広島湾産マガキ *Ostrea gigas* の異常斃死 に関する細菌学的研究—Ⅱ—

竹内卓三・松原孝之・広川泰子・築山 明

(広島県水産試験場)

(広島大学医学部細菌学教室)

Bacteriological Studies on the Unusually High Mortality of *Ostrea gigas* in Hiroshima Bay—Ⅱ—

Takumi TAKEUCHI, Takayuki MATSUBARA, Hiroko HIROKAWA
and Akira TSUKIYAMA

The authors have bacteriologically studied on the causes of high mortality of oyster, isolating some bacteria from it in Hiroshima Bay.

The results were as follows.

1. Bacterial population cultured from normal oyster from April to June 1954, was higher at room temperature than at 37°C., and higher on blood agar than on agar-agar.
2. Bacterial population cultured from abnormally dead oyster was almost same degree with that previously reported.
3. The three strains isolated from dead oyster belonged to genus *Achromobacter*, were pathogenic against normal oyster and induced same pathological and bacteriological changes as shown in abnormally dead oyster.
4. The virulence of these strains became lower with subcultures on artificial medium.

緒 言

カキの細菌学的研究並びに異常斃死については種々の報告¹⁻⁵⁾があり、我々⁶⁾も先に広島湾沿岸に於ける2年生カキの異常斃死に関して細菌学的に検討し報告したが、今回は更に、先の報告で欠除していた4～6月の間に於ける健康カキよりの細菌集落数についての追究、昭和29年度に於ける異常斃死カキより分離された細菌の数及びそれらのうちカキに対して実験的に異常斃死を惹起せしめ得たものについての観察並びに28年度に分離せられたカキ異常斃死原因菌に関するより詳細な検討を試みたので以下報告する。

I. 健康カキについての細菌学的研究

1. 実験方法——第1報⁶⁾の場合と同様に昭和29年4～6月の間に於ける広島湾草津地先の海中より毎週1回2～5個ずつのカキを採集し、その貝液、口辺部、生殖巣、消化盲囊及び胃液の各々よりその1白金耳量ずつを普通寒天平板培地、血液寒天平板培地及び遠藤培地に塗抹し、37°C 48時間並びに室温3～7日間培養後、各培地に於ける発生集落数を比較検討した。

2. 実験成績——Table 1に示す如く、普通寒天培地上では生殖巣以外の部位ではいずれの場合も室温培養の方が37°C培養に比して発生集落数が多かった。而して室温培養では普通寒天、血液寒天両培地上的集落発生の最も多いのは口辺部よりであり、最も少いのは生殖巣よりであつたのに反し、37°C培養では普通寒天培地に於いては生殖巣より、血液寒天培地では消化盲囊よりが最も多く、最も少いのは普通寒天培地では消化盲囊より、血液寒天培地では生殖巣よりであつた。而して一般に血液寒天培地上に於てより多かつた。

次に遠藤培地上に於ける非赤変及び赤変集落はいずれの部位からも発生したが、37°C培養の場合には非赤変集落の最も多発したのは生殖巣よりであり、赤変集落の最も多発したのは貝液よりであり、集落発生の

最も少なかったのは非赤変，赤変の如何を問わず消化盲嚢よりであつた。これに対して室温培養の場合には最も多発したのは非赤変，赤変集落ともに口辺部よりであり，最も少なかったのは非赤変集落では生殖巣並びに消化盲嚢よりであり，赤変集落では生殖巣よりであつた。

Table 1. The average number of bacteria from various part in healthy oyster from April to June.

Part	Plate Temp.	Agar-agar plate		Blood-agar plate		Endo's plate			
		37° C.	Room Temp.	37° C.	Room Temp.	Non red		Red	
						37° C.	Room Temp.	37° C.	Room Temp.
Fluid in the shell		30	79	31	167	5	9	7	6
Round of labial palp		30	114	42	219	4	12	6	20
Gonad		50	41	18	47	6	2	4	3
Digestive diverticula		18	83	64	111	2	2	1	4
Stomach fluid		39	50	37	109	3	6	2	4

Note: The average number of bacteria is shown by counting fraction of 0.5 and over as a whole number and disregarding the rest. (Table 2 and 5)

I. 異常斃死カキについての細菌学的研究

1. 実験方法——昭和 27 年 7~9 月の期間に異常斃死カキ 21 個を採集し，上記の健康カキよりの場合と同様にして分離培養をおこない，その結果発生する集落の数，性状及びそれらよりの細菌の形態並びに染色性等について観察した。而して異常斃死カキ体内に屢々多数みとめられる Gram 陰性，中等大の桿菌に酷似の形態並びに染色性を示す集落を探索し，それより純粋培養株を得て，その生塩水による 1mg/cc 均等菌液の 0.2cc (0.2mg) ずつを健康カキのほぼ消化盲嚢の部分に接種した後，そのカキをカキ養殖場附近の筏に吊して飼育しつつ斃死するのを待ち，斃死後は直に法に従つてその病理組織学的並びに細菌学的検索を行った結果，自然異常斃死のカキの場合と類似の組織像並びに体内細菌増殖像を呈して健康カキを早期に斃死せしめうる細菌 3 株を得た。そしてこれら菌株を仮に“C”，“D”，“E”株と命名し，更にそれらの生物学的性状を詳しく検索して同定を試み，且つカキに対する病原性についても追究し，又第 1 報⁵⁾に於て得られた仮称“A”，“B”両菌株についてもそのカキに対する病原性を自然の養殖場に於て再検討した。

2. 実験成績——i) 異常斃死カキ体内よりの発生集落数については，Table 2 に示したように第 1 報⁵⁾の場合とはほぼ同様の成績を示した。

なお，培地，培養温度の如何を問わず，口辺部より最も多く発生し，生殖巣よりが最も少かつた。又遠藤培地に於ては培養温度に関係なく，非赤変及び赤変集落ともに口辺部より最も多く発生した。そして最も少かつたのは，培養温度に拘わらず非赤変集落では消化盲嚢よりであり，赤変集落は生殖巣よりであつた。

Table 2. The average number of bacteria from various part in abnormally dead oyster from July to September.

Part	Plate Temp.	Agar-agar plate		Blood-agar plate		Endo's plate			
		37° C.	Room Temp.	37° C.	Room Temp.	Non-red		Red	
						37° C.	Room Temp.	37° C.	Room Temp.
Round of labial palp		312	387	391	408	164	208	151	183
Gonad		100	174	170	212	57	128	81	65
Digestive diverticula		128	182	218	247	46	105	96	92
Stomach fluid		178	259	194	309	68	121	109	118

ii) 仮称“C”，“D”及び“E”菌株について

(イ) “C”菌株：本菌は自然斃死カキの口辺部より室温下に於て血液寒天培地上に発生したものであり，長さ 1.1 μ 前後の有鞭毛，Gram 陰性の短小桿菌であるが，液体培地では太く且菌長も 1.8 μ 程度を示すようになる。普通寒天培地に発育良好，37°C 24 時間，室温 48 時間で直径 1mm 前後の小円形，無色透明の集落を形成。血液寒天培地に発育良好，普通寒天培地上の集落とよく似た中等大円形，灰白色，扁平の

集落を形成。溶血環陰性。グラチン培地では無色、半透明の小円形集落形成。はじめ漏斗状そして時間の経過と共に層状液化。馬鈴薯培地に灰白色、湿潤性円形集落形成。ブイヨンに濁濁発育し液面に薄い菌膜、管底に沈渣形成。インドール反応は陰性、ラクムス牛乳に酸、アルカリの形成、凝固共に陰性。カタラーゼ及び硫化水素産生ともに陰性。硝酸塩還元陽性。含水炭素分解性は Table 3 に示したようであつた。

(ロ) “D” 菌株： 本菌は自然斃死カキの消化盲嚢部より室温下に於て血液寒天培地に発生したものであり、長さ 1.6μ 前後の有鞭毛、Gram 陰性の中等大の桿菌であるが、液体培地では 5.0μ 前後の著しく長い桿菌となる。普通寒天培地では“C”菌株と殆んど同様。血液寒天培地に発育良好、無色、小円形、金属光沢を有する半球状の集落を形成。溶血環陰性。グラチン培地では灰白色、中等大円形集落形成。緩徐に漏斗状乃至皿状液化。馬鈴薯培地に“C”菌株と殆んど同様の発育。ブイヨンに濁濁発育し、菌膜の形成は認められないが、管底に沈渣を形成。インドール反応は陰性。ラクムス牛乳に酸、アルカリの形成、凝固ともに陰性。カタラーゼ陽性。硫化水素産生、硝酸塩還元ともに陰性。含水炭素分解性は Table 3 に示したようであつた。

(ハ) “E” 菌株： 本菌は自然斃死カキの生殖巣部より室温下に於て血液寒天培地上に発生したものであり、長さ 1.5μ 前後の有鞭毛、Gram 陰性の中等大の桿菌であるが、液体培地ではその菌長は 3.0μ 前後を示すようになる。普通寒天培地に発育良好、 37°C 24 時間、室温 48 時間で直径 1mm 前後の淡灰白色、円形の集落を形成。血液寒天培地に灰白色、中等大円形の扁平集落を形成。グラチン培地では無色透明の小円形集落形成。緩徐に囊状の液化を呈す。馬鈴薯培地に発育不良。ブイヨンに濁濁発育を呈し、液面に薄い菌膜を形成。インドール反応は陰性。ラクムス牛乳に酸、アルカリの形成、凝固ともに陰性。カタラーゼ、硫化水素産生ともに陰性。硝酸塩還元陽性。含水炭素分解性は Table 3 に示した如くであつた。

以上の成績を Bergey's Manual of Determinative Bacteriology⁶⁾ に照合することにより“C”、“D”及び“E”菌株ともに Achromobacter 属に所属せしむべき菌株と同定される。

Table 3. Carbohydrate decomposing action by bacteria.

Saccharoid Strain	Lactose	Glucose	Maltose	Saccharose	Mannite	Adonite	Galactose	Fructose
C	—	+	+	—	+	—	+	+
D	—	—	—	—	—	—	—	—
E	—	+	+	—	+	—	⊕	+

Saccharoid Strain	Dextrine	Salicin	Dulcitol	Arabinose	Xylose	Sorbitol	Rhamnose	Control
C	+	—	—	⊕	—	—	—	—
D	—	—	—	—	—	—	—	—
E	+	+	—	—	—	—	—	—

Note: ○—Gas production.

iii) “C”、“D”及び“E”菌株のカキに対する病原性について

前述のようにして得た菌液を5個ずつの健康カキの生殖巣下部に接種した後、直ちに異常斃死の最も多く認められる7月中旬より10月上旬迄の期間内にカキ養殖場の筏に吊して10日間毎日観察し、その間斃死したものは出来るだけ早く取上げて前述の健康カキ並びに異常斃死カキの場合と同様にして分離培養すると共に、病理組織学的検討をもおこなつた。対照としては生理的食塩水 0.2cc ずつを同部位に注射したカキをあてた。その結果は次のようであつた。

即ち、Table 4 に示すように、分離直後の菌株を接種した場合には3菌株ともに被接種カキ5個のうち4個までを10日以内に斃死せしめることが出来たが、各菌株とも毎週1回の累代培養により漸次その菌力は低下の傾向を示した。但し第4回目の“C”菌(累代9代)接種によつて斃死したカキよりの分離直後の同種菌ではその菌力が又多少とも増強され、5個中2個を斃死せしめ得たことは興味がある。(Table 4 *)

なお、分離後12週(累代12代)の“C”、“D”両菌株は同累代の“E”菌株とともにもはや単独では

全くカキの斃死を招来できなくなつていたにも拘らず、これら両菌株の各々 0.1mg ずつを混合して接種すると5個のうち1個を斃死せしめることが出来た (Table 4 の ** 印) ことも亦多少とも注目に値する所見といえないものでもあるまい。

次にこれら3菌株を各別に滅菌海水中に 0.04mg/cc の濃度に浮遊せしめて、その中に健康カキを12時間放置後、上述の場合と同様にしてカキ養殖場の筏に吊して観察したが、この場合には10日後に於てもなお全く供試カキに斃死はみられなかった。

Table 4. Pathogenesis of bacteria separated from the dead oyster.

Implantation Strain	The 1st (direct after separation)	The 2nd (after 5 weeks)	The 3rd (after 7 weeks)	The 4th (after 9 weeks)	Direct after separation from the 4th	The 5th (after 12 weeks)	Mixed with the same 5th
C	4	3	1	1	2*	0	} 1**
D	4	2	1	0	—	0	
E	4	0	0	0	—	0	
Control (Saline solution)	0	0	0	0	0	0	0

Note: 1) Each experiment employed five oysters.

2) The number in the table shows the number of dead oyster.

iv) 実験斃死カキの病理組織学的所見

上述の“C”、“D”及び“E”各菌株接種カキは斃死後直ちに对照の生理食塩水注射群では注射10日後に採集して、それぞれブアン液に固定し、凍結切片としてGram染色を行い、更にパラフィン切片としてヘマトキシリン・エオジン染色を行つて細菌学的検索並びに病理組織学的検索を行い次のような所見を得た。

即ち、広島湾産カキの自然異常斃死カキにみられる組織像は第1報⁵⁾に於ても述べたように結合織内、特に消化管周囲に認められる結節性の変化が主な病変で、その他に実質臓器例えば、消化盲嚢、卵巣等の壊死性変化をも伴っているものであるが、今回の実験斃死カキの組織像では“C”、“D”及び“E”各菌株接種群いずれの場合にも組織は大部分崩壊して、その構造も明瞭でない場合が多かつたが、結合織内に多数の游走細胞が認められ、滲出性の変化を示し、又結合織内に壊死巣を有する顕著な結節性の変化が、又実質組織内には崩壊がそれぞれ認められた。之に反して对照として生理食塩水を注射したカキに於ては、実質臓器の崩壊もなく、游走細胞の増殖や結節性変化も認められなかった。

次に細菌学的所見についてみるに、このさいには自然異常斃死カキの場合に認められるのにはほぼ相似の形態並びに排列乃至増殖像が実験斃死カキの組織内の菌株接種部位は勿論、その他の部位にも多数認められた。但し、生理食塩水注射の对照の組織内には細菌類は証明されなかった。

v) 実験斃死カキよりの発生集落数

実験斃死カキよりの発生集落数を前述の健康カキ並びに異常斃死カキの場合と同様にして検討したところ

Table 5. The average number of bacteria separated from the experimental dead oyster.

Plate		Agar-agar plate		Blood-agar plate		Endo's plate			
Part	Temp.	37° C.	Room Temp.	37° C.	Room Temp.	Non-red		Red	
						37° C.	Room Temp.	37° C.	Room Temp.
Gonad		85	241	232	395	9	132	88	38
Digestive diverticula		88	152	176	315	23	100	5	44
Stomach fluid		123	201	184	321	25	96	103	58

Note: Same with the Table 1.

Table 5 に示すような成績が得られた。

即ち、実験斃死カキにあつても自然異常斃死カキの場合と較べて大体類似の様相を呈した。

vi) 昭和28年度分離の仮称“A”、“B”菌株⁵⁾の病原性について

本昭和29年度に分離した菌株と同様にして健康カキに接種し、その病原性について検討したが、両菌株

ともに実験的にカキを斃死せしめることは出来なかつた。これは或はすでに長期間に亘り培地上に累代培養されたためであるかも知れない。

総 括 と 考 按

以上の成績より、先ず今回の健康カキ体内よりの分離細菌数についてみるに、これは先に第1報¹⁾で述べたところとはほぼ平行しているように考えられる。

又今回検索した自然異常斃死カキよりの集落数も昭和 28 年度の場合(第1報)とほぼ同様であつたが、強いていえば前回に較べて今回が多いように見受けられた。これは昨年度の異常斃死カキの組織像内に細菌の認められることは非常に少かつたのに反して、本年度の場合には相当多数の細菌が認められたことと関係があるものと考えられる。

次に異常斃死カキよりカキに対してある程度病原性を示す菌株が今年度も3株ほど分離できたが、これらはすべて昨年度分離の2菌株と同様に *Achromobacter* 属と同定された。なお、これら3菌株によつて実験的に斃死せしめたカキの病理組織像は自然異常斃死カキのそれと完全には一致しないまでもかなり類似しており、且つ組織切片内に見出される細菌の形態並びに排列乃至増殖像は両者間に更に著明な相似性が認められた。又それらの実験斃死カキの各部位よりの発生集落数も異常斃死カキよりの場合と一脉通ずるものがあるようであつた。但し、これら3菌株のカキに対する病原性は培地上における累代と共にむしろ急速に低下する傾向を示したが、これは素々低温菌であるこれら3菌株が共に 37°C 下で反復累代されたことに因るのではないと思われる。尤もこのように低下した病原性もカキ体内通過によつて多少とも回復の徴がみられないでもなかつたことは注目し得るところであらう。

なお、これら3菌株を各別に海水中に浮遊せしめて、その中に自然に近い状態でカキを漬して接触させた場合にはカキは斃死することがなかつたが、これはその際の供試菌がすでにかなりの世代にわたり累代培養されたものであつたこと及び実験時期もカキの自然異常斃死の多発する時期のすぎた9月下旬から10月上旬にかけてであつたことなどに大きな原因があるのではないと思われる。

又昭和 28 年度の分離菌株(第1報)を用いてカキを実験的に斃死せしめることができなくなつていたがこれは分離当初にはかなり強かつた病原性が長期にわたる累代培養により著しく低下するものであることを如実に物語るものといえよう。

結 論

(1) 広島湾産健康マガキの貝液、口辺部、生殖巣、消化盲嚢及び胃液より4~6月の間に於て証明せられる細菌数は体温より室温に於て、又普通寒天培地より血液寒天培地に於ていずれもより多かつた。

(2) 自然異常斃死カキの口辺部、消化盲嚢及び生殖巣より各別に分離され、ともに *Achromobacter* 属菌と同定された3菌株は、自然異常斃死カキに見られるものとかなり似た病理組織像及び酷似の体内細菌像のもとに健康カキを早期に斃死せしめた。

(3) これら3菌株のカキに対する病原性は累代培養によつて比較的速かに低下するようであつた。

稿を終るに臨み、終始御指導、御鞭撻並びに御校閲を賜つた広島大学医学部占部教授に深甚の謝意を表し、種々御便宜を頂いた当水産試験場山根美代子氏はじめ場員各位に深謝する。

文 献

- 1) ORTON : "Oyster Biology & Oyster Culture", 155 (1937).
- 2) 谷 川 : 水産細菌学, 532 (1948).
- 3) 新 川 : 広島女子短大「研究紀要」, 第3集, 53 (1953).
- 4) 藤田・他 : 本誌, 19, 766 (1953).
- 5) 竹内・他 : 本誌, 20, 1066 (1955).
- 6) BERGEY *et al* : "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 500 (1939).