時間	25℃, 30 時間	25℃, 60 時間

注) *: 文献 10 **: 約 15 g のニジマスに腹腔内接種 (0.1 ml/尾) ***: 1.5% 食塩を含む HI ブイヨン

ーデン〕にかけ、0.15 M PBS (pH 7.2) で流出させた。

4) 溶血活性の測定

マイクロプレートで2倍段階希釈した濃縮培養上清濾液 (0.1 ml) に 0.1 ml の 0.5% 新鮮血球浮遊液 (PBS; pH 7.2 で調製) を加え混和した。魚類赤血球の場合は 25℃ 5 時間、哺乳類あるいはニワトリ血球の場合には 30℃ 18 時間静置した後、完全溶血を示した濃縮培養上清濾液の希釈倍数を溶血素価とした。

また、溶血活性はニジマスあるいはマウス血球を用いた定量法によっても測定した。すなわち、2% 血球浮遊液 1.8 ml と 2 倍段階希釈した材料 0.2 ml を混合した試験管を 37℃ で 2 時間静置したのち、遠心 (700 g, 5 分, 4℃) 1 ml を採取した。蒸留水 1 ml を加え希釈したのち、分光光度計を用い (島津, UV-150, 東京) 波長 540 nm で比色定量を行った。被検材料を含まない対照の血球浮遊液に 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を等量加えたものの吸光度を 100% 溶血とみなし、溶血活性を次式にしたがって計算した。

溶血活性 =

$$\frac{\text{被検材料を加えた血球の溶血}-\text{対照血球の溶血}}{\text{SDSを加えた血球の溶血}-\text{対照血球の溶血}} \times 100$$

5) 蛋白分解酵素活性の測定

200 μg の蛋白を含む被検材料 1 ml をそれぞれ pH の異なる緩衝液で調製し (0.07 M PB; pH 5.0~8.5 および 0.1 M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液; pH 9.0~10.5), それぞれの pH に調製した 1% カゼイン溶液を 1 ml 基質として加えたのち、30℃ で 15 分静置した。氷冷した 1 M トリクロル酢酸を 1 ml 加え反応を停止させたのち、遠心 (2,000 g, 10 分, 4℃) を採取した。波長 280 nm で測定した吸光度と対照 (緩衝液にカゼイン溶液を加えたもの) の吸光度の差を酵素活性として現わした。

6) ニジマスおよびマウスに対する毒性試験

北海道内のニジマス飼育業者から購入した平均 2.8 g のニジマス幼魚を、1 週以上予備飼育したのち (100 l 水槽, 流水量 6.4 l/分, 水温 11℃) 材料を 0.1 ml 腹腔内接種した。また、マウスは 4~5 週齢の ddY (平均 25 g) を用い、尾静脈より材料を接種した。動物の症状および生死を 2 週間観察し、50% 致死量 (LD₅₀) を Behrens-Kärber¹⁹⁾ の方法で計算した。

7) 魚類由来株化細胞に対する毒性

濃縮培養上清濾液および DEAE-セルロースクロマトグラフィーにより分離した材料を、マスノスケ (chinook salmon) 胚由来株化細胞 [CHSE-214; 北里大学水産学部, 長林俊彦講師より分与] に接種し、その毒性を調べた。細胞は 12 穴の組織培養用プレートで、10% 牛胎仔血清を加えたイーグル MEM 培地 [pH 7.2; 日水製薬, 東京] を用い、20℃ で炭酸ガス培養した。

2. 成績

1) 溶血活性

濃縮培養上清濾液の溶血活性を 3 種の魚類 (ニジマス, ヤマメおよびキンギョ), ニワトリおよび 7 種の哺乳類由来の赤血球を用いて調べた (表 2)。NCMB 6 株および NCMB 571 株は調べたすべての赤血球に対し溶血活性を示した。魚類赤血球は他種動物の赤血球にくらべて高い感受性を示し、とりわけキンギョ赤血球の感受性は高かった。これに対して、N 7802 株由来材料の溶血活性は前 2 者にくらべると弱かった。

表 2 ビブリオ濃縮培養上清濾液の各種赤血球に対する溶血活性

赤血球が 由来する 動物種	菌 株		
	<i>V. anguillarum</i> NCMB 571 株	<i>V. anguillarum</i> NCMB 6 株	<i>Vibrio</i> sp. N 7802 株
ニジマス	4,096	>8,192	64
ヤマメ	16,384	16,384	32
キンギョ	32,768	131,072	128
ニワトリ	1,024	2,078	16
マウス	128	2,048	4
ハムスター	2,048	2,048	4
ウサギ	16,384	2,048	8
ヒツジ	64	2,048	8
ウシ	1,024	4,096	2
ウマ	128	2,048	4
ヒト (O 型)	128	1,024	8

注) NCMB 571 株, NCMB 6 株および N 7802 株濃縮培養上清濾液の蛋白量 (mg/ml) はそれぞれ 9.45, 8.04 および 7.20, また糖 (mg/ml) はそれぞれ 0.74, 1.03, 2.42 であった

図 2 ビブリオ濃縮培養上清濾液の蛋白分解酵素活性。試験方法は「材料と方法」を参照

2) 蛋白分解酵素活性

濃縮培養上清濾液の酵素活性とその至適 pH を図 2 に示す。NCMB 6 株および NCMB 571 株においてそれぞれ pH 8.6~9.6, 9.1~10.0 の範囲で活性が見られ、それらの至適 pH は 8.6 および 9.5 であった。これに対して N 7802 株ではほとんど酵素活性を認めなかった。

3) マウス致死物質および溶血素の温度感受性

NCMB 571 株濃縮培養上清濾液のマウス致死活性を調べ、また致死物質および溶血素の温度感受性を調べた(図 3)。蛋白量 1,890 μ g/0.2 ml を接種したすべてのマウスは 2 日以内に死亡し、これらのマウスには表 3 に示す症状および肉眼病変が観察された。80℃ 20 分加熱

図 3 NCMB 571 株濃縮培養上清濾液のマウス致死物質および溶血素の熱感受性。蛋白量 1,890 μ g/0.2 ml を静脈内接種した。熱処理後の残存溶血活性は、未処理材料のマウス血球に対する溶血活性を 100% とした場合の加熱処理材料の溶血活性の割合で示す

した材料を接種したマウスは 3/7 が死亡したが、121℃ 20 分の加熱で致死活性はまったく失われた。また、対照として濃縮 HI ブイヨン濾液(蛋白量 1,850 μ g/0.2ml)を接種したマウスは認むべき症状を呈さず、死亡するものもなかった。

これに対して、溶血活性は 50℃ 20 分の加熱で約 90% が、また 60℃ あるいはそれ以上の加熱ですべてが失われた。

表 3 ビブリオ濃縮培養上清濾液あるいは致死物質を接種したマウスおよびニジマスの症状と肉眼病変

【マウス (静脈内接種)】

症 状

- けいれん (急性例)
- 元気消失, 食欲不振
- 被毛逆立
- 羞明, 流涙および目に分泌物貯留
- 体温下降

肉眼病変

- 腸管漿膜, 腹側筋の充血
- 血様腹水貯留
- 肺充血

【ニジマス (腹腔内接種)】

症 状

- 急性: けいれん
- 慢性: 元気消失, 食欲不振
- 体色黒化

肉眼病変

- 腸管漿膜, 腹側筋および頭腎の充出血
- 腸壁の水腫性変化
- 血様腹水貯留
- 肝臓の退色および水腫性変化
- 脾臓実質の軟弱化
- 腎臓の退色

表 4 ビブリオ培養上清濾液からのニジマスおよびマウス致死活性物質の分離

接 種 材 料	<i>V. anguillarum</i> (NCMB 571 株)			<i>Vibrio</i> sp. (N 7802 株)		
	致死活性*		溶血活性****	致死活性		溶血活性
	ニジマス**	マウス***		ニジマス	マウス	
→ 培養上清濾液	試験せず	5,660	>10,000	試験せず	試験せず	—
→ 濃縮培養上清濾液	>930	710	155	>1,080	>4,940	—
DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー						
→ DI 画分	—	—	950	—	—	—
→ DII 画分	750	1,090	1,230	>540	500	—
セファデックス G 200 ゲル濾過						
→ GI 画分	420	350	290	350	200	—
→ GII 画分	>960	>930	85	>1,060	—	—
対照(HI ブイヨン濃縮濾液)	—	—	—	—	—	—

注) *: LD₅₀ (蛋白量; μ g) を Behrens-Kärber¹⁸⁾ の方法で計算 ** : 約 2.8 g のニジマスに 0.1 ml 腹腔内接種

*** : 約 25 g の ddY マウスに 0.1 ml 静脈内接種 **** : ニジマス赤血球が 50% 溶血を起こすのに必要な蛋白量 (μ g/2 ml 血球-溶血素材料混合液)

4) ニジマスおよびマウス致死物質の精製

NCMB 571 株および N 7802 株の濃縮培養上清濾液より致死物質の分離、精製を試みた。DEAE-セルロースクロマトグラフィーでは、濃縮培養上清濾液はセルロースに吸着しない蛋白(DI)と、食塩濃度を高めた時に流出する蛋白(DII)に分かれた。後に述べるように、DII にのみニジマスおよびマウス致死活性が認められたため、さらにセファデックス G 200 を用いて致死物質の分離を試みた。その結果、void volume より少し後に流出する蛋白(GI)とさらに遅れて流出する蛋白(GII)とに分かれ、GI には糖も含まれていた。

これら分離した各画分のニジマスとマウスに対する致

死活性およびニジマス血球に対する溶血活性を表 4 に示す。NCMB 571 株および N 7802 両株とも DII 画分に致死活性を認め、さらに GI 画分にも活性を見出した。また、GII 画分にも弱いながら致死活性が認められた。表 3 にこれらの材料を接種したニジマスの症状および肉眼病変を示す。ニジマスは接種後 1~13 日で死亡し、半数以上が接種後 3~5 日で死亡した。NCMB 571 株由来材料ではどの画分にも溶血活性が認められたが、溶血活性と致死活性の強さとは必ずしも一致しなかった。また、蛋白分解酵素は、DEAE-セルロースおよびセファデックス G 200 クロマトグラフィーにおいて、いくつかのピークに分かれて流出した(表に示さず)。これに対して、

注) 材料接種 3 日後に写真撮影

- ①: 濃縮培養上清濾液 (蛋白量 950 μ g/2 ml)
- ②: DI 画分 (700 μ g) ③: DII 画分 (730 μ g)
- ④: HI プイヨン濃縮濾液 (810 μ g)
- ⑤: 正常細胞

図 4 NCMB 571 株濃縮培養上清濾液の CHSE-214 株化細胞に対する細胞毒性

N 7802 株由来材料には溶血活性はまったく認められなかった。

5) 魚類由来株化細胞に対する毒性

図4は、NCMB 571 株濃縮培養上清濾液および DI, DII 画分の CHSE-214 株化細胞に対する毒性を示すものである。濃縮培養上清濾液 (950 μ g) および DII 画分 (730 μ g) を接種した細胞では、接種後2日で細胞変性効果が見られ、細胞は萎縮、円形化し、ついにはプレートより脱落した。これに対し、DI 画分あるいは HI プイオン濃縮濾液を接種した細胞および非接種正常細胞には、細胞変性効果は見られなかった。

3. 考 察

水生動物から分離される細菌が産生する種々の酵素あるいは毒性物質のうち、病理発生に果たす役割が明らかにされているものは少ない。本研究は魚類由来ビブリオが産生する生物学的活性物質と病理発生との関連性を知る目的で行われた。

ビブリオの病原性に対する溶血素の重要性は、ヒトの食中毒の原因菌である *V. parahaemolyticus* において証明されている³¹⁾。今回の研究において NCMB 571 株の産生する溶血素とマウス致死物質は熱に対する感受性に差異が認められた(図3)。さらにクロマトグラフィーにより分離されたそれぞれの画分の溶血活性は、致死活性あるいは細胞毒性とは必ずしも平行しなかった(表4, 図4)。また、溶血素をほとんど産生しない N 7802 株もニジマスおよびマウス致死物質を産生することが示された。これらの結果は、溶血素と致死物質は必ずしも同一の物質ではないことを示唆している。さらに *V. anguillarum* 溶血素の活性発現は温度依存性で、12 $^{\circ}$ C 以下の低温では活性発現が遅延したり弱められる^{20, 26)}。ニジマスは冷水性の魚であり、自然環境下では溶血素が産生されても、その影響は弱いものと思われる。

今回の研究において、*V. anguillarum* は蛋白分解酵素を産生することが示された。しかし、NCMB 571 株培養上清濾液を接種したニジマスに見られる病変は、魚病病原菌である *Aeromonas salmonicida*⁹⁾ や *A. hydrophila*¹⁾ において報告されているものにくらべるとより軽度なものであり、組織の壊死、融解も顕著ではなかった。蛋白分解酵素が病原性に直接関与するか否かは今回の研究からは明らかではないが、ELLIS ら⁹⁾ が *A. salmonicida* の発病病理について述べているように、好塩基性顆粒球の融解により放出されたヒスタミンの作用などによる間接的な病原作用が働くことは考えられる。

ヒトにおいては、*V. cholerae*¹⁴⁾ や *V. mimicus*⁹⁾ の産生する外毒素が病原性と密接に関連することが知られている。しかし魚類由来のビブリオにおいては、外毒素の産生は現在まで知られていない。今回の研究において、溶

血素および蛋白分解酵素を産生する NCMB 571 株とそれらをほとんど産生しない N 7802 株について、培養上清濾液中の致死物質の精製を試みたところ、両者とも致死活性を持つ物質が得られた。この結果は、少なくとも N 7802 株においては溶血素あるいは蛋白分解酵素が致死因子ではないことを示している。2種のクロマトグラフィーを用いて両株培養上清濾液より分離し得た致死物質(GI)のニジマスおよびマウスに対する LD₅₀ は数 100 μ g (蛋白) であった。この量は現在まで知られている他種細菌の外毒素の毒力と比較するとかなり弱いものであり、GI はまだ単一の物質ではないことが考えられる。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果は、GI は2種の蛋白と1つの糖蛋白を含んでいることを示唆する(未発表)。これらのバンドのいずれの部分に致死活性が存在するかが問題であるが、現在これらの物質の精製を試みている。

魚類の養殖規模の拡大にともなう感染症の発生が問題となるいっぽうで、公衆衛生上の観点から化学療法剤の投与が規制されつつある現状では、ワクチンによる伝染病の防御が有効な手段となる。ビブリオの産生する種々の菌体外産物および菌体成分の免疫学的性質を研究することにより、発病病理の解明とともに、ワクチン開発に有効な知見が得られるであろう。

本実験を遂行するにあたりご協力いただいた講座各員に深謝する。

引用文献

- 1) ALLAN, B. J. and STEVENSON, R. M. W.: *Can. J. Microbiol.*, 27, 1114~1122 (1981).
- 2) BUCKLEY, J. T., HALASA, L. N. and MACINTYRE, S.: *J. Biol. Chem.*, 257, 3320~3325 (1982).
- 3) CIPRIANO, R. C., GRIFFIN, B. R. and LIDGERDING, B. C.: *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38, 1322~1326 (1981).
- 4) CROSA, J. H., SCHIEWE, M. H. and FALKOW, S.: *Infect. Immun.*, 18, 509~513 (1977).
- 5) CROY, T. R. and AMEND, D. F.: *Aquaculture*, 12, 317~325 (1977).
- 6) DAVIS, B. R., FANNING, G. R., MADDEN, J. M., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 14, 631~639 (1981).
- 7) DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., et al.: *Anal. Chem.*, 28, 350~356 (1956).
- 8) ELLIS, A. E., HASTINGS, S. T. and MUNRO, A. L. S.: *J. Fish Dis.*, 4, 41~51 (1981).
- 9) 絵面良男, 田島研一, 吉水 守, ほか: 魚病研究, 14, 167~179 (1980).
- 10) GOULD, R. W., O'LEARY, P. J., GARRISON, R. L., et al.: *Fish Pathol.*, 13, 62~68 (1978).
- 11) HAASTEIN, T. and HOLT, G.: *J. Fish Biol.*, 4, 33~37 (1972).
- 12) HACKING, M. A. and BUDD, J.: *J. Wildl. Dis.*, 7, 273~280 (1971).

- 13) 林 孝市郎, 小林茂雄, 鎌田淡紅郎, ほか: 三重
大水産学部紀要, 6, 181~191 (1964).
- 14) HOLMGREN, J.: *Nature*, 292, 413~417 (1981).
- 15) HORNE, M. T.: *Microbial Diseases of Fish*,
ROBERTS, R. J., editor, 171~187, Academic
Press, London (1982).
- 16) HORNE, M. T. and BAXENDALE, A.: *J. Fish Dis.*,
6, 461~471 (1983).
- 17) JIWA, S. F. H.: *Vet. Microbiol.*, 8, 17~34 (1983).
- 18) KÄRBER, G.: *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*,
162, 480~483 (1931).
- 19) KIMURA, H. and KUSUDA, R.: *J. Fish Dis.*,
2, 501~510 (1979).
- 20) KODAMA, H., MOUSTAFA, M., ISHIGURO, S., et al.:
Am. J. Vet. Res., in press.
- 21) LEVIN, M. A., WOLKE, R. E. and CABELLI, V. J.:
Can. J. Microbiol., 18, 1585~1592 (1972).
- 22) LI, M. F. and FLEMMING, C.: *Can. J. Microbiol.*,
13, 405~416 (1967).
- 23) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L.,
et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275 (1951).
- 24) MACINTYRE, S. and BUCKLEY, J. T.: *J. Bact.*,
135, 402~407 (1978).
- 25) MUNN, C. B.: *FEMS Microbiology Letters.*, 3,
265~268 (1978).
- 26) MUNN, C. B.: *Fish Diseases*, AHNE, V., editor,
69~74, Springer-Verlag, Berlin (1980).
- 27) MUROGA, K. and EGUSA, S.: *Bull. Jpn. Soc.*
Sci. Fish., 33, 636~640 (1967).
- 28) 大西圭二, 室賀清邦: 魚病研究, 11, 159~165
(1976).
- 29) RICHARDS, R. H. and ROBERTS, R. J.: *Fish*
Pathology, ROBERTS, R. J., editor, 183~204,
Bailliere Tindall, London (1978).
- 30) RUCKER, R. R., EARP, B. J. and ORDAL, E. J.:
Trans. Am. Fish. Soc., 83, 297~312 (1953).
- 31) SAKAZAKI, R., TAMURA, K., KATO, T., et al.:
Jpn. J. Med. Sci. Biol., 21, 325~331 (1968).
- 32) SCHIEWE, M. H., TRUST, T. J. and CROSA, J. H.:
Current Microbiol., 6, 343~348 (1981).
- 33) SMITH, I. W.: *J. Gen. Microbiol.*, 24, 247~252
(1961).
- 34) ULLAH, M. A. and ARAI, T.: *Fish Pathol.*, 18,
71~75 (1983).

/////新 刊 紹 介/////

獣 医 伝 染 病 学

<第 二 版>

笹 原 二 郎 柴 田 重 孝 編
清 水 悠 紀 臣 椿 原 彦 吉

定 価 9,800 円

本書はその主たる目的が獣医教育にあり、従来の成書には取り上げられていなかった感染病を考
える上に欠くことのできない基本的理論と実験防疫に必要な項目が盛り込まれており、さらに各論
では実験動物、魚類の章が設けられていて、在来の型を破って多くの努力工夫がなされている。

教育者・研究者ならびに家畜伝染病防疫に携わる実務家はもちろんのこと、特に大学における教
科書・参考書としてご利用をすすめる。

<主要目次> 総論 (1. 感染と発病機序 2. 疫学 3. 診断 4. 予防と防疫 5. 治療) 各論 (牛ウ
イルス病 牛細菌病 牛リケッチャ類による疾病 牛マイコプラズマ病 牛真菌症 牛原虫病 めん羊・山羊・
ウイルス病 めん羊・山羊細菌病 めん羊・山羊リケッチャ類による疾病 馬ウイルス病 馬細菌病 馬真菌症
馬原虫病 豚ウイルス病 豚細菌病 豚リケッチャ類による疾病 豚マイコプラズマ病 豚真菌症 豚原虫病
犬・猫ウイルス病 犬・猫細菌病 犬・猫リケッチャ類による疾病 犬・猫真菌症 ミンク・ウイルス病 ミン
ク細菌病 猿ウイルス病 猿細菌病 家禽ウイルス病 家禽細菌病 家禽リケッチャ類による疾病 家禽マイコ
プラズマ病 家禽真菌症 家禽原虫病 みつばち 実験動物ウイルス病 実験動物細菌病 実験動物リケッチャ
類による疾病 実験動物マイコプラズマ病 実験動物原虫病 魚類ウイルス病 魚類細菌病 魚類真菌症 魚類
原虫病)

発 行 所 (株) 近 代 出 版

[〒150 東京都渋谷区渋谷 1-10-1 八千代ビル

電 話 03-499-5191 振 替 東 京 9-168223]