

サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究—V

湖河魚の腸内細菌叢*1

吉本 守・木村喬久・坂井 稔

(1976年5月27日受理)

Studies on the Intestinal Microflora of Salmonids—V

The Intestinal Microflora of the Anadromous Salmon

Mamoru YOSHIMIZU*2, Takahisa KIMURA*2, and Minoru SAKAI*2

Ten adult pink salmon (*Oncorhynchus gorbusha*) caught at the mouth of a river for collecting their eggs and reared about 3 months in fresh water without feeding, 20 anadromous chum salmon (*Oncorhynchus keta*) caught for the same purpose, and 10 cultured masu salmon (*Oncorhynchus masou*) which had reached their maturity were used as test samples. The pink and chum salmon were provided by the Oshima Branch of the Hokkaido Salmon Hatchery and the masu salmon, by the Mori Branch of the Hokkaido Fish Hatchery. Viable counts were determined in the intestinal slime of these salmon. About 370 strains were isolated from the above samples. The composition of the microflora was determined according to the scheme of SHEWAN *et al.* (1960).

The results are summarized as follows:

- 1) The number of microorganisms in the intestinal slime of the anadromous pink and chum salmon ranged from 10^2 to 10^8 per gram. In the mature masu salmon, it was less, ranging from nil to 10^5 per gram.
- 2) The predominant genera in the intestinal slime of the anadromous pink and chum salmon were the *Vibrio*, *Pseudomonas*, and *Aeromonas*. All of the *Vibrio* were of the marine or halophilic type, the *Pseudomonas* were of the halophilic and terrestrial type, and most of the *Aeromonas* were of the terrestrial type.
- 3) The *Aeromonas* were predominant in the intestinal microflora of the mature masu salmon cultured in fresh water.

前報までにサケ科魚類の腸内細菌叢は、淡水で飼育中あるいは自然環境の河川および湖沼に棲息する時期においては *Aeromonas* および *Enterobacteriaceae*, また海水で飼育中あるいは海洋環境に棲息する時期においては *Vibrio* がその主体を成すことを報告した。^{1,3,4)}

さらに人為的に飼育魚を淡水から海水へ漸次移行させることにより、淡水飼育時に腸内細菌叢の主体を成した陸型の *Aeromonas* は、飼育水中の海水割合の上昇につれ陸型から好塩型の *Pseudomonas* に、つづいて好塩型の *Vibrio* によつて置きかわり、遂には好塩型の *Vibrio* が菌叢の主体を成すに至ることを実験的に証明し報告した。²⁾

本研究の対象魚サケ科魚類は習性上産卵期に海洋から母河へ溯上することから、この時期の生活環境水は上記の淡水から海水への移行とは逆に、海水から淡水へ変化する。したがつてこのような生活期において腸

*1 本研究の概要は昭和49年度日本水産学会春期大会(東京)において発表した。

*2 北海道大学水産学部微生物学講座 (Lab. Microbiol., Fac. Fish., Hokkaido Univ., Hakodate, Hokkaido, Japan)

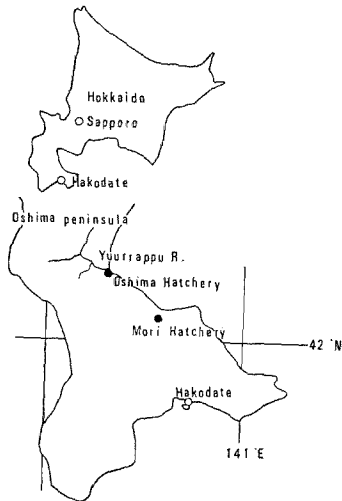


Fig. 1. Location of the Yuurrappu River, Oshima Hatchery (Branch of Hokkaido Salmon Hatchery), and Mori Hatchery (Branch of Hokkaido Fish Hatchery).

採卵のため約3カ月間餌止めして蓄養中の溯上カラフトマス, 1972年11月および1973年11月, 渡島支場で採卵魚採取の目的でユウラップ川において捕獲した溯上中のサケならびに1972年10月, 道立水産孵化場森支場の淡水池で採卵のため約1カ月間餌止めして餌育中の成熟期のサクラマスのそれぞれ雌雄各5尾, 計40尾の腸管を渡島支場あるいは森支場の採卵室で無菌的に摘出し, 以後の実験に供した。供試魚の体重, 体長, 性別等は Table 1, Table 2 および Table 3 に示す通りである。

腸管摘出法 供試魚の体表面を70% アルコールで消毒後無菌的に開腹し, 雌の場合は卵巣を摘出後, 腹水を滅菌ガーゼで充分ふき取り, 腸管表面をアルコール綿で消毒し, 幽門垂末端部と肛門より約3cm上方の腸管部位をそれぞれ滅菌綿糸で結紮し, 腸管を切断して結紮部を摘出して滅菌シャーレ中にとり, 氷藏

内細菌叢が上記の結果とは逆の方向に推移するか否かは興味ある問題と考えられる。

本報では溯上中捕獲され淡水池で短期間蓄養されている 溯上カラフトマス (*Oncorhynchus gorbuscha*) および産卵のため溯上中のサケ (*Oncorhynchus keta*) ならびに対照として終始淡水池で飼育された成熟期のサクラマス (*Oncorhynchus masou*) を対象に, それらの腸内容物中の生菌数とその菌叢を検索し, 前報までの結果を併わせ, いわゆる広塩魚のサケ科魚類の降海および溯河の過程を含む一連の生活史中における腸内細菌叢の変遷について観察を行ったのでその結果について報告する。なお, 上記の供試魚は何れもこの時期においては摂餌活動をほとんど行わない状態にあるものと考えられる。

実験方法

供試魚 1972年10月, Fig. 1 に示す北海道さけますふ化場渡島支場の蓄養池で捕獲後

Table 1. Viable counts in the intestinal slime of anadromous pink salmon reared about 3 months in fresh water without feeding

fish No.	place	sampling date	sex	body length (cm)	viable counts /g.
1	Yuurrappu R.	30. Sep. '72	f*1	52.0	9.1×10^3
2				48.0	6.0×10^3
3				49.0	4.0×10^2
4				49.0	7.9×10^4
5				50.0	1.6×10^7
6			m*2	52.0	4.0×10^4
7				56.0	1.1×10^7
8				56.0	—
9				55.0	2.8×10^3
10				50.0	2.7×10^3

cf. *1: female, *2: male

Table 2. Viable counts in the intestinal slime of anadromous chum salmon

fish No.	place	sampling date	sex	body length (cm)	body weight (g)	viable counts /g.
11	Yuurrappu R.	6. Nov. '72	f* ¹	59.0	2400	3.3×10^8
12				69.0	3200	1.3×10^8
13				68.0	3300	4.6×10^8
14				69.0	3700	3.0×10^4
15				71.0	3650	5.9×10^8
16			m* ²	75.0	5000	3.5×10^8
17				78.0	5200	2.1×10^7
18				72.0	4400	7.6×10^8
19				75.0	5300	3.3×10^8
20				69.0	3800	1.7×10^8
21		8. Nov. '73	f	74.0	4000	2.8×10^8
22				74.0	4100	3.0×10^8
23				77.0	4900	8.7×10^8
24				75.0	4100	4.8×10^8
25				71.0	4100	7.9×10^8
26			m	76.0	4800	3.1×10^8
27				75.0	4300	9.4×10^8
28				73.0	4000	2.3×10^8
29				72.0	4400	1.1×10^8
30				71.0	4200	1.6×10^7

cf. *¹: female, *²: male

Table 3. Viable counts in the intestinal slime of mature masu salmon cultured in fresh water

fish No.	place	sampling date	sex	body length (cm)	body weight (g)	viable counts /g.
31	Mori H.	2. Oct. '72	f* ¹	33.0	445	N* ³
32				26.8	246	N
33				29.5	291	N
34				27.8	230	4.8×10^8
35				28.5	228	N
36			m* ²	24.8	181	1.4×10^8
37				25.3	205	1.3×10^4
38				26.8	278	2.1×10^4
39				24.3	215	8.8×10^8
40				26.5	252	N

cf. *¹: female, *²: male, *³: negative (less than 900)

して函館市の北大水産学部を持ち帰り、直ちに実験に供した。なお運搬に要した時間は渡島支場の場合は約 90 分、森支場の場合は約 60 分であつた。

生菌数測定と分離菌株の分類 生菌数測定は既報¹⁻⁴⁾と同様の方法により、また分離菌株の分類も同様に SHEWAN らの分類方法⁵⁾に準拠して実施した。しかし本実験の供試魚はいずれもほとんど腸管内に内容を容れない状態にあつたので、摘出した腸管の表面をアルコール綿で消毒後無菌的に切開して粘膜面の粘

Table 4. Generic distribution of microorganisms isolated from the intestinal slime of anadromous pink salmon reared about 3 months in fresh water without feeding

fish No.* ¹	sampling date	sex	<i>Micrococcus</i>	Coryneforms	<i>Achromobacter</i>	<i>Flavobacterium/Cytophaga</i>	<i>Pseudomonas</i>	Enterobacteriaceae	<i>Aeromonas</i>	<i>Vibrio</i>	Yeast	Number of the isolates
4	30. Sep. '72	f* ²	% 0	0	0	0	0	0	0	100	0	22
5			0	0	0	0	0	0	100	0	0	23
7		m* ³	% 0	0	0	0	0	0	58	42	0	24
8			0	0	0	0	0	0	15	85	0	21
% on the total isolates			0	0	0	0	0	0	44	56	0	90* ⁴

cf. *¹: see Table 1, *²: female, *³: male, *⁴: Number of the total isolates

Table 5. Generic distribution of microorganisms isolated from the intestinal slime of anadromous chum salmon

fish No.* ¹	sampling date	sex	<i>Micrococcus</i>	Coryneforms	<i>Achromobacter</i>	<i>Flavobacterium/Cytophaga</i>	Enterobacteriaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Vibrio</i>	Yeast	Number of the isolates
12	6. Nov. '72	f* ²	% 3	0	0	0	3	7	0	87	0	30
13			0	0	0	0	0	100	0	0	0	4
15			0	0	0	0	0	89	0	11	0	9
16		m* ³	% 0	0	33	0	0	33	0	0	34	3
19			0	0	0	0	0	33	0	67	0	30
20			3	0	10	0	7	73	0	7	0	30
21			8. Nov. '73	f	% 0	0	0	0	0	0	53	47
23			0	0	0	0	0	58	31	11	0	19
25			0	0	0	0	0	100	0	0	0	6
27			m	% 0	0	0	0	0	0	0	100	0
28			0	0	0	0	0	5	50	45	0	20
29			0	0	0	0	0	10	0	90	0	21
% on the total isolates			1	0	2	0	1	32	12	51	1	210* ⁴

cf. *¹: see Table 2, *²: female, *³: male, *⁴: Number of the total isolates

質物をかきとつて培養試料とした。なおサケの腸管内には多数の寄生虫が観察されたが、可及的にこれらを除去し、同様に培養試料の採取を行つた。

培地および培養条件 生菌数測定および菌株の分離において、渡島支場の試料については既報²⁾と同様に1/2希釈海水で調製した海水培地、森支場の試料については淡水培地を供試し、25°C・5日間の好気培

Table 6. Generic distribution of microorganisms isolated from the intestinal slime of mature masu salmon cultured in fresh water

fish No.*1	sampling date	sex	Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Aeromonas	Vibrio	Yeast	Number of the isolates
34	2. Oct. '72	f*2	% 0	0	17	0	0	0	83	0	0	12
36		m*3	% 0	0	0	0	0	0	0	0	100	30
37			0	0	8	0	0	8	0	0	84	13
38			0	0	0	0	0	0	100	0	0	15
% on the total isolates			0	0	4	0	0	1	36	0	59	70*4

cf. *1: see Table 3, *2: female, *3: male, *4: Number of the total isolates

Table 7. Typification* by inorganic salts requirement for growth of some isolates

genus	Number of some strains isolated from the intestinal slime of anadromous			
	T*1	pink salmon H, M*2	T	chum salmon H, M
<i>Aeromonas</i>	18	0	27	9
<i>Pseudomonas</i>	0	0	25	26
<i>Vibrio</i>	0	46	0	61
Enterobacteriaceae	—	—	1	0
<i>Achromobacter</i>	—	—	1	0
<i>Micrococcus</i>	—	—	1	0

cf. *1: Terrestrial type, *2: Halophilic or Marine type, *: by HIDAOKA *et al.*⁶⁻⁸⁾

養を行つた。

発育における海水中の主要無機塩に対する要求性に基づく菌型別 蓄養中の溯上カラフトマスおよび溯上中のサケの腸内粘質物より分離した菌株からそれぞれ属別に無作意に計 215 株を抽出し、これら代表株について日高ら⁶⁻⁸⁾の方法に準拠して陸 (T) 型、好塩 (H) 型および海洋 (M) 型の型別を行つた。

結 果

生菌数 供試魚のカラフトマス、サケおよびサクラマスの腸内粘質物中の生菌数測定結果を、供試魚の捕獲年月日、魚種、体長・体重、性別とともに Table 1, Table 2 および Table 3 に示した。

Table 1 にみられるごとく、淡水池で餌止めて約 3 カ月間蓄養された溯上カラフトマスにおいて、その腸内粘質物中の生菌数は、かなりの個体差が認められたが、雌雄ともに $10^2 \sim 10^7/g$ の範囲で検出され、また Table 2 に示すように溯上中のサケにおいては、1972 年および 1973 年の供試魚ともに $10^2 \sim 10^8/g$ の範囲で生菌数が測定された。

一方対照の淡水池で飼育された成熟期のサクラマスの腸内粘質物中の生菌数は、Table 3 にみられるように雌の場合は雄に較びきわめて少く、本研究で採用した方法では菌数の測定できない個体が 4 検体存在した

が、雄では $10^3 \sim 10^5/g$ の範囲で生菌数が測定された。

細菌叢 供試カラフトマス、サケおよびサクラマスの腸内粘質物より分離した 486 株から継代不能株を除く 370 株について、SHEWAN らの方法に準拠して属レベルの分類を行つた結果を、分離菌株数に対する各属の出現率 (%) で示すと、Table 4, Table 5 および Table 6 に示す通りである。

Table 4 にみられるように蓄養中の溯上カラフトマスの腸内菌叢は *Vibrio* あるいは *Aeromonas*, またはその両者が混在した状態で構成され、また溯上中のサケの場合は Table 5 に示すごとく、全般的には *Vibrio*, *Pseudomonas* および *Aeromonas* の三者が単独あるいは混在した状態で腸内菌叢が構成されていた。

一方淡水池で飼育された成熟期のサクラマスの腸内菌叢は Table 6 にみられるごとく、*Aeromonas* あるいは酵母がそれぞれその主体を成していた。

発育における海水中の主要無機塩に対する要求性に基づく菌型別 以上のカラフトマスおよびサケの腸内粘質物由来株から各属別に無作意に抽出した代表株について、日高らの方法に準拠して発育に対する無機塩の要求性に基づく菌型別を行つた結果は Table 7 に示すごとくで、*Vibrio* はすべて好塩型乃至海洋型、*Pseudomonas* は好塩型乃至海洋型と陸型が相半ばし、*Aeromonas* はサケ由来の好塩型 9 株を除きすべて陸型であつた。

考 察

以上は淡水池で蓄養中の溯上カラフトマス、河川を溯上中のサケ、対照の淡水池で飼育された成熟期のサクラマスにおける腸内粘質物中の生菌数とその菌叢について、実験方法において記載したごとく前二者は 1/2 希釈海水培地、後者は淡水培地を供試して観察した結果であるが、カラフトマスおよびサケの生菌数においてはかなりの個体差がみられるが $10^2 \sim 10^5/g$ の範囲で測定され (Table 1, 2), 前報までの飼育魚および自然環境棲息魚の観察結果¹⁻⁴⁾ とほぼ同様の値を示した。また本報において供試した上記サケ科魚類の多くは摂餌を行わない時期において観察されたにもかかわらず、実験的に餌止め飼育した同種魚において観察された結果²⁾ に較べ、絶食の影響はさほど顕著ではなかつた。これに対し終始淡水池で飼育された成熟期 (餌止め時期) のサクラマスにおいては一般に生菌数は少く、多い個体でも $10^4 \sim 10^5/g$ 程度であり (Table 3), 約 1 カ月間の餌止め飼育の影響が考えられた。

以上の結果は、絶食魚の腸内からは細菌が検出されないとする MARGOLIS⁹⁾ や産卵期のサケの消化管内は無菌の状態であるとする HUNTER¹⁰⁾ および BLAKE¹¹⁾ の報告とは明らかに異つており、著者らの観察結果はマス類において絶食により腸内生菌数は減少するが、4, 5 カ月の絶食後においてもなお腸内から細菌が検出されるとする MATTHEIS¹²⁾ の見解を支持するような結果であつた。

次に腸内菌叢については、淡水池で蓄養中の溯上カラフトマスでは *Vibrio* および *Aeromonas* (Table 4), 溯上中のサケでは *Vibrio*, *Pseudomonas* および *Aeromonas* (Table 5), 一方淡水池で飼育された成熟期のサクラマスでは *Aeromonas* および酵母 (Table 6) が、それぞれの腸内菌叢の主体を成すことが観察されたが、さらにこれらの分離株の発育に対する無機塩要求性に基づく日高らの方法による菌型別において *Vibrio* はすべて好塩型ないし海洋型、*Pseudomonas* は好塩型ないし海洋型と陸型が相半ばし、*Aeromonas* はその大部分が陸型に型別された。

すなわち本報で供試した蓄養中の溯上カラフトマスおよび溯上中のサケは、いずれもユーラップ川を溯上中に捕獲されたもので、棲息環境水が海水から淡水へ変わる過程の魚であつて、既報²⁾ の淡水飼育魚を人為的に漸次海水に移行させた実験における場合とは逆の過程を経過中の魚であるが、これら両者の環境水と腸内菌叢の関係はよく一致し、このことは棲息環境の変化に応じ腸内菌叢が変化すると推定した既報²⁾ の実験的観察結果を、自然環境に棲息する同種魚において実証し得たものと考えられる。

以上の本報の結果を前報までの結果¹⁻⁴⁾ と併わせまとめて Fig. 2 に図示した。すなわち Fig. 2 の右側に淡水および海水飼育魚、左側に自然環境の河川および海洋棲息魚を図示し、それらの腸内細菌叢を魚体の中

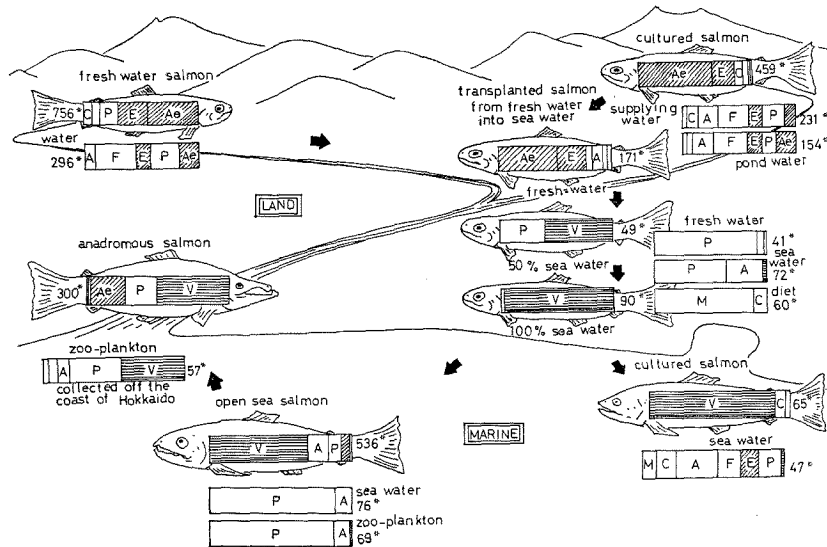


Fig. 2. Change of the intestinal microflora of salmonids in the course of their life history.

M: *Micrococcus*, C: *Coryneforms*, A: *Achromobacter*, P: *Pseudomonas*, F: *Flavobacterium/Cytophaga*, E: *Enterobacteriaceae*, Ae: *Aeromonas*, V: *Vibrio*, *: number of the isolates

央に、また棲息環境水、餌料あるいは餌料生物の細菌叢を魚体の下方にそれぞれ帯グラフで示した。

すなわち Fig. 2 にまとめた本研究のこれ迄における知見は、サケ科魚類においてその腸内細菌叢は淡水棲息時は陸型の *Aeromonas* および *Enterobacteriaceae*、海水棲息時は好塩型乃至海洋型の *Vibrio* がそれぞれその主体を成し、これらは宿主が河川から海洋へ、また海洋から河川へと移動する場合、その棲息環境に応じ漸次変化することを示すものとする。

要 約

1. 淡水池に飼育された成熟期のサクラマス雌を抜き、淡水池に蓄養中の溯上カラフトマスおよび溯上中のサケのいずれにおいても、腸内粘質物中の生菌数は $10^2 \sim 10^8/g$ の範囲で測定された。
2. 淡水池に飼育された成熟期のサクラマスの腸内菌叢は *Aeromonas* がその主体を成していた。
3. 溯上直後のサケ科魚類の腸内菌叢は、好塩型ないし海洋型の *Vibrio* がその主体を成すが、以後徐々に好塩型ないし海洋型の *Pseudomonas*、つづいて陸型の *Pseudomonas* および *Aeromonas* によって置きかわり、棲息環境水が海水から淡水に変わるにつれ、腸内菌叢は徐々に好塩型から陸型に変化することが観察された。

謝 辞

本研究の遂行に当り貴重なる試料の提供および種々の御便宜を与えられた北海道さけますふ化場渡島支場前場長麓竜司氏ならびに同場関係各位に深く感謝の意を表すると共に、種々の御援助および御協力を下つた北海道立水産孵化場の粟倉輝彦博士に厚く御礼申し上げる。

文 献

- 1) 吉水 守・木村喬久・坂井 稔: 本誌, **42**, 91-99 (1976).
- 2) 吉水 守・木村喬久・坂井 稔: 同誌, **42**, 863-873 (1976).
- 3) 吉水 守・木村喬久・坂井 稔: 同誌, **42**, 875-884 (1976).
- 4) 吉水 守・木村喬久・坂井 稔: 同誌, **42**, 1281-1290 (1976).
- 5) J. M. SHEWAN, G. HOBBS, and W. HODGKISS: *J. appl. Bact.*, **23**, 463-468 (1960).
- 6) 日高富男: 鹿大水紀要, **12**, 135-152 (1964).
- 7) T. HIDAOKA: *ibid.*, **14**, 127-180 (1965).
- 8) T. HIDAOKA and M. SAKAI: *Misaki Marine Biol. Inst. Kyoto Univ.*, **12**, 125-149 (1968).
- 9) L. MARGOLIS: *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **10**, 62-63 (1953).
- 10) A. C. HUNTER: *J. Bacteriol.*, **5**, 353-358 (1920).
- 11) I. BLAKE: Final Rep. Furuncul. Bomm., App. B. H. M., Stationary Office, Edinburgh, 1935, pp. 60-67.
- 12) TH. MATTHEIS: *Zeit. für Fish.*, **12**, N. F., 581-600 (1960).