



Title	サケ科魚類せつそう病原菌 <i>Aeromonas salmonicida</i> の産生する病因物質の検討 - II : <i>A. salmonicida</i> , Ar-4 (EFDL) の産生するプロテアーゼのヤマベ (<i>Oncorhynchus masou</i> f. <i>ishikawai</i>) 及び金魚 (<i>Carassius auratus</i>) に対する毒性の比較検討ならびに細胞毒性物質について
Author(s)	田島, 研一; TAJIMA, Kenichi; 高橋, 恒人 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 34(2), 111-123
Issue Date	1983-06
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23819
Type	departmental bulletin paper
File Information	34(2)_P111-123.pdf



サケ科魚類せつそう病原菌 *Aeromonas salmonicida* の産生する
病因物質の検討 — II

A. salmonicida Ar-4 (EFDL) の産生するプロテアーゼの
ヤマベ (*Oncorhynchus masou f. ishikawai*) 及び
金魚 (*Carassius auratus*) に対する毒性の比
較検討ならびに細胞毒性物質について

田島 研一*・高橋 恒人**・絵面 良男*・木村 喬久**

Studies on the Virulent Factors Produced by *Aeromonas*
salmonicida, a Causative Agent of Furunculosis
in Salmonidae-II

Studies on the pathogenicity of the protease of *Aeromonas*
salmonicida Ar-4 (EFDL) on yamabe (*Oncorhynchus*
masou f. ishikawai) and goldfish (*Carassius*
auratus), and the substance which
exhibits cytotoxic effect in RTG-2
(rainbow trout gonad) cells

Kenichi TAJIMA*, Tsuneto TAKAHASHI**, Yoshio EZURA*
and Takahisa KIMURA*

Abstract

Previously we reported on the purification of the extracellular protease from the supernatant culture fluid of *A. salmonicida* Ar-4 (EFDL) by acetone precipitation, ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose and DEAE-sephadex A-50 column chromatography.

In this paper, we examined the pathogenicity of the protease of *A. salmonicida* Ar-4 (EFDL) at each stage of the purification on yamabe (*O. masou f. ishikawai*) and goldfish (*C. auratus*), and then studied the cytotoxic substance other than the protease which was detected in process of purification.

In conclusion, we certified that the extracellular protease of *A. salmonicida* Ar-4 (EFDL) was a causative agent of furunculosis and we considered the cytotoxic substance to be a glycoprotein functioning as a co-factor of toxicity of the protease.

* 北海道大学水産学部微生物学講座
(Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University).

** 持田製薬株式会社
(Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.)

緒 言

前報¹⁾で述べたように、せっそう病はサケ科魚類の代表的な疾病であることから、本報ではヤマベ (*Oncorhynchus masou f. ishikawai*) を供試魚とし、さらにコイ科の魚である金魚 (*Carassius auratus*) においても本菌感染症の報告例²⁾がみられることから金魚も併せて供試魚として *A. salmonicida* Ar-4 (EFDL) 株の病原性ならびに本菌株のプロテアーゼ精製過程における各段階の酵素液の毒性についての比較検討、さらにこの精製過程において見出されたプロテアーゼ以外の培養細胞に対する毒性物質についても検討した。

実験方法

1. 供試魚ならびに飼育法 供試魚としてヤマベと金魚を用いた。ヤマベは道立水産ふ化場森支場及び北海道乙部町立サケ・マスふ化場から分与頂いた体長約 10 cm, 体重約 14 g の 0 年魚を用いた。金魚は奈良県大和郡山市の金魚農場から購入した体長約 9 cm, 体重約 16 g のものを用いた。

供試魚の飼育には、約 18 l 容ガラス製水槽を用い、水温は 15°C に保ち、通気によって酸素の供給を十分に保ちながら行った。供試魚は予め 7 日間予備飼育し、異状のないことを確認した後に実験に供試し、実験期間を通じて同様の条件で飼育を続けた。なおヤマベに対する生菌以外の毒性試験は道立水産ふ化場森支場内の既存の稚魚池において行った。同場飼育池の水温は実験期間中 13~14°C であった。またすべての実験において、実験期間中も給餌を行った。

2. 病原性または毒性試験用各試料の調製法 調製法は Fig.1 に示した。供試菌株 *A. salmonicida* Ar-4 (EFDL) の生菌懸濁液は、20°C で 27 時間振盪培養後、20 分間の遠心分離 (9,000×g, 5°C) により集菌し、菌体を滅菌生理的食塩水で 2 回洗浄後、菌体湿重量を測定し一定濃度になるように滅菌生理的食塩水に再懸濁して調製した。またプロテアーゼ精製過程における培養上清は原液のまま、各段階の蛋白質及びプロテアーゼ画分は蛋白質濃度を一定に調製した後、それぞれミリポアフィルター (HA 型) で濾過し、この濾液を普通寒天平板に塗抹して無菌であることを確認した後に供試した。なお各試料の対照は、生菌懸濁液接種の場合は、滅菌生理的食塩水を、その他の試料では各供試液を 100°C で 30 分間加熱したのものを用いた。

3. 各試料の接種法及び観察法 供試魚に対する各試料の接種には、まず供試魚を 1:2000 濃度のメタアミノ安息香酸エチルメタンスルホネート (MS-222) 溶液に 30 秒から 1 分間浸漬して麻酔後、ヤマベについては、魚体側左側アブラ鰭の下約 5 mm の筋肉内に、金魚については魚体側左側背鰭最後部から約 5 mm 下の筋肉内に所定量接種した。

すべての試験において供試魚は 5 尾ずつ用い、試料接種後の飼育期間は 8 日間とし、経日的に供試魚の異状の有無を観察した。また接種の結果、斃死した供試魚については解剖観察を行うと共に、生菌接種による斃死魚については接種菌の再分離も併せ実施した。供試魚に対する生菌懸濁液の病原性は魚体重 kg 当りの菌体湿重量で、精製各段階の蛋白質及びプロテアーゼ画分の毒性については蛋白質相当量で細菌学実習提要³⁾により 50% 致死量 (LD₅₀) を算出し、それぞれの試料の病原性あるいは毒性を比較検討した。

4. RTG-2 培養細胞に対する細胞毒性の試験法 前報¹⁾におけるプロテアーゼ精製過程の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー及び DEAE-セフデックス A-50 カラムクロマトグラフィーにおける全溶出フラクションを供試し、常法によりマイクロタイタープレートの各ウエルに RTG-2 細胞 (ニジマス稚魚生殖腺由来) を懸濁した 10% ウシ胎児血清加イーグル MEM 培地を 0.1 ml 宛分注し、18°C で 3 日間前培養を行い、コンフルエントに達した細胞に各試料を 0.05 ml 宛接種した。また対照として、溶出に用いた食塩を 0.2M, 0.3M 及び 0.5M 添加した培地を同じく 0.05 ml 宛接種し、18°C に 2 日間置いた後、ホルマリン添加により細胞を固定。常法により 0.1%

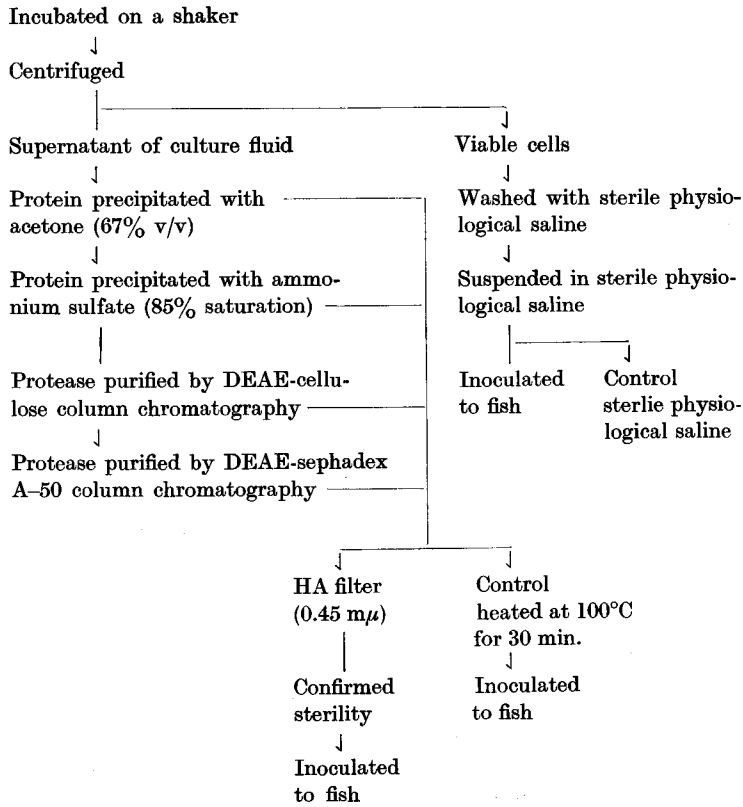


Fig. 1. Preparation of samples of *A. salmonicida* Ar-4 (EFDL) for pathogenicity and toxicity tests.

クリスタルバイオレットエタノール溶液で染色後、細胞変性の有無を観察した。

5. 細胞毒性物質の紫外外部吸収スペクトル 4. で明らかに細胞変性のみられた各画分の一部を集めて凍結乾燥により濃縮後蒸留水に対して一夜透析して脱塩した後、分光光度計を用いて吸収スペクトルを調べた。

6. 糖類の検出法 (Molisch 反応)⁴⁾ 5% α -ナフトール・エタノール溶液 1~2 滴を前述 4. の濃縮細胞毒性画分溶液 1 ml に加え、1 ml の濃塩酸を静かに重層し、境界面に生ずる赤紫帯の有無を観察した。

7. 細胞毒性物質のヤマベに対する毒性試験 供試魚及び飼育法は前述の 1. と同様である。また前述 4. で集めた細胞毒性物質画分を 50% ポリビニルピロリドン溶液を用いた浸透圧法により 0°C で濃縮後、溶出に用いた緩衝液に対して一夜透析して、2. で述べた方法と同様にミリポアフィルター (HA 型) で濾過して供試した。なお対照は緩衝液のみを用いた。また接種法及び観察法は前述の 3. と同様である。

Table 1. Pathogenicity and LD₅₀ of *A. salmonicida* Ar-4 (EFDL) on yamabe and goldfish

(A) yamabe

Dose** (mg/kg)	Fish number died*								LD ₅₀ **	
	Days after inoculation									
	1	2	3	4	5	6	7	8		
157	5/5									49.6
15.7	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
1.57	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		

(B) goldfish

Dose** (mg/kg)	Fish number died*								LD ₅₀ **	
	Days after inoculation									
	1	2	3	4	5	6	7	8		
181	0/5	0/5	3/5	2/5						57.2
18.1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
1.81	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		

*: fish number died/fish number tested

** : wet cell weight (mg)/fish weight (kg)

Table 2. Toxicity and LD₅₀ of supernatant culture fluid of *A. salmonicida* Ar-4 (EFDL) on yamabe and goldfish

(A) yamabe

Dose** (mg/kg)	Fish number died*								LD ₅₀ **	
	Days after incubation									
	1	2	3	4	5	6	7	8		
91	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		not calculated
9.1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
0.91	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		

(B) goldfish

Dose** (mg/kg)	Fish number died*								LD ₅₀ **	
	Days after incubation									
	1	2	3	4	5	6	7	8		
112	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		not calculated
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		

*: fish number died/fish number tested

** : protein (mg)/fish weight (kg)

結 果

1. 供試菌生菌の病原性 供試菌, Ar-4 (EFDL) 株のヤマベ及び金魚に対する病原性の検討結果は Table 1 に示した。ヤマベについてみると、接種菌量の最も多い 157 mg/kg では、接種後 1 日目で供試 5 尾すべてが斃死し、斃死魚には接種部付近の膨隆、筋肉内出血及び筋肉融解が認められると共に、肝臓に出血斑が観察されるものもあった。15.7 mg/kg 接種した場合は接種部位に若干の膨隆が認められるものもあったが、すべて 8 日目まで生残した。また 1.57 mg/kg 接種では何ら異状は認められなかった。一方、金魚では 181 mg/kg 接種した場合、3 日目で 3 尾、4 日目ではすべての供試魚が斃死した。斃死魚には接種部付近の膨隆、筋肉内出血及び筋肉融解が認められると共に、皮膚の崩壊、脱鱗、皮膚表面の変色等が認められるものもあったが、内臓には特に異状はみられなかった。18.1 mg/kg 接種では、斃死魚はなかったが、供試魚すべてに接種部付近の膨隆及び立鱗が認められた。1.81 mg/kg 接種においても同様の症状を呈するものもあった。

以上の結果から、供試菌生菌のヤマベ及び金魚に対する LD₅₀ はそれぞれ 49.6 mg/kg, 57.2 mg/kg と算出された。なおヤマベ及び金魚の斃死魚の菌接種部、腎臓及び心臓血液から接種菌の分離を行った結果、すべて接種菌を優勢に分離し得た。

2. 供試菌培養上清の毒性 前述の方法によりヤマベ及び金魚に対する毒性の検討結果は Table 2 に示した。ヤマベに蛋白相当量にして 91.0 mg/kg 接種した場合、接種後 1 日目で 3 尾の供試魚が斃死したが、以後の斃死はみられなかった。斃死魚には接種部付近の膨隆及び筋肉内出血が認められた。9.1 mg/kg 及び 0.91 mg/kg 接種では共に供試魚の斃死はみられず、何ら異状も認められなかった。

Table 3. Toxicity and LD₅₀ of protease*** obtained with acetone precipitation on yamabe and goldfish

(A) yamabe

Dose** (mg/kg)	Fish number died*								LD ₅₀ **
	Days after inoculation								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
101	2/5	0/5	1/5	0/5	1/5	1/5			31.9
10.1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
1.01	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	

(B) goldfish

Dose** (mg/kg)	Fish number died*								LD ₅₀ **
	Days after inoculation								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
133	5/5								42.1
13.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
1.33	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	

*: fish number died/fish number tested

** : protein (mg)/fish weight (kg)

***: see Fig. 1

金魚では、112 mg/kg 接種した場合、全供試魚の接種部付近の膨隆及び立鱗がみられたが、斃死に至るものは全くなかった。

以上、供試菌培養上清の毒性が低かったことから、LD₅₀ は算出し得なかった。

3. アセトン沈殿蛋白質画分の毒性 前述の方法によりヤマベ及び金魚に対する毒性の検討結果は Table 3 に示した。

ヤマベに蛋白質相当量にして 101 mg/kg 接種した場合、接種後 1 日目、3 日目、5 日目及び 6 日目に 1 尾ずつ斃死した。斃死魚の接種部付近には膨隆、筋肉内出血及び筋肉融解等が認められた。10.1 mg/kg 及び 1.01 mg/kg 接種では供試魚の斃死はみられず、何ら異状も認められなかった。

一方、金魚に 133 mg/kg 接種した場合、接種後 1 日目で供試魚すべてが斃死し、斃死魚には前述のヤマベの場合と同様の症状がみられた。13.3 mg/kg 及び 1.33 mg/kg 接種では接種部付近に若干の膨隆及び立鱗が認められたが斃死はみられなかった。

以上の結果から、ヤマベ及び金魚に対する LD₅₀ はそれぞれ 31.9 mg/kg、42.1 mg/kg と算出された。

4. 硫酸分画蛋白質の毒性 前述の方法によりヤマベ及び金魚に対する毒性の検討結果は Table 4 に示した。

ヤマベに蛋白質相当量にして 32.1 mg/kg 及び 3.21 mg/kg 接種した場合、いずれも接種 1 日目ですべて斃死した。0.321 mg/kg 接種では、斃死はみられず、何ら異状も認められなかった。

金魚では、27.1 mg/kg 接種した場合、接種 1 日目ですべて斃死した。2.71 mg/kg では接種部付近に膨隆及び立鱗、0.271 mg/kg では若干の膨隆が認められたが、共に斃死はみられなかった。なお

Table 4. Toxicity and LD₅₀ of protease*** obtained with ammonium sulfate precipitation on yamabe and goldfish

(A) yamabe

Dose** (mg/kg)	Fish number died*									LD ₅₀ **
	Days after inoculation									
	1	2	3	4	5	6	7	8		
32.1	5/5									1.04
3.21	5/5									
0.321	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		

(B) goldfish

Dose** (mg/kg)	Fish number died*									LD ₅₀ **
	Days after inoculation									
	1	2	3	4	5	6	7	8		
27.1	5/5									8.57
2.71	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
0.271	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		

*: fish number died/fish number tested

** : protein (mg)/fish weight (kg)

***: see Fig. 1

田島ら : *A. salmonicida* の産生するプロテアーゼの毒性

Table 5. Toxicity and LD₅₀ of protease*** purified by DEAE-cellulose column chromatography on yamabe and goldfish

(A) yamabe

Dose** (mg/kg)	Fish number died*								LD ₅₀ **	
	Days after inoculation									
	1	2	3	4	5	6	7	8		
10.3	3/5	1/5	0/5	1/5						3.26
1.03	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
0.103	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		

(B) goldfish

Dose** (mg/kg)	Fish number died*								LD ₅₀ **	
	Days after inoculation									
	1	2	3	4	5	6	7	8		
28.9	5/5									9.14
2.89	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
0.289	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		

*: fish number died/fish number tested

** : protein (mg)/fish weight (kg)

***: see Fig. 1

斃死魚についてはヤマベ及び金魚共に前述のアセトン沈殿蛋白質溶液接種の場合とほぼ同様の症状を呈した。

以上の結果より、ヤマベ及び金魚に対する LD₅₀ はそれぞれ 1.04 mg/kg, 8.57 mg/kg と算出された。

5. DEAE-セルロースカラムクロマト分画プロテアーゼ画分の毒性 前述の方法によりヤマベ及び金魚に対する毒性の検討結果は Table 5 に示した。

ヤマベに蛋白質相当量にして 10.3 mg/kg 接種の場合、接種1日目、2日目、4日目にそれぞれ1尾ずつ斃死した。1.03 mg/kg 及び 0.103 mg/kg 接種では斃死魚はなく、何ら異状も認められなかった。

金魚では、28.9 mg/kg 接種した場合、接種後1日目ですべて斃死した。2.89 mg/kg 及び 0.289 mg/kg 接種では斃死はみられず、何ら異状は認められなかった。

以上の結果から、ヤマベ及び金魚に対する LD₅₀ はそれぞれ 3.26 mg/kg, 9.14 mg/kg と算出された。斃死魚については金魚で心臓付近に出血がみられた他は、前述のアセトン沈殿蛋白質溶液接種の場合とほぼ同様の症状を呈した。

6. DEAE-セファデックス A-50 カラムクロマト分画プロテアーゼ画分の毒性 前述の方法によりヤマベ及び金魚に対する毒性の検討結果は Table 6 に示した。

ヤマベに蛋白質相当量にして 12.1 mg/kg 接種した場合、接種後1日目ですべての供試魚は斃死し、1.21 mg/kg 接種では1日目、2日目にそれぞれ1尾ずつ斃死した。以後は斃死がみられず生残魚にも何ら異状が認められなかった。0.121 mg/kg 接種では何ら変化はみられなかった。

Table 6. Toxicity and LD₅₀ of protease*** purified by DEAE-sephadex A-50 column chromatography on yamabe and goldfish

(A) yamabe

Dose** (mg/kg)	Fish number died*								LD ₅₀ **	
	Days after inoculation									
	1	2	3	4	5	6	7	8		
12.1	5/5									1.52
1.21	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
0.121	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		

(B) goldfish

Dose** (mg/kg)	Fish number died*								LD ₅₀ **	
	Days after inoculation									
	1	2	3	4	5	6	7	8		
25.6	5/5									5.11
2.56	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
0.256	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/0		
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		

*: fish number died/fish number tested

** : protein (mg)/fish weight (kg)

***: see Fig. 1

金魚では、25.6 mg/kg 接種した場合、接種後1日目ですべて斃死した。2.56 mg/kg では1日目に1尾斃死したが、以後は接種部付近に膨隆及び立鱗がみられるものもあったが、斃死に至らず耐過した。0.256 mg/kg では何ら変化はみられなかった。なお斃死魚については、ヤマベ及び金魚ともに前述のアセトン沈殿蛋白質溶液接種の場合とはほぼ同様の症状を呈した。

以上の結果より、ヤマベ及び金魚に対する LD₅₀ はそれぞれ 1.52 mg/kg, 5.11 mg/kg と算出された。

なおこれまでのヤマベ及び金魚に対する各試料の毒性試験において対照魚には何ら異状は認められなかった。また Table 7 にこれまでの毒性試験の結果をまとめて示した。

7. RTG-2 培養細胞に対する毒性試験 前述までの毒性試験においてプロテアーゼのヤマベ及び金魚に対する毒性は、精製が進むにつれて上昇したが、精製の第3段階である DEAE-セルロースカラムクロマト分画後にやや毒性が低下したことから、プロテアーゼ以外の毒性物質の存在が示唆された。そこで前述の方法で、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー及び DEAE-セファデックス A-50 カラムクロマトグラフィーの全溶出フラクションについて RTG-2 培養細胞に対する毒性を調べた。結果は Fig. 2 及び Fig. 3 に示した。

まず DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにおける全溶出フラクションの RTG-2 細胞に対する毒性 (Fig. 2) は、プロテアーゼ活性を有するフラクション No. 82~No. 103 の画分に認められ、さらにその後の食塩濃度が 0.2M から 0.4M の範囲で溶出されるフラクション No. 125~No. 217 の画分にも明らかに認められた。この画分には Fig. 2 から明らかなように、Schacterle and Pollack 法⁵⁾ で検出され得る蛋白質のピークは認められなかった。なお対照として食塩を 0.2M, 0.3

Table 7. Comparison of pathogenicity of viable cells and toxicity of protease of *A. salmonicida* Ar-4 (EFDL) on yamabe and goldfish

Purification steps	Clinical signs		LD ₅₀ (mg/kg)	
	yamabe	goldfish	yamabe	goldfish
Viable cells	Swelling, haemorrhage in muscle Liquefaction of muscle Haemorrhagic spot at liver	Swelling, haemorrhage in muscle Liquefaction of muscle Destruction of skin Scale loss Discoloration of lesion	49.6	57.2
Supernatant	Swelling, haemorrhage in muscle	Swelling. Scale protrusion	—	—
Acetone precipitation	Swelling, haemorrhage in muscle Liquefaction of muscle	Swelling, haemorrhage in muscle Liquefaction of muscle Scale protrusion	31.9	42.1
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	as above	as above	1.04	8.57
DEAE-cellulose column chromatography	as above	Swelling, haemorrhage in muscle Liquefaction of muscle Scale protrusion Haemorrhage around heart	3.26	9.14
DEAE-sephadex A-50 column chromatography	Swelling, haemorrhage in muscle Liquefaction of muscle Congestion at fin-base	Swelling, haemorrhage in muscle Liquefaction of muscle Scale protrusion Haemorrhage and congestion at fin-base	1.52	5.11

M 及び 0.5M 添加した緩衝液では、細胞に対して何ら異状は認められなかった。両画分の細胞変性状態を顕微鏡により観察したところ、プロテアーゼ画分では細胞シートが崩壊あるいは網目状を呈しているのに対して、フラクション No. 125~No. 217 の画分では細胞シートが崩壊あるいは均質な粒子を呈しており、作用様式に相違が観察された。さらに後者の画分について各フラクションを前述のイーグル MEM 培地で 2 倍、4 倍及び 8 倍に希釈して、前述と同様の方法で細胞に対する毒性を観察した結果、Fig. 2 に示したごとく、食塩濃度 0.25M~0.3M 間に溶出するフラクション No. 160 を中心とした画分に高い毒性が認められた。一方、DEAE-セファデックス A-50 カラムクロマトグラフィにおける全溶出フラクションの RTG-2 細胞に対する毒性は Fig. 3 に示したごとくでプロテアーゼ活性を有するフラクション No. 89~No. 100 の画分以外には認められなかった。

8. 細胞毒性物質の紫外外部吸収スペクトル 細胞毒性画分の紫外外部吸収スペクトルをみた結果は Fig. 4 に示した。図から明らかなように本物質は 200 nm に吸収極大を持ち、280 nm 付近にもわずかながら吸収が認められた。

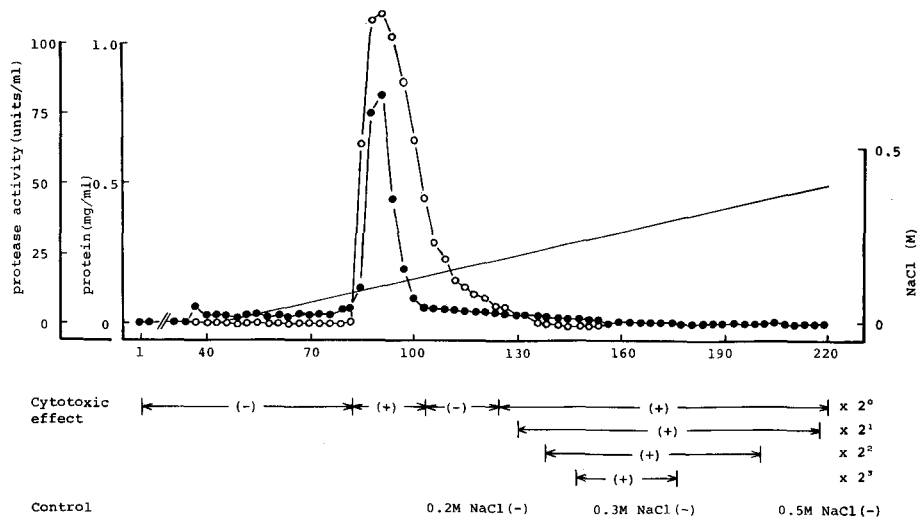


Fig. 2 Fractionation of protease and cytotoxic substance on DEAE-cellulose and cytotoxic effects of them (see Fig. 1)

○— protease activity (-): cytotoxic effect negative
 ●— protein (+): cytotoxic effect positive

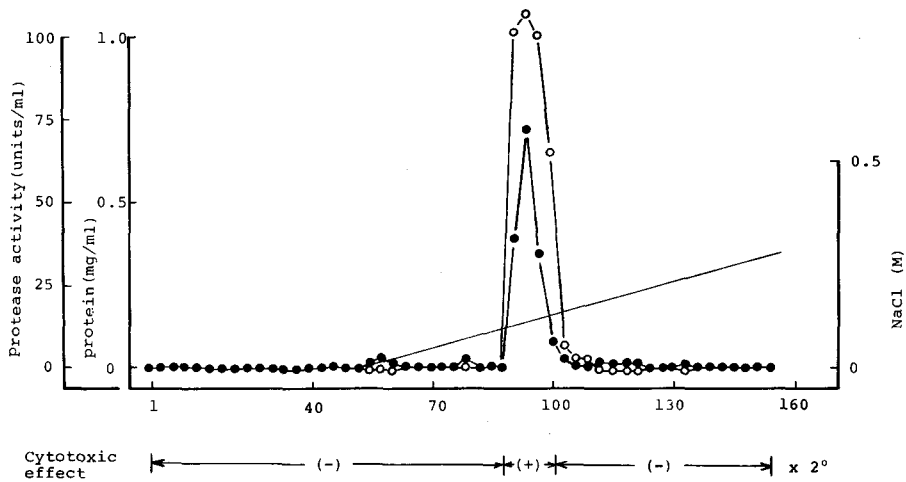


Fig. 3 Fractionation of protease on DEAE-sephadex A-50 and cytotoxic effects of them (see Fig. 1)

○— protease activity (-): cytotoxic effect negative
 ●— protein (+): cytotoxic effect positive

9. 糖類の検出 糖類の検出法である前述の Molish 反応をみたところ、濃縮細胞毒性画分溶液は明らかに陽性反応を示した。

10. 細胞毒性物質のヤマベに対する毒性試験 細胞毒性物質を含んだ画分を前述の方法で濃縮し、ヤマベに接種して毒性の観察を行った。結果は Table 8 に示した。供試魚は8日間の観察期間中、外見的には何らの変化もみられず、解剖所見でも異状は認められなかった。

考 察

供試菌 Ar-4 (EFDL) 株の産生するプロテアーゼの毒性の検討を行うに先立ち、供試菌の病原性について再確認を行った。その結果、ヤマベ及び金魚の両供試魚共に接種部付近に膨隆・立鱗がみられ、金魚では体表に出血が観察されるものもあった。また 斃死魚について膨隆部位を切開すると、筋肉内に血腫様浸出液の貯留が認められ、両供試魚いずれの場合もこの患部から接種菌を優勢に分離し得たことから、この膨隆患部は接種菌によって形成された、いわゆる癩と思われた。さらに両供試魚の斃死魚の腎臓及び心臓血液からも接種菌を優勢に分離し得たことから、両供試魚は明

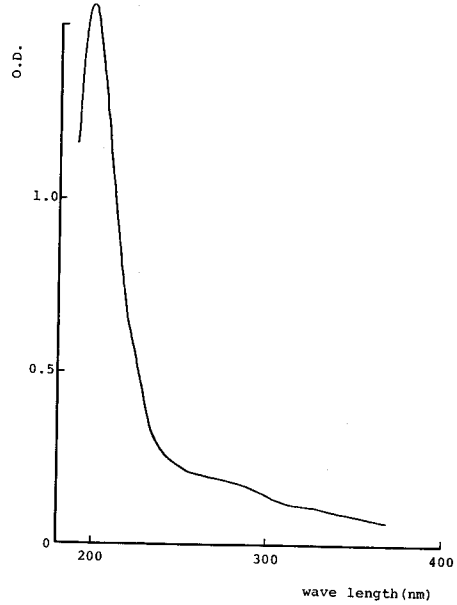


Fig. 4 U.V. absorption spectrum of cytotoxic substance obtained by DEAE-cellulose column chromatography (see Fig. 2)

Table 8. Toxicity and LD₅₀ of cytotoxic substance obtained by DEAE-cellulose column chromatography on yamabe (see Fig. 2)

Dose** (mg/kg)	Fish number died*								LD ₅₀ **	
	Days after inoculation									
	1	2	3	4	5	6	7	8		
1.87	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	not calculated
control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		

*: fish number died/fish number tested

** : protein (mg)/fish weight (kg)

らかに供試菌の接種により斃死したものと思われた。そこで本菌の産生するプロテアーゼについて、各精製段階の各蛋白質及びプロテアーゼ試料の毒性の検討を行った。

まず培養上清の毒性について検討した結果、ヤマベ及び金魚の両供試魚とも接種部付近に前述の生菌病原性試験において認められた、いわゆる癩と外見上類似の膨隆及び立鱗がみられたが、筋肉融解等は認められなかった。すなわち皮下筋肉組織の融解物や血液等を含むせう様患部形成は明らかではなかった。しかし、さらに精製の進んだアセトン沈澱蛋白質溶液から DEAE-セフアデックス A-50 カラムクロマトまでの各分画プロテアーゼの毒性試験の結果、ヤマベ及び金魚の両供試魚に常に一貫してせう様患部の形成が観察され、この患部付近の筋肉には出血及び筋肉の融解がみられ、

さらに症状の進んだものでは血液を含んだ膿様浸出液で満たされているものもあった。また解剖所見では、ヤマベでは内臓に異状を呈したものはみられなかったが、金魚では心臓付近及び腹腔内に出血がみられるものもあった。

以上の結果から、供試菌 Ar-4 (EFDL) 株の産生するプロテアーゼと、本菌の感染によるせつそう病における典型的な病変との間には密接な関連性があるものと推察された。Cipriano ら⁶⁾ も *A. salmonicida* の培養上清より RTG-2 培養細胞に対する毒性物質を得ているが、病原性との関係ではプロテアーゼ活性を合せ持っている成分がその活性を持たない成分に比較してより病原性が強いことを報告している。

また以上の結果から両供試魚について精製の各段階の試料の 50% 致死量 (LD₅₀) を比較検討した結果、いずれの試料に対してもヤマベの方が若干感受性が高い傾向がみられた。本菌が本来サケ科魚類のせつそう病原菌として知られていることから当然のことと思われる。しかし、本菌感染症の罹病魚の症状は、魚種による差はあまりない⁷⁾ ともいわれており、前述したように病原性及び毒性試験の結果における外見及び解剖所見でみられたように、両供試魚にはほぼ同様の症状が観察されたことから、実験室内での飼育の容易さを考慮するならば、本菌の病原因子の研究などのために金魚もまた十分供試魚として使用し得るものと考えられる。

また LD₅₀ 値は、プロテアーゼの精製が進むにつれてヤマベ及び金魚とも減少、すなわち毒性が高くなっていくが、精製が進み、DEAE-セルロースカラムに展開して得られたプロテアーゼ画分を接種した場合プロテアーゼ活性は明らかに上昇しているにもかかわらずヤマベ及び金魚のいずれにおいても若干の毒性の低下がみられた。このことからプロテアーゼ以外に何らかの毒性物質の存在が推察された。そこで DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで得られた全溶出フラクションについて RTG-2 培養細胞に対する細胞毒性の観察を行った結果、プロテアーゼ活性を有する画分以外にも細胞に対して明らかに毒性を示す画分が見出された。この画分の一部を集めて凍結乾燥により濃縮したこの細胞毒性画分は 200 nm に吸収極大を示す他、280 nm 付近にも若干の吸収が認められた。ところで、Fuller ら⁸⁾ は *A. salmonicida* の培養上清からニジマスの白血球を溶解する物質を見出し、この物質が糖蛋白であると報告している。本物質についても Molisch 反応により糖の検出を試みたところ明らかに陽性反応を示した。

また物質の組成は明らかにされていないが野村ら⁹⁾ も *A. salmonicida* の培養上清液からイワナ、ヤマベ及びニジマスの赤血球膜を破壊する物質について報告している。しかし、Cipriano ら⁶⁾ によれば白血球膜溶解活性と病原性の強さとは直接関連性がないと述べている。

細胞毒性画分のヤマベに対する毒性を検討した結果、供試魚には外見的及び解剖所見ともに何らの異状がみられなかったことから、おそらく本物質単独ではせつそう病起病因子となり得ず、本菌のプロテアーゼの毒性の補佐的因子として作用するものではないかと考えられる。この点に関しては Fuller ら⁸⁾ も *A. salmonicida* の病原性の研究において、生菌に前述の白血球溶解物質を加えた場合の方が生菌単独の場合よりも死亡率が増加することを報告している。

謝 辞

本実験を遂行するにあたり、ヤマベを分与頂いた北海道立水産ふ化場森支場並びに北海道乙部町立サケ・マスふ化場に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 田島研一・高橋恒人・絵面良男・木村喬久 (1983). サケ科魚類せつそう病原菌 *Aeromonas salmonicida* の産生する病原物質について-I. *A. salmonicida* の産生するプロテアーゼの精製, 北大水産彙報, 34(2), 104-110.

田島ら： *A. salmonicida* の産生するプロテアーゼの毒性

- 2) Mawdesley-Thomas, L.E. (1969). Furunculosis in the goldfish *Carassius auratus* (L). *J. Fish. Biol.* **1**, 19-23.
- 3) 医科学研究所学友会 (1976). 細菌学実習提要 (改訂5版), 590 p. 丸善, 東京.
- 4) 日本生化学会 (1976). 生化学実験講座 4. 糖質の化学 (下), 690 p. 東京学同人化, 東京.
- 5) Schacterle, G.R. and R.L. Pollack (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. *Anal. Biochem.* **51**, 654-655.
- 6) Cipriano, R.C., B.R. Griffin and B.C. Lidgerding (1981). *Aeromonas salmonicida*: Relationship between extracellular growth products and isolate virulence. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **38**, 1322-1326.
- 7) 江草周三 (1978). 魚の感染症, 554 p. 恒星社厚生閣, 東京.
- 8) Fuller, D.W., K.S. Pilcher and J.L. Fryer (1977) A leukocytolytic factor isolated from cultures of *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish. Res. Board Can.*, **34**, 1118-1125.
- 9) 野村節三・斉藤博司・横山真樹・佐藤敏行 (1979). セッソー病原菌 *Aeromonas salmonicida* の溶血毒素 I. 溶血毒素の産生条件と部分精製, 昭和54年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 56.