広島湾産マガキ *Ostrea gigas* の異常斃死

に関する細菌学的研究—Ⅲ.

竹内卓三・松原孝之・広川泰子・松尾吉恭

(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—Ⅲ.Takumi TAKEUCHI, Takayuki MATSUBARA, Hiroko HIROKAWA
and Yoshiyasu MATSUO

1) It was already reported that the virulence of micro-organism isolated from the unusually dead oysters became weak by the protracted subculturing in vitro. Now, it seems that these strains recover the virulence to a certain degree by passage through the living oysters.

2) The authors confirm that the oysters are infected with the above mentioned micro-organisms by way of the mouth and the digestive tract.

3) In the sea area where the oysters fall dead one after another, there are some oysters infected with the above mentioned micro-organisms among the survivals. The histo-pathological abnormality in these sufferers correlates with the degree of the bacterial infiltration and multiplication, and changes in reference to the change of the mortality.

緒 言

既報¹⁾のように、われわれは広島湾における異常斃死カキより分離され、*Achromobacter* 属菌と同定された菌株のうちに、異常斃死カキに見られるのと殆んど同様の病理組織像のもとに健康カキを早期に斃死せしめ得る病原性のあるものを認め、少くとも広島湾におけるカキ異常斃死の誘因の多くは、かかる細菌の感染に帰せられるであろうと考えたのであるが、その自然感染の過程については分明でない点が少くなかった。今回は以上の事項につき少しく追究の歩を進めた結果、なお充分とはいえないが、若干の知見が得られたように思われるので以下報告する。

実 験 I

昭和 28 年度及び 29 年度に異常斃死カキより分離された菌株も、これを普通寒天培地上に累代培養すると漸次その病原性が減弱し、ついにはカキをたおし得ないようになる事実は、前報²⁾において述べたところであるが、それらの毒力復帰能の有無を検討する目的で、動物通過法に倣い 28 年度分離の A 菌を供試してのカキ体内通過実験を試みた。実験は昭和 30 年 6 月より 7 月にかけて行われた。

術式：普通寒天培地上 24 時間培養の A 菌よりの約 1 mg/cc 生理的食塩水浮游菌液の 0.2 cc を、3 個の健康カキの生殖巣下部に接種し、20~25°C の滅菌海水水槽中に 7 日前後飼育したのちそれぞれ開殻し、個体の 1 半については病理組織学的検索を行い、またその他半はホモジナイザーで磨砕後供試菌の分離培養を行って、発生集落について培養並びに染色性状が A 菌に一致するものを選び、それより更に同様にして次代通過を行うことを繰返した。

成績：カキ通過第 1 代及び第 2 代では病理組織標本上特にいべき変化は認められず、既報の如く明らかに累代培養による A 菌の毒力の低下を思わせたが、第 3 代になると 3 個中 2 個に細胞浸潤並びに軽度の壊死巣が認められ、かつそれらの 1 個体においては微弱ながら斃死カキに見られたのと軌を一にする結節形成

像も観察され、更に第4代になると3個中3個、すべてのカキに上記の所見が認められるに至つた。このようにして第7代迄通過を試みたところ、分離当初の如く供試カキのすべてを数日以内でたおすほどに強毒の状態に迄は復元し得られなかつたが、上述の如く第3代以後にはかなりの程度にはA菌の毒力を復歸せしめることができた。

実 験 II

前記実験の結果、その毒力のやや復歸したカキ通過7代目のA菌を供試して、その菌液内にカキを浸漬することによる感染実験を続行した。

実験期間：昭和30年8月

術式：該A生菌の0.05 mg/cc 滅菌海水浮游液にカキを浸漬したもの——生菌液群(41個)、同上死菌液に浸漬したもの——死菌液群(16個)、滅菌海水中に浸漬したもの——対照群(12個)。これら3群ともその浸漬時間は24時間とし、いずれも浸漬後養殖場の筏に吊して表1に示す各日数経過後に、それぞれ任意にそれらの数個ずつを取りあげ、直ちに病理標本として菌の体内における態度並びにそれに伴う生体反応について追究した。

成績：表1にまとめた通りである。

Table 1. Detection-ratio of A-Strain in Oysters by Immersion-Experiment.

Suspensions used for Immersion	Days after Immersion							
	0	3	6	9	11	14	17	24
Living Bacilli	6/7	5/6	3/6	4/6	2/3	5/6	5/6	1/1
Killed Bacilli	4/6	0/3*	0/3	0/3	—	0/1*	—	—
Controls (Sea-Water)	—	—	0/6*	—	0/3	0/1	0/2	—

- Notes. 1) * Shows that different sorts of bacilli were detected in each one of oysters.
 2) The denominator indicates the number of oyster subjected to examination, and the numerator does one in which A-strain was detected.
 3) 0 of days means the time just after immersion for 24 hours.

すなわち、菌液内24時間浸漬直後のものについてみると、生菌液群では7個中6個に、また死菌液群でも6個中4個に、その消化管内に多数の細菌が摂取されており、細菌の生死にかかわらずカキはこれを周囲の水分その他と共にとり入れ得ることが判つたが、このさい死菌液群においては、細菌は消化管内にのみとどまつて、それ以上体組織内への侵入は見られなかつたのに対して、生菌液群では消化管内にのみならず、いまだその数は少かつたけれども、消化管壁、さらにはその周囲の結合組織内へも侵入しているのが観察された。

ついで筏垂下3日以後になると、死菌液群ではもはや消化管内にも細菌は認められないようになり、すべて消化されるか、そのまま体外に排泄されるかのいずれかの経過を辿つたもののようであつたが、これに対して生菌液群では、多少の動揺はあつたけれども24日後迄の観察期間中死菌液群と同様に消化管内では、細菌が検知できなくなつたが、管壁または結合組織内には依然として菌が確認されたばかりでなく、時としては軽度ながらも異常斃死カキに見られたような瀰蔓性細胞浸潤や小結節形成像なども看取された。尤も実験Iのカキ体内A菌通過実験によつても明らかな如く、供試したA菌はその毒力の復歸がいまだ充分とはいえないものであつた為か24日後迄吊下の1個のカキはなお斃死することがなく、かつその体内臓器における病理組織像及びA菌増殖度も極めて軽微にすぎなかつた。なお、対照群では終始カキ体内にA菌乃至これに類似の細菌を認めることはなかつた。

なお、死菌液群の2個体及び対照群の1個体においては、組織の融解並びに多数の細菌が認められたが、それらの細菌は供試したA菌及び異常斃死カキに通常見られる細菌とは染色性並びに形態学的性状の異なる、長大桿菌であつて、これは実験前すでにこれらのカキに何らかの病変があつた為に、単に腐生したものではないかと思われた。

実 験 Ⅲ

広島湾における2年生カキの異常斃死は、毎年おおむね7月頃より始まり、10月頃には終熄することが知られている。従つて、われわれの如上の見解に基づいて、カキにおける自然感染の経過の様相を窺うには、この期間を措いて他にないと考えたので、上述の実験と並行して7月下旬より10月下旬に至る期間、異常斃死が発生した海域の垂下筏の任意の部位から、外見上健康と思われる生存カキを任意に採取し、その中から病理組織学的に発病しているカキを選び出し、その体内における細菌の形態を追究し、之と病機との関連性の有無、乃至程度について検討を試みることにした。

このようにして採集したカキ185個中41個に病理組織学的病変が認められたが、そのうち3例を除いてはすべて病変部に細菌を確認し得たのみならず、病変が認められなかつた144例のうち3個にも、少数ながら細菌を検出し得た。これらの発病カキは、その病理学的所見よりして大体5型に分類されるようであるが、この点については本研究の病理学的部門³⁾に譲り、本報では以下上記の採取カキにおける細菌学的所見についてのみ触れる。

如上のカキ体内における細菌学的所見から、感染の過程を4期に大別できるようであつた。すなわち

第1期(7月下旬～8月上旬)：この期間に採集された生存カキ42個中11個(26%)に異常斃死カキに見られるものと同様の形態学的所見をもつ細菌が検出された。そのうちNo. 1, 3, 10, 16, 20及び23の6個では、消化管周囲の結合織中に軽度の細胞浸潤があり、その中心部に数個乃至10数個の細菌が認められたに過ぎなかつたが、No. 22ではやや病機は進行して滲出型並びに結節型病変が結合織内に広く見られ、これらの結節の辺縁部にも中心部にも、正常形の菌を認めた。No. 28及び35では卵巣部も冒され、結節中心部では菌体不鮮明となり、崩壊を来しつつある像が見受けられるに至り、さらにNo. 12及び19では多数の結節の壊死に伴い、菌の崩壊像もより強く観察された。

第2期(8月中旬～下旬)：No. 43からNo. 73までの生存カキ31個中7個(22%)に細菌が検出された。No. 49は第1期のNo. 22と類似のやや病機の進行したにすぎぬものであつたが、その他のものでは病機はさらにより進行していて、広汎な病巣中により強い変化を蒙つた細菌が多数認められた。すなわち、No. 44では結節中心部の菌は顆粒状となり、かつ被染性も低下し、No. 51及び56では大壊死巣の中に中心部崩壊像を示す菌集団が散在するのみならず、組織内への広汎な菌の侵入が見られ、No. 52, 71及び72ではさらに組織の壊死、菌の崩壊像が強く、病機の極期を思わせるものであつた。

第3期(9月上旬)：採集した生存カキ54個中13個(24%)に細菌が確認された。No. 105及び106では第1期のNo. 28に類似した細菌の形態が見られたが、これらの菌を含む結節は第1期のものとは異つて極めて明瞭に健康部と区別されており、No. 114及び127では、このような結節内にわずかの顆粒状菌影を認めるにすぎなかつた。またNo. 75, 76, 83, 91及び99の5個では、菌集団周囲の細胞浸潤は第2期のものほど著しくなく、かつ一般に菌形の乱れをみせておらず、No. 85, 109及び125では第1期のNo. 1その他と同様に、輪廓鮮明な菌が少数散在性に認められたのみで、この期間に第2期類似の所見が得られたのはNo. 94の1個であつた。

第4期(9月下旬～10月下旬)：59個中病理組織学的に異常を認めたカキは10個(17%)であつた。これらのうち、第2期から第3期への過程にあると推定される結節並びに菌集団の状態が窺われたのは、No. 146とNo. 184の2個のみで、他の8個では少数の壊死状菌影の認められたものもあつたが、殆んど吸収されて組織の修復のみが残されていると考えられるものであつた。

考 察

カキ異常斃死発生の誘因についてはOrton⁴⁾をはじめ種々の論議があり、いまだ全く意見の一致をみていないが、広島湾において数年前から主として2年生カキに多く見られるようになった異常斃死に関しては、われわれ⁵⁾はその病理学的検索の結果、病巣内に桿菌様小体を認めたので、続いてこれが細菌学的検討を試み、*Achromobacter* 属の菌と同定されたGram陰性桿菌の感染が直接の誘因であろうと推断するに至つたが^{1,2)}、さらにこの菌の自然感染成立の過程、その後の経過などの点について究明しようと考えて、カキの該菌液内浸漬による実験的自然感染成立を目指して研究を続けたのであつた³⁾。ところが、その実験はカキ異

常斃死の最盛期を過ぎた頃、しかも累代培養により明らかに毒力の低下した該菌を用いてのものであつた為か、いふべき何らの知見をも得ることができなかつた。

そこで今回カキ通過によつて、ややその毒力の復帰した該菌を供試し、しかも実験期間もカキ斃死の最盛期及びその前後をえらんで、再びカキの菌液内浸漬実験を試みるに至つたのである。

そしてその結果、今回はカキへの該菌の自然感染の様相が多少とも把握できたように思われる所見に接し得た。すなわち、死菌液内浸漬のさいには消化管内にのみ菌体がみられたのに対して、生菌液群では消化管内のみならず、管壁更には周囲の結合織中にも菌の存在を確認しえたことよりして、病原体は先ず経口的に消化管内に摂取され、続いておそらくは管壁のわずかの間隙または抵抗減弱部を通つて消化管周囲に侵入し、そこで増殖しつつ、さらに周囲に拡がって行くもののように認められた。この所見は、異常斃死カキの病変部位が消化管周囲に最も多いというこれ迄の知見と相通ずるものと考えられる。尤も、本実験においても前回同様、菌液内浸漬によつてカキを斃死せしめる迄には至らなかつたが、これはやはり供試菌の毒力がいまだ分離当初のそれほど迄に充分復帰してゐなかつたということに因るものと考えられる。

次に、以上のわれわれの得た知見よりすれば、カキの異常斃死が発生した海域においては、当然細菌による海水の汚染が想像されるところから、そのような海域における垂下筏の任意の部位より生存カキを採集して、細菌学的並びに病理学的検討を試みた。その結果、これらの生存カキ 185 個中 41 個 (22 %) に種々の程度の病変が確認されたが、さらにそのさいの細菌学的所見よりして、一応前述のように、細菌と病機との関係を 4 時期に区分して考えても差支えないように思われた。すなわち、産卵期の体力の消耗したカキは、ようやく水温も上昇し、海中微生物の増殖が盛んになるに伴い、その感染を受け易くなつてくるもののようで、そのためにわれわれのいわゆる第 1 期においては、細菌学的並びに病理学的に初期病変と思われる所見を、殊に消化管周囲に限局して示すようになり、これから更に進んで引続き組織内への広汎な細菌の侵入増殖と組織の壊死とをもたらすようになり、遂には病機の極期、ひいては死への転帰を招来するようになるのではないかと考えられる。そして第 2 期は正にこのような時期であつて、このことはこの時期にカキの異常斃死の発生頻度が最も高いという事実と極めてよく符合するところである。この時期迄に斃死を免れたカキは、次で季節的に第 3 期に相当する時期を迎えることになる。

この頃になると、個体の抵抗力の恢復と相俟つてようやく病機の進行は停止し、細菌の貪喰吸収、組織の修復が行われようとする状態を示すようになるが、他方においてはこの時期に仮令新たに細菌の侵入があつても、その病変は限局性にとどまるもののようであつて、従つてこのさいには先の第 1 期から第 2 期へと引続き起る侵入細菌の広汎な侵襲の状況はみられない。かかる状況は第 4 期に入つてはさらに明瞭となり、さらには治癒化の像が認められるようになる。そしてこのような時期にはすでに異常斃死は見られなくなるのである。

以上の成績からして、一応カキの異常斃死起因菌の感染が消化管を経て行われるであろうことは先ず首肯できるものと考えられるが、その他になお別の感染経路があるのかどうかについては、今回の研究によつてもいまだ審かではなく、また異常斃死が垂下筏の上層部により多く発生するという経験的事実は、如何に説明されたらよいか、という点についても、今回の研究の限りでは全く触れることは許されない。今後より詳細な、より系統的なこの方面に関する研究が要求される所以である。

総 括

1. 累代培養によりカキに対する病原性の著しく低下した斃死カキ分離菌株も、カキ体内通過によつて或る程度迄その病原性を復帰するもののようである。
2. カキ異常斃死原因菌の感染経路は、主として経口的経消化管的と考えられる。
3. 異常斃死カキ発生海域においては、その斃死頻度の時期的推移と並行して、外見上健康なカキの内にも病理学的検索の結果、罹患カキの存在が検知され、それらのカキでは病変の程度におおむね平行して組織内への細菌の侵入増殖像がみとめられる。

〔稿を終るに当り終始御指導を賜つた広島大学医学部細菌学教室占部薫教授に厚く御礼を申し上げる〕

文 献

- 1) 竹内・他 : 本誌, **20**, 1066 (1955).
- 2) 竹内・他 : 本誌, **21**, 1199 (1956).
- 3) 竹内・他 : 未発表.
- 4) J.H. Orton : Oyster biology and Oyster Culture, 155 (1937).
- 5) 藤田・他 : 本誌, **19**, 766 (1953).