HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究
Author(s)	吉水, 守
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産学)
Dissertation Number	甲第1223号
Issue Date	1977-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32704
Type	doctoral thesis
File Information	1223.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

主論文内容の要旨

ふりがな 氏名	よし みず まもる 吉 水 守
専攻名	水産食品学専攻
入学年月	昭和 47 年 4 月

論文題名

サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究

魚類の腸内細菌については、魚の腐敗や汚染など食品衛生学的見地から、また魚類の栄養や成長に関する魚類生理学的見地から広く研究が行われている。

魚類の消化管からは、体表・鰓などの細菌叢とは異る比較的一定した菌種が優勢種として検出されると する報告が多く、一方魚類固有の正常腸内細菌叢は認められないとする見解も古くから支持されている。

しかしこの分野における研究は、一般に魚類の生活史上の一時点における観察叢定が多く、全生活史を通した恒常的な菌叢の観察、優勢種の来源、それらの腸内定着の機構および魚体生理における意義などについては、未だ十分に解明されていない。

従って魚類の正常腸内細菌叢の実態の把握は、魚類の生理および病理に関連し重要な問題と考えられる。本研究においては、わが国の北方冷水域における主要な養殖魚である広塩性魚類のサケ科魚類を対象に、その生活史および生活環境を考慮にいれてそれらの腸内細菌叢の実態およびその変遷を微生物生態学的に観察した。

先ず第1章においては淡水および海水飼育魚について腸内細菌叢の観察を行った。腸内生菌数はともに 10^3 ~ 10^7/g の範囲内で個体差は大きいが、腸内細菌叢は両飼育環境水の主要菌叢である genus Flavobacterium/Cytophaga, Achromobacter, Pseudomonas とは異り、淡水飼育魚では genus Aeromonas および family Enterobacteriaceae、海水飼育魚では genus Vibrio がそれぞれの主体を成していた。

第2章においては淡水飼育魚を漸次海水に移行させ、第1章において観察した相違を実験的に再現しようと試みた。給餌移行中もほぼ一定に経過したが、その菌叢は実験開始時に主体を成した旧高らのいわゆる陸型の Aeromonas が飼育水中の海水割合の増加につれ、陸型から好塩型の Pseudomonas に、さらに好塩型の Vibrio に

置きかわり、遂には*Vibrio*がその主体を占めるに至り、第1章において認められた淡水飼育魚と海水飼育魚の腸内細菌叢における相違を実験的に再現し得た。また非給餌群においては腸内生菌数は漸減したが、その菌叢は淡水飼育魚では*Aeromonas*、また海水飼育魚では*Vibrio*が比較的長期間腸管内に留まることが観察された。

　そこで第3章および第4章において自然環境生息魚においても上記の飼育魚における結果が同様に認められるか否かを確認するため、河川および湖沼生息魚ならびに海洋生息魚について観察を行った。河川および湖沼生息魚においては腸内生菌数はともに10^2～10^8/gの範囲内で測定され、それらの菌叢は*Aeromonas*および*Enterobacteriaceae*あるいは*Pseudomonas*がその主体を成し、また外洋生息魚においては腸内生菌数は10^2～10^7/gの範囲内で測定され、その菌叢は*Vibrio*が主体を成していた。同様のパターンは外洋および沿岸域に生息する数種の底棲魚における観察においても認められ、自然環境生息魚においても飼育魚と同様の所見が観察された。

　次にサケ科魚類は産卵期に母川に溯上する習性を有することから、第5章においては産卵期溯上魚および終始淡水中で飼育され成熟期に達した飼育魚を対象に、それらの腸内細菌叢について観察を行った。溯上中捕獲され催熟のため蓄養中のカラフトマスならびに溯上中のサケはともに腸内生菌数が10^2～10^8/gの範囲内で測定され、またその腸内細菌叢は主として好塩型あるいは海洋型の*Vibrio*および*Pseudomonas*，陸型の*Pseudomonas*ならびに*Aeromonas*により構成されていたが、淡水池で成熟期に達したサクラマスでは腸内生菌数は少く、その菌叢は陸型の*Aeromonas*および酵母がその主体を成していた。この時期の生息環境水は海水から淡水へ変化し、第2章の海水移行実験とは逆の変化であるが、本章で観察された生息環境水と腸内細菌叢の関係は第2章における所見に矛盾することなく一致し、第2章の実験的観察結果は自然環境生息魚においても同様に観察し得られた。

　第6章においては卵から稚魚に至る過程を細菌学的に追求し、腸内細菌叢の形成時期を推察した。すなわち胚胎期の卵表面では発眼期を最高に卵重g当り10^3～10^6の範囲内で生菌数が測定され、その菌叢は*Flavobacterium*および*Pseudomonas*がその主体を成し、前者の割合は経日的に増加した。次に孵化稚魚の臍のう内容物か

すの腸十境条察菌て
行水たで環気観成菌
移境まし下でpH嫌が構すべ
水へ環息生、淡から水海は置換され、観察された。温低低pH嫌が構すべ
ら海水へれつ受菌叢を構成すること対し抵抗性を示し、と主要は
る相互にこと菌群は、リ、低pH嫌が構すべ
影響を受菌叢を構成すること対し抵抗性を示し、と主要は
内細菌叢すること可能であ、低pH嫌が構すべ
分増殖すること可能であ、低pH嫌が構すべ
お件下で十分増殖に腸内細菌叢の主要は
さ抽出株に、Aeromonas hydrophila に、Enterobacteriaceae
群Hafnia alvei (Enterobacter sp.) に、
Vibrio はV. fischeri に同定され、
はきわめて均質的であった。
上のことから宿主側に腸内細菌選択能
存在すること推察した。
以上本研究の成果を総括すれば次のと
おりである。
1. 健康状態にあるサケ科魚類の腸内細
菌叢は、孵化稚魚のj浮上稚魚あるの菌叢
消化管が時期にわたって、生活環境の菌叢
稚魚の異なる菌叢、すなわちいは
よって形成され、これらの菌群は本魚種
が淡水域に生活する間を通じ優勢種
て経過する。
2. その後の降海過程において、これら
の陸型の菌群は徐々に好塩型あるいは海

らは細菌は検出されないが、その体表が測
らは体重g当り 10^2～10^4程度の生菌数
定され、その菌叢はFlavobacterium/Cyto-
-phagaceae, Pseudomonas, Achromobacterなど
が主体を成し飼育用水の菌叢に類似した。
またこの時期の消化管からは10^4/g以下の
生菌数が測定されたが、その菌叢は
Pseudomonas, Coryneforms, Flavobacterium/
Cytophagaceae, Micrococcusなどにより構成
され、また飼料および飼育用水の菌叢の
影響を受けていることが観察された。し稚
か腸ら吸収後の浮上稚魚および春内稚
魚の腸内容物からは10^3～10^7/gの範囲内で
生菌数が測定され、その菌叢は徐々に
Aeromonas主体を占めるに至り、この時期
に科の腸内細菌叢が形成され、海
サケ魚類の腸内細菌叢の形成研究をと株側わし、
もリ分離し、腸内細菌叢の菌形性主行を推察した。
終に離し、腸内細菌叢のを在内菌てミ
に推察に、腸内細菌叢を陸い淡型、海か
ち淡水域生型に宿主が

洋生種は海洋性の最優勢種として、腸内細菌叢の置きかわりにより Vibrio 型の生活時には Vibrio が腸内細菌叢の最優勢種として終始する。

3. 次いで産卵期に母川へ遡上する時期に至ると、腸内細菌叢の主体は再び陸型の Aeromonas などに徐々に置きかわる。すなわち生活環境の変化に伴い、腸内細菌叢の構成は変化する。

4. 以上のようにサケ科魚類において特異的腸内細菌叢が観察されることは、その菌叢を構成する菌種の種々の生物学的性状を併せ、魚体側における菌種選択能の存在を示唆するものと考えられる。

( )

サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究

図書掛
北海道大学水産学部
分類 北大庁水 ア 1
著者 33031
56048
52.10.-6

吉水守

（昭和52年）

目　　次

緒　言　1

第１章　飼育魚の腸内細菌叢

目　的　20

実験材料および方法　22

結　果　29

考　察　44

小　括　46

第２章　人為的海水移行および餌止め飼育の腸内細菌叢におよぼす影響

目　的　48

実験方法　49

結　果　56

考　察　74

小　括　80

第３章　河川および湖沼生息魚の腸内細菌叢

目　的　84

実験方法 84
結果 88
小括 109
第4章 海洋生息魚の腸内細菌叢
目的 112
実験方法 113
結果 118
考察 131
小括 136
第5章 溯河魚の腸内細菌叢
目的 138
実験方法 140
結果 143
考察 152
小括 156
第6章 稚仔魚期における腸内細菌叢の形成
目的 160
実験材料および方法 161
結果 165

考　　察　181
小　　括　187
第7章　サケ科魚類の腸内細菌叢形成に関与する菌種選択能についての検討
目　　的　189
実験材料と方法　192
結　　果　199
考　　察　221
小　　括　229
総合考察　232
結　　論　248
謝　　辞　250
文　　献　252

緒　言

近年わが国の水産業は、遠洋漁業における漁場の国際的制約や沿岸漁業における資源の枯渇に伴う不振から、また食糧問題における蛋白資源としての魚類の重要性の再認識などから、従来の獲る漁業中心から作り育てる漁業へとその体質改善が強く要望されるに至り、鹹水域および淡水域における有用魚介類の栽培事業が急速な進展をみせてきている。なかでもわが国におけるサケ科魚類増養殖事業の歴史は古く、サケ・マス資源の増殖保護に果たしてきた意義はきわめて大きい。

元来自然環境における魚類は、自由に海洋を遊泳しあるいは清冽な河川に育ち、たえず適当な環境を求めて移動している。これに反し人工養殖における飼育魚は人為的に一定の枠内において効率的に飼育されるため、必然的に過密状態での生活が強制されるのみならず、餌料、水質およびその他の環境要因も自

然条件とは大きく異った条件下で飼育されることを余儀なくされる。このような不自然な条件は飼育魚の健康あるいは生理に対し重大な影響を及ぼすことが容易に推察される。特に近年効率的な養魚策が要求される一方、種卵、活魚の流通が殆んど無検疫のまま頻繁に行われるようになり、わが国はじめ各国の養殖事業における疾病被害は年々増加の傾向を示し、その経営に大きな障害を与えている。

魚類の疾病に関する研究は、古くからドイツを中心とする欧州において、また近年ではアメリカ、カナダその他において意欲的に進められているが、わが国においても近年養殖事業の進展と共に活発にこの方面の研究が展開されてきた。魚類の疾病のうち、特に微生物が関与する疾病としては、ウィルス性、細菌性および寄生虫性などの種々の疾病が知られているが、特に細菌性およびウィルス性の疾病に関する最近の研究成果は目ざましく、それらの治療、予防対策なども着々と確立さ

れつつある。

しかしながら、この分野における基礎研究としての健康魚における魚体各部位の正常菌叢や生息環境の微生物叢の実態に関する研究およびそれらと魚類生理との関連性などについては未だ明確でない点が多い。

通常動物体が外界と接する部位、すなわち体表、口腔、消化管などには、種々の微生物が常在するが、各部位においてそれぞれ比較的安定した微生物叢が形成されている。すなわち時と場所により環境の微生物の分布が異るにもかかわらず、動物体各部位にみられる微生物の種類や数はかなり安定している。

このように宿主の正常なある種の機構の関連性のもとに、宿主と共に生存している菌の集団を正常菌叢あるいは常在性菌群と呼称している[1~4]。この正常菌叢は、原則として生体が健康であるかぎり、宿主に病的状態をもたらすことなく、かつ宿主のもつ生来の防御機構によく抵抗して生存しうる多くの菌種から

構成されている。

医学，獣医学および水産学における細菌学で取り扱う菌は、偏性病原菌は例外として、多くはある条件下においてはじめて病原性を現わすいわゆる通性病原菌がその大部分であり、一部の偏性病原菌に起因する疾病を除けば、多くは通性病原菌による疾病、すなわち不適な環境要因、飼育管理上の失宜，あるいは常在菌叢との共力作用により二次的に惹起される疾病が多い。

したがって生息環境水およびそこに生息する魚類の正常菌叢ならびにその生菌数に関する研究は、単に魚病発生の予防対策上のみならず、魚類の生理および人工飼育管理に関連しきわめて重要である。

魚類に関する細菌学的研究は、古くから魚の保存、腐敗など水産食品としての衛生学的見地から関心がよせられ[5~16]、すでに1920年代にはいくつかの業績がみられるが[5,9,12,13]、一方魚類の正常菌叢に関する研究は比較的少く、

久しくとり残されてきた分野である。このことは水圏、特に地球表面の約2/3を占める広大な海洋の研究対象としての種々な困難性とこの分野の研究着層の薄いことが相俟って、海洋環境の微生物叢を構成する多彩な個々の微生物の分類・同定に関する研究あるいは培地・培養法に関する研究などが、他の分野に較べ著しく遅れ、この遅れが研究進展上における隘路となってきたことに起因していることは否定できない。しかし海洋微生物学の始祖とも称されるZoBELLの1930年代より現在に至る長年の海洋微生物に関する業績と共に、海洋環境から分離される細菌を比較的容易な方法で属あるいはそれに準ずる菌群に分類する方法を発表したSHEWAN一派の研究(1960)[17,18]が原動力となって、1960年以降水圏生物およびその環境水の微生物叢に対する関心が高揚され近年この分野の知見が著しく累積されて来た。いま、SHEWAN(1961)[19]の総説より引用した海産魚の微生物叢に関する研究結果をTable 1に、

Table 1. Aerobic bacterial flora of fresh fish expressed as percentage of total number of organisms isolated (by Shewan 1961[19])

Source and date	Species	Medium	Source of sample	*Pseudomonas*	*Achromobacter*	Coryneforms	*Flavobacter*	Micrococci (incl. *Sarcina*)	*Bacillus*	*Vibrio*	Miscellaneous	
Reed and Spence (1929)	Canadian haddock	Fish, peptone, sea-water agar at 25° C.	Slime	22.0	23.0	—	8.0	4.0	24.0	—	18.0	(*Proteus*)
			Intestines	8.7	4.4	—	5.6	1	5.7	—	70.0	(*Proteus*)
Thjøtta and Sømme (1938; 1943)	Norwegian cod	Fish-infusion broth + 2% agar.	Slime	5.0	48.0	—	25.0	14.0	—	—	8.0	
			Intestines	—	55.0	—	—	11.0	—	—	33.0	
Dyer (1947)	Canadian-Atlantic cod	Tap water at 20° C.	Slime	4.5	3.6	—	1.8	78.5	—	—	11.5	(Yeasts)
			Intestines	5.6	3.7	—	5.6	65.0	—	—	1.8	(*Proteus*)
											14.6	(Others)
Anderson (1947)	Canadian-Atlantic cod (*Gadus morrhua*)	Sea water	Slime	41.5	31.3	—	33.4	10.0	0	—	7.1	(*Proteus*)
											0.7	(*Serratia*)
Pivnick (1949)	Canadian-Atlantic cod (*Gadus morrhua*)	Sea water	(a) Slime	21.7	56.5	—	8.7	8.7	0	—	4.4	
			(b) Slime	6.9	45.8	—	43.1	1.4	0	—	2.8	
Fischer (1955)	Baltic cod	Fish agar at 22° C.	Intestines	9.3	65.0	—	4.7	17.0	—	—	3.0	(*Serratia*)
											1.0	(*Kurthia*)
Georgala (1958a)	N. Sea cod	Sea-water agar at 20° C.	Slime	44.0	32.4	8.7	6.0	1.1	—	3.9	1.9	
		Sea-water agar at 0° C.	Slime	51.5	41.3	1.0	1.5	0.7	—	3.3	0.7	
Aschehoug and Vesterhus (1943)	Norwegian winter herring	Fish agar and nutrient agar at 22° C.	Slime	40.0	24.5	—	17.7	16.7	—	—	1.1	
			Gills	47.0	33.4	—	13.7	3.9	—	—	3.0	
			Intestines	24.1	72.5	—	—	3.4	—	—	—	
Liston (1957)	N. Sea skate	Sea water	Slime	63.0	8.6	3.4	10.2	—	—	—	6.4	(*Alcaligenes*)
											6.4	(Others)
		Tap water	Slime	22.3	38.3	2.1	4.3	—	—	4.2	17.5	(*Alcaligenes*)
											11.3	(Others)
		Sea water	Gills	59.5	13.7	4.0	11.3	—	—	—	6.9	(*Alcaligenes*)
											4.6	(Others)
		Tap water	Gills	24.7	30.6	2.9	5.3	—	—	7.6	21.8	(*Alcaligenes*)
											7.1	(Others)
		Sea water	Intestines	26.7	12.2	1.6	4.9	—	—	48.0	2.4	(*Alcaligenes*)
											4.2	(Others)
		Tap water (combined isolates at 20° and 0° C.)	Intestines	10.9	3.0	3.0	1.8	—	—	74.0	3.0	(*Alcaligenes*)
											4.3	(Others)
Liston (1957)	N. Sea lemon sole	Salt water	Slime	57.0	16.7	—	9.5	—	—	—	9.5	(*Alcaligenes*)
											7.3	(Others)
		Tap water	Slime	20.2	30.9	1.6	9.1	—	—	5.3	22.3	(*Alcaligenes*)
											10.6	(Others)
		Salt water	Gills	62.0	14.5	—	11.1	—	—	1.1	10.0	(*Alcaligenes*)
											1.1	(Others)
		Tap water	Gills	31.8	31.8	1.2	3.5	—	—	9.4	16.5	(*Alcaligenes*)
											5.8	(Others)
		Salt water	Intestines	34.6	7.7	5.8	9.6	—	—	34.6	1.9	(*Alcaligenes*)
											5.8	(Others)
		Tap water (combined isolates at 20° and 0° C.)	Intestines	6.1	7.6	13.6	1.5	—	—	59.1	7.6	(*Alcaligenes*)
											4.5	(Others)
Cianelli (1956a)	Middle Adriatic hake (*Merluccius merluccius*)	Iced before sampling. 119 cultures isolated at 18-20° C.	Slime	6.7	21.0	—	16.0	29.4	4.2	—	5.9	(*Proteus*)
											4.2	(*Cafikya*)
											2.5	(*Escherichia*)
											10.9	(Others)
Georgala (1958b)	W. Coast S. African hake	Sea water at 20° C.	Slime	27.8	52.5	8.2	6.6	3.3	0	0	1.6	
	E. Coast S. African hake	Sea water at 20° C.	Slime	4.2	4.2	33.3	—	37.5	0	0	20.8	
Wood (1953)	Australian spp. teleosts and elasmobranchs	Not stated	Slime	16.0	0	12.0	0	60.0	8.0	—	4.0	
			Slime	11.0	0	61.0	0	17.0	2.0	—	9.0	
Venkataraman and Sreenivasan (1955a)	Indian Shark (*Carcharius* sp.)	Sea water	Slime	0.0	8.6	28.5	2.9	28.5	25.7	2.9	2.9	
Venkataraman and Sreenivasan (1952)	Indian Mackerel	Sea water	Slime	5.6	33.3	—	—	5.6	55.6	—	—	
			Gills	—	—	—	—	14.3	85.8	—	—	
			Intestines	—	33.3	—	—	—	33.3	—	33.3	
			Whole fish	—	11.5	—	8.0	54.0	19.0	—	7.5	

Table 2. Aerobic bacterial flora of some marine fish expressed as percentage of total number of organisms isolated

source and date	species	source of samples	Pseudomonas	Achromobacter	Coryneforms	Flavobacterium	Micrococcus	Vibrio	Bacillus	Entero-bacteriaceae	Others
Colwell (1962)[26]	dogfish, cod, English sole, Pacific hake, black rockfish	skin	44	18	8	9	7	3	1	5	5
		gill	45	17	4	7	8	10	0	2	7
		gut	48	18	1	2	5	14	5	3	4
		mouth	68	18	5	0	5	0	0	4	0
Okutani (1966)[28]	Japanese sea-bass	intestine	0	0	0	0	0	36	0	0	64
Aiso et al. (1968)[29]	jackmackerel	stomach	7	23	10	7	0	27	3	0	23
		intestine	2	0	0	0	0	98	0	0	0
Shimidu & Hasuo (1968)[30]	flat fish	intestine	6	0	0	0	0	94	0	0	0
Okuzumi & Horie (1969)[31]	frigate mackerel, dolphin, skipjack tuna, A sweetlip, A jack, yellowtail, mackerel, horse mackerel, threadfin bream	intestine	0	0	0	0	0	100	0	0	0
Newman et al. (1972)[35]	bluefish	intestine	22	18	0	2	0	28	0	0	30

また比較的近年に発表された海産魚の腸内細菌叢に関する研究結果をTable 2に示したが、1956年以前の報告における細菌の分類基準は、現在の基準と異っている点が多い。

以上の多くの研究結果[19.20]によれば、一般に魚類では体表、鰓および消化管においてそれぞれ 10^2～$10^6/cm^2$, 10^3～$10^6/g$ および 10^3～$10^9/g$ 程度の細菌が検出され、またこれら各部位における細菌の種類と量は季節、魚の健康状態、あるいは餌料生物の種類などによって異っている。すなわち体表、鰓などの菌叢はそれらの生息する環境水と密接な関係があり、主として水中に普遍的に分布する genus Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium (沿岸域ではVibrioも) などのグラム陰性の細菌群により構成されている。

一方消化管は魚種によりその発達や分化の程度が異り、その形態は温血動物に比較して一般に単純であるが、その構造や機能において、本質的には大きな差は認められず、腸管

内は一般微生物にとって外部環境とは異る特殊な環境である。したがって消化管、特に腸管内の細菌叢は、体表、鰓などの場合と異り生息環境水や摂餌物の菌叢の影響を受けながらも、温血動物の場合と同様に魚類には魚類固有の常在細菌群が存在するものと考えられる。

前述のごとく魚類の腸内細菌に関する研究は、古くから主として衛生学的な観点から行われており、REED and SPENCE (1929)[5], STEWART (1932)[6], GIBBONS (1934a)[7], DYER (1947)[8] らは魚の腐敗や食中毒に関連して、またHARRISON (1929)[9] GIBBONS (1934b)[10] は人畜由来の腸内細菌や病原菌による汚染に関連して、魚類の腸内細菌叢について調査を行っている。また腸内細菌の数量およびその来源に関するGILLEPSIE (1898)[11], OBST (1919)[12], HUNTER (1920)[13], BLAKE (1935)[14], MARGOLIS (1952, 1953)[15,16] などの報告によると、1950年頃までは温血動物にみられるような魚類固有の細菌叢の存在は認められておらず、魚類の

腸内細菌叢は専ら摂餌物と生息環境水の影響を反映してその細菌学的様相に左右されるとの説が一般に広く支持されていたようである。すなわちGILLEPSIE (1898)[11]は摂餌物を含れていない魚類の腸管内からは細菌が検出されないと報告し、OBST (1919)[12]は沿岸で捕獲された94尾のニシンの大部分において消化管内に摂餌物が認められなかったが、それらの81尾の消化管からは細菌が検出されなかったことを報告している。またHUNTER (1920)[13]は摂餌活動を行わない産卵期遡上中のサケの消化管内では摂餌物は認められず、胃および腸は無菌的状態であることを指摘し、同様にBLAKE (1935)[14]も接岸期のサケ・マスの22尾中の15尾において、胃および腸の双方もしくは一方において細菌が検出されなかったことを報告している。また絶食の影響に関連し、MARGOLIS (1953)[16]はカジカおよびマス類において、絶食後の腸内からは細菌が検出されないことを報告し、最近では及町、江草 (1971)[21]は養殖ウナギの腸内好

気性菌の動向を調査し、絶食後数日にして菌数は著しく減少し、増菌培養法の採用によっても検出不能例が多く、さらにその後においても無菌的状態が継続することを観察している。一方 MATTHEIS (1966a)[22] はマス類において絶食により腸内生菌数は減少するが、約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ことを観察している。

また腸内細菌叢に関しては、REED and SPENCE (1929)[5] は34尾のタラの調査において、分離菌株の70%は genus Proteus によって占められ、次いで genus Pseudomonas, Flavobacteria, Bacillus, Achromobacter などが検出されたと報告し、STEWART (1932)[6] は12尾のタラの腸内容物から46株を分離し、genus Achromobacter をその腸内細菌叢の主要構成員として報告している。さらに GIBBONS (1934a)[7] は北太西洋産の11種の海産魚43尾について調査を行い、その腸内細菌叢として genus Achromobacter, Micrococcus, Flavobacterium, Pseudomonas Bacillus を、また DYER (1947)[8] は同一海域のタラ

においてその細菌叢はMicrococcus, Bacillusが主体を成すことを報告している。さらにこれら好気性細菌叢に加え、REED and SPENCE (1929)[5]およびSHEWAN (1938)[23]は嫌気性菌の検索を行い、genus Clostridiumが腸管内から常に検出されることを指摘している。以上のごとく1950年代前半まではSHEWAN (1961)[19]の総説にみられるように、魚類の腸内細菌叢は季節、また生息域により異るとの見解が一般的に支持されていた。

その後、すなわち1950年代後半に至るとLISTON (1956, 1957)[24,25], COLWELL (1962)[26] SHRIVASTAVA and FLOODGATE (1966)[27], OKUTANI (1966)[28], AISO et al. (1968)[29]奥積・堀江 (1969)[31], 瀬良・木俣 (1972)[32]の報告にみられるように、海産魚類の腸内細菌叢は生息域や餌料生物の相違はあっても、体表や鰓の細菌叢、すなわちgenus Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacteriumなどを主体とする菌叢と異り、genus Vibrioが常に比較的高率に検出されることから、魚類においても固有の腸内細菌叢の存在する可能性が示唆されるようにな

ってきた。すなわちLISTON (1956, 1957)[24,25]は北海産のカレイ・ヒラメ類について魚体各部位の菌叢の季節的な変化を2年間に亘り観察し、体表および鰓ではgenus Pseudomonasおよび Achromobacterがその主体を成すに対し、腸管内ではgenus Vibrioが主要な構成員であることを報告している。なおGEORGALA (1958)[33]は体表・鰓腸管内の細菌数が、環境のプランクトンの量的条件に関連することを報告し、さらにRAE (1965)[34]は上記LISTONの報告と同種の魚の胃内容物量の季節的変化がLISTONの示した腸内の細菌数の変化に一致することを報告し、SHEWAN (1961)[19]も魚体表面の細菌数は環境との間に密接な関係を有し、腸内の細菌数は摂餌量に影響されることを報告している。

COLWELL (1962)[26]は北太平洋東岸において採捕したサメ・タラ・スズキなど5種70数尾の海産魚について体表・鰓・口腔・腸管内の細菌叢の調査を行った結果，何れの魚種においてもgenus Pseudomonasおよび Achromobacterが体表・鰓

口腔の細菌叢の主体を成すが、特に腸管内からはgenus Vibrioが他に較べ比較的高率に検出されたと報告し、SHRIVASTAVA and FLOODGATE (1966)[27]およびNEWMAN et al. (1972)[35]も北海および北大西洋で捕獲したコガレイおよびアジ類において、同様の観察結果を報告している。

またわが国沿岸魚について、AISO et al. (1968)[29]はアジの胃と腸管内の細菌叢は著しく異り、胃ではgenus Achromobacter, Sarcinaおよび Vibrioなどが混在するが、腸内はほとんどgenus Vibrioによって占められ、且つこれらのVibrioは胆汁添加培地において発育が認められることから、宿主側の菌種選択能の存在を推察している。また奥積・堀江(1969)[31]も9種10尾の海産魚について、同様にVibrioが腸内菌叢の主体を成すことを報告している。さらに奥谷ら(1964)[36] OKUTANI (1966)[28], 奥谷・来田(1968a,b)[37,38], 瀬良・木俣(1972)[32], SERA and ISHIDA (1972a,b)[39,40], SERA et al (1972)[41]は魚類における餌料の消化吸収に関する微生物の研究において異る餌料で飼育し

にマダイ，チダイおよびスズキの腸内細菌叢を観察し、餌料の相違にかかわらず腸内からは常にgenus Vibrioが優勢に検出され、しかもそれらは低pHおよび胆汁に抵抗性を持つことから宿主側の菌種選択能の存在を間接的に推察している。

一方淡水魚の腸内細菌叢に関する研究は、主として公衆衛生的な観点から行われ、GELDRICH and CLARKE (1966)[42]，小野ら (1973)[43]，STRASDINE and DUBETZ (1974)[44]，は病原菌あるいは腸内細菌科 (family Enterobacteriaceae) の細菌群による汚染の調査を行い、また腸内細菌と魚類生理との関連については、谷川・中村 (1938)[45]は食性との関連性を、柏田・手島 (1966a.b)[46.47]，手島・柏田 (1967.1969)[48.49]，KASHIWADA et al. (1970)[50]．はコイの腸内より分離された細菌群による種々のビタミンの産生能を、富山・大庭 (1967)[51]は金魚について、また橋本 (1953)[52]はコイについて成長との関連性を、さらにJANKOV (1968)[53]は病魚における腸内細菌叢について報告している。

しかしながら淡水魚の正常腸内細菌叢に関する報告はきわめて少なく、MATTHEIS (1966a.b.c.d)[54~56, 22]，鍾・郭 (1973)[57]，TRUST (1974, 1975)[58.59]，YOSHIMIZU and KIMURA (1976)[60] および著者ら (1976 a.b.d.e)[61~64] の報告がみられるにすぎない。すなわちMATTHEIS (1966a~d)[54~56.22] はマス類およびコイについて広範囲な研究を行い、これら44属より分離した219株について Bergey's Manual, 7ed. (1957)[65] に準拠して同定し、腸内細菌叢は genus Pseudomonas family Enterobacteriaceae，および genus Aeromonas の三者で全体の84%を占めることを報告している。

またTRUST (1974)[58] はカナダにおける17カ所の湖において捕獲した5種のサケ・マス類121尾について調査し、得られた665株の分類結果から genus Enterobacter，Aeromonas，Acinetobacter，Pseudomonas，を腸内細菌叢の主要な構成員であるとし、また翌年90尾の飼育されたサケについて得られた分離菌320株の分類結果より genus Bacillus，Aeromonas，Pseudomonas，Micrococcus，Acinetobacter などを腸内細菌叢の主要構成員と

して報告している[59]。

以上のような魚類の腸内細菌叢に関する研究は一般に魚類の生活史中のある一時期における断片的な研究がなされているにすぎず、生息環境，餌料等の関連性からみた腸内の菌数とその菌叢との生態学的関係については未だ必ずしも一致した見解は得られていない。特に淡水魚についての報告は少く、海産魚との比較および両者の腸内細菌叢の相違の原因など未だ不明な点が多い。

以上の観点から著者はわが国北方冷水域における重要な養殖魚であるサケ科魚類を対象に、その生活史を考慮に入れて、受精卵から稚魚に至る時期，淡水環境生活期、降海後の海水環境生活時期ならびに成熟産卵期の遡上期の一連の全生活史に亘り、各期の環境要因、天然餌料あるいは人工餌料等の関係を含めた生態学的観点から魚類の腸内細菌叢を観察しその実態の握把に勉めるとともに、腸内細菌叢形成の機構を解明しようと試みた。

すなわち本稿第1章においては淡水および海水飼育魚の腸内細菌叢を観察し、第2章においては淡水飼育魚を人為的に漸次海水に移行させることにより、第1章において認められた淡水および海水飼育魚の腸内細菌叢の差異を実験的に再確認する試みを行った。さらに第3章および第4章においては、自然環境の生息魚においても飼育魚と同様の結果が認められるか否かを観察するため、河川および湖沼生息魚ならびに海洋生息魚について調査を行った。そして第5章においては産卵期遡上魚および淡水中で成熟期に達した人工飼育魚を対象に、その腸内細菌叢の調査を行い、これまでに得られた知見をまとめて、サケ科魚類の生活史を通して観察した腸内細菌叢の変遷を生息環境との関連性から図示した。第6章においては卵から稚魚に至る過程を細菌学的に追求し、腸内細菌叢の形成時期を推察した。最後に第7章においては以上の各章における研究中に分離した多数の菌株から代表

菌株を抽出し、それらについて腸内細菌叢形成に関与すると推察される2,3の性状を検査すると共に、腸内細菌叢の主体をなす代表的な菌群に属す分離菌株について種の同定を行い、以て宿主の菌種選択能の存在を推論した。茲に以上の結果をまとめて報告する。

第1章 飼育魚の腸内細菌叢

目 的

動物の腸内細菌叢は動物が生活する環境に存在する種々の細菌に対する動物本来の菌種選択能と選択された細菌の腸内定着性により種属特異的菌叢が決定されるところから、陸上動物の生活環境とは全く異る水圏に生息する魚類の腸内細菌叢は他の陸上動物の菌叢をもって類推することはできない[66~70]。緒言で述べたごとく、淡水魚における腸内細菌叢は genus Aeromonas, family Enterobacteriaceae, および genus Pseudomonas, また海産魚においては一般に genus Vibrio がその主体を成すとする報告が多い。これに反し魚類の正常腸内細菌叢の存在を否定する研究者も少なくなく、魚類の腸内細菌叢については陸上哺乳動物の場合と異り不明の点が多い。

また魚類の細菌性疾病においては一部の偏

性病原菌によるものを除き、多くは通性病原菌によるものであり、不適な環境要因や飼育管理上の失宜のみならず、常在菌叢との共力作用により二次的に惹起される疾病が多い。

さらに最近においては病魚に対する種々の化学療法剤や抗生物質の乱用による薬剤耐性菌の出現およびその耐性因子(R-因子)の他菌種への伝達、人畜共通病原菌の存在ならびに消化器系伝染病原菌や糞便系細菌による水その他への汚染などが公衆衛生上問題視されている[71~73]。

以上のような観点から魚類，特に飼育魚における腸内常在細菌叢の実態を明らかにすることは、魚類の生理あるいは病理に関連して水産増養殖上の重要課題であるのみならず、公衆衛生上においてもきわめて重要である。

本章では、まず飼育魚の飼育環境水とその腸内容物中の生菌数およびそれらの細菌叢の実態を把握することを目的に、北海道立水産孵化場森支場(以下森支場と略称)および同

水産孵化場忍路湾飼育場における飼育環境水ならびに両場で淡水あるいは海水で飼育中の健康な2種のサケ科魚類（サクラマス；Oncorhynchus masou およびマスノスケ；Oncorhynchus tschawytscha）を対象として、下記のような細菌学的観察を行った。

実験材料および方法

1. 飼育環境水

Fig. 1に示す森支場において1971年7月から1972年6月までの約1ヵ年間に前後8回に亘り飼育用水路の2点（AおよびB点）および3飼育池（8・9・10号池）から計5点の淡水試料、また1971年10月忍路湾飼育場において湾口（C点）および湾内生簀の外側と内側（DおよびE点）の3点ならびに1975年5月同飼育場のD点における海水試料を、それぞれ滅菌フラスコあるいは丁亥式細菌検査用採水器[74]を用いて無菌的に採水・氷蔵して研究

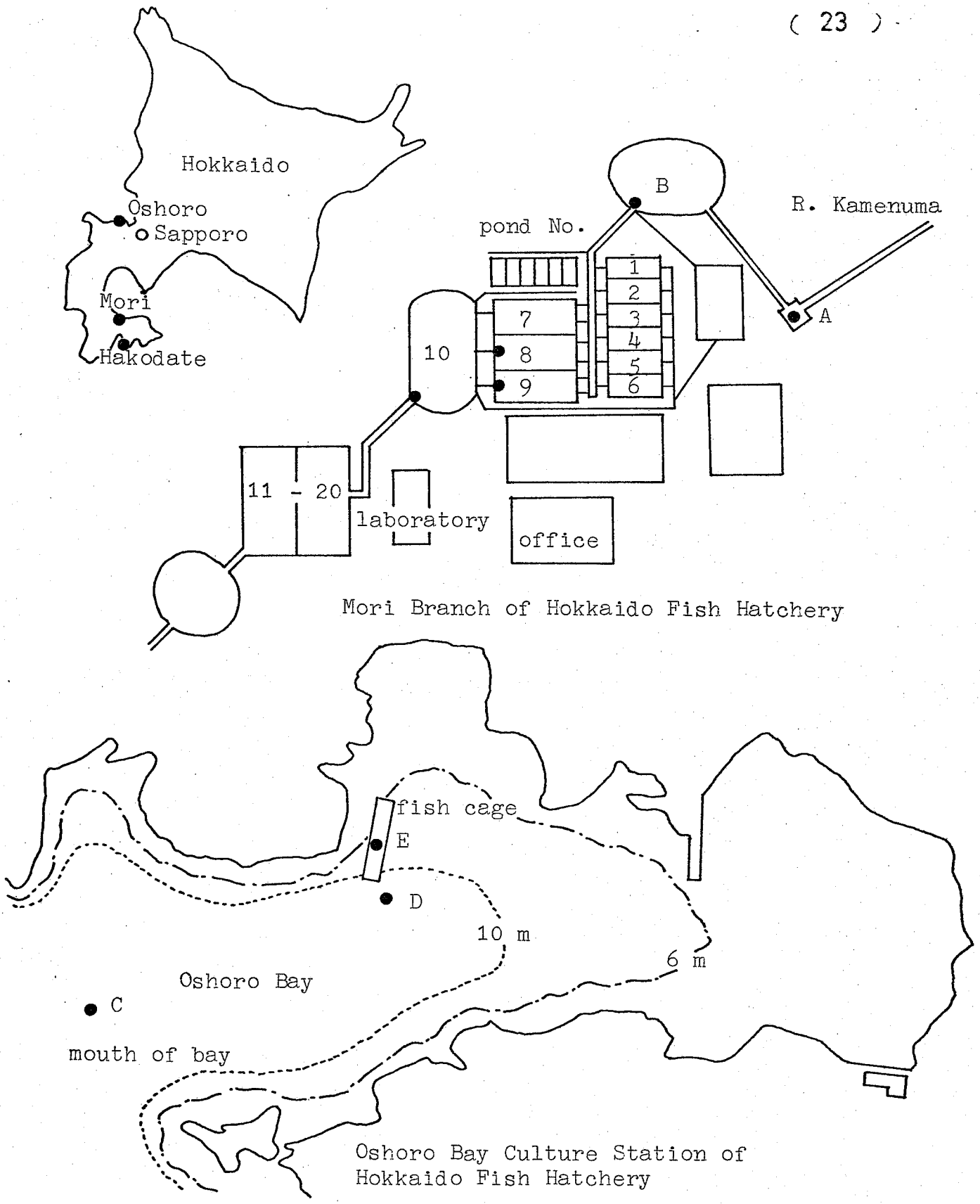


Fig. 1. Sampling station at the Mori Branch and the Oshoro Bay Culture Station of Hokkaido Fish Hatchery.

室に持ち帰り、直ちに実験に供した。なお運搬に要した時間は前者が約1時間、後者は約4時間であった。

2. 供試魚

森支場において1971年7月から1972年7月までの間に計7回、淡水中で飼育中の健康なサクラマス1年魚（平均体長19.6 cm，平均体重97.5 g）およびマスノスケ1年魚（平均体長16.3 cm，平均体重46.0 g）計27尾、および1971年10月当年度森支場から忍路湾飼育場に移殖され、湾内の生簀中で飼育中のマスノスケ2年魚（平均体長38.4 cm，平均体重997.0 g）5尾ならびに1975年5月と1976年6月の2回共に同年春に道立水産孵化場千歳試験池から忍路湾飼育場に移殖され、同じく湾内の生簀中で飼育中のマスノスケ当才魚（平均体長6.7 cm，平均体重12.7 g）各5尾を採捕後即殺・氷蔵して研究室に持ち帰り直ちに実験に供した。

3. 基礎培地および培養条件

予め2,3の試料について実施した供試培地・培養温度・培養時間等の培養条件の検討結果を参考にして、Table 3に示す淡水培地と海水培地を供試し、好気的条件下で25℃、5日間の培養を行った。なお1975年および1976年の試料については20℃・5日間の培養を行った。

4. 生菌数の測定および菌株の分離

腸内容物は本研究の初期（1971年12月迄）においては魚体表面、特に腹部総排泄口周囲をアルコールで消毒後、腹部を圧して排泄口より採取したが、以後は体表面を同様に消毒後開腹し幽門部末端から排泄口の手前1cmの部位までの腸管を摘出して、その内容物を無菌的に採取した。供試腸内容物および飼育環境水のうち、淡水由来および淡水試料は生理的食塩水，海水由来および海水試料はHERBSTの処方[75]による人工海水を用いて、それぞれ10進希釈法による希釈液列を作成し、各希釈液0.2mlを平板培地面に塗抹し、25℃・5日間（1975年および1976年の試料は20℃・5日間）

Table 3. Composition of the medium used

	FWA *1 (g)	SWA *2 (g)
Polypepton (Daigo)	5.0	5.0
Beef extract (Kyokuto)	2.5	2.5
Yeast extract (Daigo)	2.5	2.5
K_2HPO_4	0.2	0.2
$MgSO_4$	0.05	-
Glucose	1.0	1.0
NaCl	5.0	-
Agar (Kyokuto)	15.0	15.0
distilled water	1000 ml	250 ml
artificial sea water*3	-	750 ml
Adjusted to pH	7.5	7.8

cf. *1: fresh water agar, *2: sea water agar,
*3: Herbst's artificial sea water (composition g/100 ml : NaCl 3.0, KCl 0.07, $MgSO_4$ 0.26, $MgCl_2$ 0.05, $CaSO_4$ 0.1)

培養後、発生集落数を常法により計数し、腸内容物では湿重量1g当り、水試料では1ml当りの生菌数で示した。菌株の分離は各検体の最適希釈平板の一定面積中の全集落(約30個宛)を釣菌し、純培養を繰返して分離菌株を得た。

5. 分離菌株の分類

分離菌株は下記の各種性状検査を行い、Fig. 2に示すSHEWAN et al.の方法[18]に準拠してgenusレベルの分類を行った。

6. 形態学的性状検査

菌株の由来により、淡水あるいは海水培地で25℃あるいは20℃・24～48時間培養した菌体について、常法通り菌形およびグラム染色性(HUCKERの変法[76])，運動性(懸滴標本法)，鞭毛の数およびその付着部位(西沢・菅原法[76])を観察した。

7. 生化学的性状検査

前記同様の培養菌体を供試し、グルコースの酸化・醗酵試験について淡水由来株はTable4

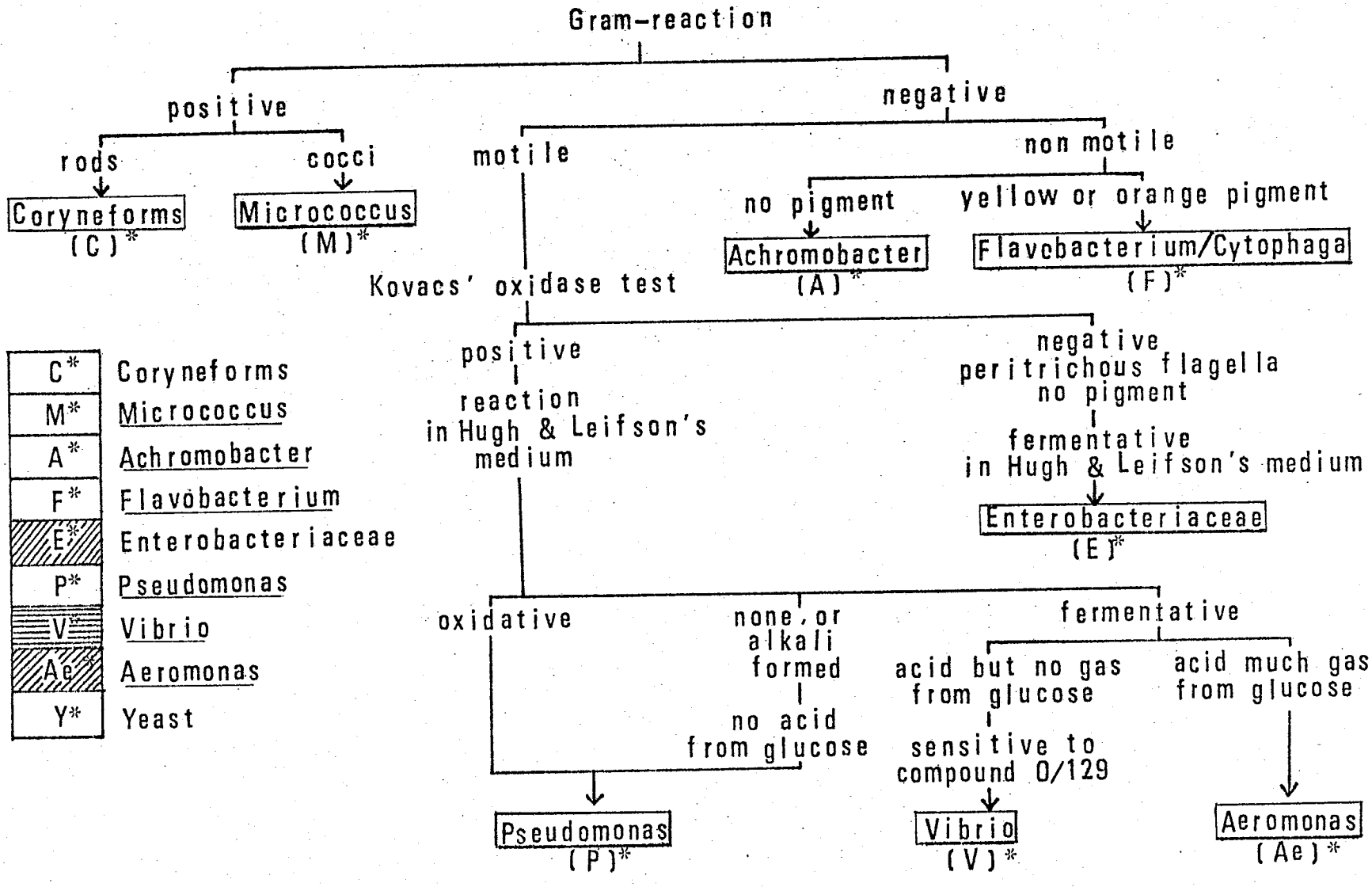


Fig. 2. An outline of the sequence of tests used in the screening of isolates.
(by Shewan, J.M., G.Hobbs, and W.Hodgkiss, 1960)
cf. * : these abbreviations were used in following figure

に示すHUGH and LEIFSONのOF培地[77]，海水由来株はTable 5に示すLEIFSONのMOF培地[78]を用い．またチトクローム オキシダーゼ活性はKOVACSの方法[79]により観察した。またVibrioの検索にはvibrio static compound 0/129感受性試験を行った。

結　　果

1．生菌数

(1)．飼育環境水中の生菌数

森支場の飼育用水、飼育池水および忍路湾飼育場の海水中の生菌数を採水年月日．水温．水深，気温と共にTable 6　およびTable 7に示した。

森支場の飼育用水および飼育池水の生菌数はTable 6に示すごとく、1971年7月から1972年6月に至る周年、10^3/ml（淡水培地）のオーダーでほとんど季節的な変動は認められず、また1971年10月および1975年5月における忍路湾飼育場の生菌数もTable 7にみられるよう

Table 4. Composition of the OF medium (Difco)

	(g)
Bacto tryptose	2.0
NaCl	5.0
K_2HPO_4	0.3
Bacto brom thymol blue	0.08
Bacto agar	2.0
Glucose	10.0 ml
distilled water	1000 ml
Adjusted to pH 7.2	

Table 5. Composition of the MOF medium by Leifson

	(g)
Casiton (Difco)	1.0
Yeast extract (Daigo)	0.1
$(NH_4)_2SO_4$	0.5
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	0.5
Phenol red (0.1 %)	10 ml
Glucose	5.0
Agar (Kyokuto)	3.0
HCl (pH 7.5)	
Adjusted to pH 7.5	

Table 6. Viable microbial counts in the fresh water of the Mori Branch of Hokkaido Fish Hatchery

sampling date	atmos.temp.*1 (min)~(max) (°C) (°C)	position	water temp. (°C)	viable counts/ml (FWA)*2	(SWA)*3
9.July'71	18.1 ~ 24.1	A	12.7	5.2×10^3	1.4×10^3
		B	13.0	4.4×10^3	8.0×10^2
		p-8*4	13.5	3.8×10^3	7.5×10^2
		p-9	13.6	4.6×10^3	4.0×10^2
		p-10	13.6	5.7×10^3	8.5×10^2
3.Sep.'71	12.9 ~ 23.8	A	13.5	3.6×10^3	8.7×10^2
		B	13.8	4.1×10^3	3.1×10^2
		p-8	15.6	2.0×10^3	3.0×10^2
		p-9	14.5	3.9×10^3	1.3×10^2
		p-10	15.0	-	-
10.Nov.'71	1.4 ~ 10.3	A	9.2	4.8×10^3	4.2×10^2
		B	10.7	3.2×10^3	2.7×10^2
		p-8	9.8	4.8×10^3	4.2×10^2
		p-9	10.8	4.4×10^3	2.2×10^2
		p-10	10.6	9.7×10^3	2.5×10^2
9.Dec.'71	-3.4 ~ 1.4	A	7.8	3.9×10^3	1.9×10^2
		B	9.5	2.4×10^3	1.4×10^2
		p-8	8.0	4.2×10^3	7.0×10^2
		p-9	9.7	4.3×10^3	3.8×10^1
		p-10	9.2	3.2×10^3	3.5×10^1
26.Jan.'72	-8.7 ~ 0.8	A	6.2	6.6×10^3	6.4×10^2
		B	8.6	4.0×10^3	3.4×10^2
		p-8	6.4	8.5×10^3	1.7×10^2
		p-9	8.6	2.2×10^3	2.2×10^2
		p-10	7.5	2.7×10^3	1.9×10^2
17.Apr.'72	-3.1 ~ 17.8	A	11.7	3.4×10^3	-
		B	11.4	4.0×10^3	-
18.May '72	10.0 ~ 17.1	A	11.9	5.1×10^3	-
		B	13.0	4.9×10^3	-
22.June'72	15.0 ~ 19.1	A	12.9	4.6×10^3	-
		B	13.3	5.5×10^3	-

cf. *1: atmospheric temperature, *2: fresh water agar,
*2: sea water agar, *4: pond No. see Fig. 1.

Table 7. Viable microbial counts in the sea water of the Oshoro Bay Culture Station

sampling date	sampling station*1	depth (m)	water temp. (°C)	viable counts/ml (FWA)*2	(SWA)*3
30.Oct.'71	C	0	14.1	2.4×10^3	9.6×10^3
		15	14.6	1.0×10^2	4.1×10^2
	D	0	14.2	8.9×10^2	1.5×10^3
		9	15.2	1.0×10^2	3.0×10^3
	E	0	14.2	9.0×10^2	2.0×10^3
		5	14.8	7.3×10^2	1.6×10^3
28.May '75	D	0	15.3	-	1.9×10^3

cf. *1: see Fig. 1. *2: fresh water agar
*3: sea water agar

に、ほぼ 10^3/ml（海水培地）のオーダーであった。また淡水試料の海水培地，海水試料の淡水培地における生菌数は何れの場合も上述の生菌数よりも少く算出された。

(2). 飼育魚の腸内生菌数

森支場および忍路湾飼育場の飼育魚の腸内容物中の生菌数を採捕年月日，魚種，体重，体長と共にTable 8およびTable 9に示した。

Table 8にみられるように、淡水（森支場）飼育魚の腸内容物中の生菌数は、10^4～10^7/g（淡水培地）の範囲内でかなりの個体差がみられ、季節的変動も明確でなかった。また海水（忍路湾飼育場）飼育魚の場合もTable 9に示すごとく、10^4～10^6/g（海水培地）の範囲内でかなりの個体差がみられた。

2. 細菌叢

飼育環境水および飼育魚の腸内容物中から、前述の方法で分離した1,609株より継代不能株を除く1,361株について、Fig. 2に示すSHEWAN et al.[18]の方法に準拠してgenusレベルの分類を行い，

Table 8. Viable microbial counts in the intestinal contents of salmon reared in the Mori Branch of Hokkaido Fish Hatchery

fish No.	sampling date	fish species	body length (cm)	body weight (g)	viable counts/g. (FWA)*1	(SWA)*2
1	16.July'71	O.m.*3	15.0	29.5	1.4×10^5	5.4×10^3
2			18.8	61.0	-	2.2×10^3
3	3.Sep.'71	O.m.	21.0	103.7	3.6×10^5	1.1×10^4
4			21.0	96.6	8.4×10^4	4.0×10^3
5	13.Oct.'71	O.t.*4	13.5	38.3	1.9×10^4	5.9×10^3
6			16.5	46.1	6.8×10^7	4.4×10^7
7			15.0	30.0	3.4×10^6	6.2×10^6
8			19.0	62.4	1.2×10^4	-
9			17.5	53.4	1.8×10^7	5.8×10^6
10	17.Apr.'72	O.m.	18.0	68.1	9.3×10^4	-
11			18.5	84.1	1.4×10^5	-
12			18.9	71.3	2.3×10^4	-
13			18.0	71.3	1.2×10^4	-
14			19.0	99.0	6.3×10^4	-
15	18.May '72	O.m.	21.5	140.0	1.5×10^7	-
16			21.0	132.0	6.8×10^6	-
17			24.0	187.0	4.8×10^4	-
18			20.0	101.0	1.9×10^5	-
19			21.5	142.0	1.6×10^5	-
20			21.0	100.0	8.0×10^6	-
21	22.June'72	O.m.	24.0	200.0	1.5×10^6	-
22			25.5	215.0	1.1×10^5	-
23	7.July'72	O.m.	15.0	39.0	5.5×10^5	-
24			16.5	50.0	3.4×10^6	-
25			18.0	58.0	1.0×10^6	-
26			18.5	58.0	3.3×10^7	-
27			15.5	38.0	7.4×10^4	-

cf. *1: fresh water agar, *2: sea water agar,
*3: Oncorhynchus masou, *4: Oncorhynchus tschawytscha

Table 9. Viable microbial counts in the intestinal contents of king salmon reared in the Oshoro Bay Culture Station

fish No.	sampling date	body length (cm)	body weight (g)	viable counts/g. (FWA)*1	(SWA)*2
28	30.Oct.'71	35.0	885	2.8×10^3	3.5×10^5
29		39.5	865	3.3×10^3	2.6×10^4
30		44.0	1300	6.4×10^3	8.7×10^3
31		38.5	1150	3.0×10^2	4.0×10^3
32		35.0	785	2.3×10^3	9.4×10^5
33	28.May '75	2.0	5.5	-	1.2×10^4
34		1.8	5.5	-	1.6×10^5
35		1.9	5.5	-	9.3×10^4
36		1.6	5.5	-	1.2×10^5
37		1.7	5.5	-	3.3×10^5
38	23.June'76	9.0	8.9	-	3.6×10^3
39		8.8	6.4	-	1.6×10^4
40		11.3	14.3	-	1.6×10^3
41		14.6	30.1	-	9.3×10^4
42		13.8	30.0	-	2.5×10^6

cf. *1: fresh water agar, *2: sea water agar

その結果を分離菌株数に対する各genusの出現率で表わし、Table 10 ～ Table 15 に示した。

(1). 飼育環境水の菌叢

森支場における飼育用水の菌叢は、Table 10 にみられるように周年 genus Flavobacterium/Cytophaga, Pseudomonas, および genus Achromobacter がその主体をなし、また季節的には冬季間においては Pseudomonas の割合が増加し、Aeromonas は全く、また Enterobacteriaceae もほとんど検出されなかった。

一方飼育池水の菌叢は Table 11 に示すごとくその主体は飼育用水とほぼ同様であるが、Aeromonas の占める割合が比較的高く、冬季間でも分離菌株中に Aeromonas および Enterobacteriaceae に属す菌株が若干検出された。

次に忍路湾飼育場の海水の菌叢は、Table 12 にみられるように、Achromobacter, Flavobacterium/Cytophaga および Pseudomonas がその主体をなすことは上記森支場の飼育用水の場合と同様であるが、淡水由来株中には全く見出されなかった Vibrio に

Table 10. Generic distribution of microorganisms isolated from the channel water of the Mori Branch of Hokkaido Fish Hatchery*

sampling date	place*1		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Vibrio	Aeromonas	Yeast	Number of the isolates
9.July'71	A	%	0	14	3	35	10	17	0	21	0	29
	B		5	13	24	20	7	14	0	16	2	68
3.Sep.'71	A	%	17	7	7	31	17	17	0	4	0	29
	B		4	0	14	28	32	11	0	7	0	28
9.Dec.'71	A	%	6	6	6	44	13	25	0	0	0	16
	B		7	7	7	36	0	43	0	0	0	14
26.Jan.'72	A	%	0	11	35	18	0	36	0	0	0	28
17.Apr.'72	A	%	5	0	26	37	0	11	0	16	0	19
average (in the total isolates) channel water		%	5	9	18	28	11	19	0	10	0	231

cf. * : isolated from FWA (fresh water agar) medium
*1: see Fig. 1.

Table 11. Generic distribution of microorganisms isolated from the pond water of the Mori Branch of Hokkaido Fish Hatchery

place	sampling date	position *1		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Vibrio	Aeromonas	Yeast	Number of the isolates
Mori*2	9.July'71	p-8	%	8	8	38	8	19	15	0	4	0	26
		p-9		4	0	16	12	4	28	0	36	0	25
		p-10		6	13	13	39	3	10	0	16	0	31
	3.Sep.'71	p-8	%	4	0	12	54	11	0	0	19	0	26
		p-9		0	8	16	36	20	0	0	20	0	25
	9.Dec.'71	p-10	%	0	0	24	28	14	29	0	5	0	21
average (in the total isolates) Mori (pond water)			%	4	6	18	30	12	13	0	17	0	154

cf. *1: see Fig. 1.
*2: isolated from FWA (fresh water agar) medium

Table 12. Generic distribution of microorganisms isolated from the sea water of the Oshoro Bay Culture Station*

sampling date	station *1		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Vibrio	Aeromonas	Yeast	Number of the isolates
30.Oct.'71	C	%	0	26	26	21	0	26	0	0	0	19
	E		17	4	30	13	22	9	4	0	0	23
28.May '75	D	%	0	0	40	10	0	45	5	0	0	20
average (in the total isolates)		%	6	10	32	15	8	26	3	0	0	62

cf. *1: see Fig.1.
* : isolated from the SWA (sea water agar) medium

属する菌株が若干検出された。

(2). 飼育魚の腸内菌叢

森支場飼育魚（淡水飼育魚）の腸内容物由来株の分類結果はTable 13に示すごとくで、腸内菌叢は前述の飼育環境水とは趣きを異にし、環境水において主体を占めたAchromobacter，Flavobacterium/Cytophaga，およびPseudomonasはほとんど検出されず、周年Aeromonasおよびそ Enterobacteriaceaeがその主体を成していた。

一方忍路湾飼育場における飼育魚の腸内容物由来株の分類結果は、Table 14に示すごとく1971年，1975年および1976年の供試魚ともにVibrioがその主体を成し、この場合も飼育環境水の菌叢とは明らかに異り、また淡水飼育魚と海水飼育魚の間にきわめて特徴的な菌叢の相違が観察された。

以上の各検体別の分類結果を総括するとTable 15に示すごとくで、飼育魚の腸内菌叢は淡水飼育魚ではAeromonasおよびEnterobacteriaceae、海水飼育魚ではVibrioがその主体をなし、そ

Table 13. Generic distribution of microorganisms isolated from the intestinal contents of salmon reared in the Mori Branch of Hokkaido Fish Hatchery*

fish No.*1	sampling date		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Vibrio	Aeromonas	Yeast	Number of the isolates
1	16.July'71	%	0	0	4	0	0	0	0	96	0	28
2			0	8	0	0	0	0	0	92	0	13
3	3.Sep.'71	%	0	0	0	0	22	0	0	78	0	30
4			0	0	10	0	0	0	0	90	0	27
5	13.Oct.'71	%	4	83	0	4	0	0	0	5	4	23
6			0	0	11	0	89	0	0	0	0	27
7			19	7	8	0	35	0	0	32	0	26
8			0	3	0	0	0	0	0	97	0	22
9			0	5	0	0	63	0	0	32	0	30
10	17.Apr.'72	%	7	24	14	3	3	0	0	49	0	29
11			0	0	7	0	4	0	0	89	0	27
14			0	33	27	0	0	0	0	40	0	30
15	18.May '72	%	0	0	0	0	0	0	0	100	0	30
18			3	0	3	0	0	0	0	94	0	30
19			0	0	18	0	0	0	0	82	0	27
23	7.July'72	%	0	0	0	0	37	0	0	63	0	30
24			0	0	0	0	83	0	0	17	0	30
average (in the total isolates)		%	2	9	6	1	19	0	0	62	1	459

cf. *1: see Table 8.
* : isolated from FWA (fresh water agar) medium

Table 14. Generic distribution of microorganisms isolated from the intestinal contents of king salmon reared in the Oshoro Bay Culture Station*

fish No. *1	sampling date		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Vibrio	Aeromonas	Yeast	Number of the isolates
28	30.Oct.'71	%	0	0	0	0	0	0	100	0	0	11
29			0	17	10	0	0	0	73	0	0	29
30			0	0	0	0	0	0	100	0	0	25
35	28.May '75	%	0	5	5	0	0	15	75	0	0	20
36			0	0	0	0	0	0	100	0	0	20
37			0	0	0	0	0	0	100	0	0	20
39	23.June'75	%	0	0	5	0	0	14	81	0	0	21
41			0	0	15	0	0	0	85	0	0	20
42			0	0	19	0	0	0	81	0	0	21
average (in the total isolates)		%	0	3	6	0	0	3	88	0	0	187

cf. *1: see table 9.
* : isolated from SWA (sea water agar) medium

Table 15. Generic distribution of microorganisms isolated from the waters and the intestinal contents of salmon

place	Mori						Oshoro			
sample	channel water		pond water		intestinal contents		sea water		intestinal contents	
medium	FWA*1	SWA*2	FWA	SWA	FWA	SWA	FWA	SWA	FWA	SWA
Micrococcus	5	7	4	2	2	1	21	6	7	0
Coryneforms	9	21	5	22	9	47	10	10	26	3
Achromobacter	18	16	19	17	6	3	32	32	23	6
Flavobacterium/Cytophaga	28	9	30	15	1	1	15	15	3	0
Enterobacteriaceae	11	30	12	34	19	47	0	8	16	0
Pseudomonas	19	11	13	6	0	1	22	26	21	3
Vibrio	0	0	0	0	0	0	0	3	0	88
Aeromonas	10	6	17	3	62	0	0	0	1	0
Yeast	0	0	0	1	1	0	0	0	3	0
Number of the isolates	231	127	154	65	459	102	28	62	88	187

cf. *1: fresh water agar, *2: sea water agar

れぞれの飼育環境水の菌叢において主体をなす Achromobacter, Flavobacterium / Cytophaga, および Pseudomonas とは全く異る様相を示した。

考　　察

以上の観察における供試魚は、人為的管理の条件下で飼育されたもので、天然におけるサケ科魚類の腸内細菌について全般的な様相は推察し得ないが、得られた結果を考察すると次の通りである。

魚類の腸内容物中には通常 10^4〜10^8/g 程度のかなり多数の細菌が存在することが知られているが[12,70]、本研究の供試魚においても、淡水飼育魚ならびに海水飼育魚のいずれの場合もほぼ同程度の菌数が測定された（Table 8 および Table 9）。また淡水飼育魚では海水培地より淡水培地において常に高い生菌数が計数され、一方海水飼育魚の場合はその逆の結果が得られ、飼育環境水の相違が腸内容物中の細菌の生態

に明らかに反映していることが推察された。

腸内容物の菌叢は、森支場（淡水）の飼育魚ではAeromonas および Enterobacteriaceae で全体の81%，忍路湾飼育場（海水）の飼育魚では前年度森支場より移殖され海水飼育中のマスノスケおよび千歳試験池より移殖され、1～2ヵ月海水飼育後のマスノスケの双方においてVibrio が88%とその主体を占め、その結果はそれぞれの飼育環境水の菌叢 Achromobacter，Flavobacterium/Cytophaga，Pseudomonas などとは明らかに異り、また淡水魚と海産魚の腸内菌叢に明確な相違のあることが観察された(Table 15)。

以上の結果は Aeromonas，Enterobacter，Pseudomonas Bacillus，Acinetobacter などを淡水魚の腸内菌叢の主要構成員と考える MATTHEIS (1966)[54~56, 22]，鍾・郭(1973)[57]，TRUST (1974, 1975)[58, 59]の報告を肯定するような結果であり、また海産魚については Vibrio をその優勢種と考える LISTON (1957)[25]，AISO et al. (1968)[29]，SHIMIDU and HASUO (1968)[30]，金子ら(1969)[80]，金子 (1970, 1971 a·b·c)[81~84]，瀬良・木

俣(1972)[32] の報告や、生息環境の菌叢と比較して高率にVibrio が検出されるとするCOLWELL (1962)[26], SHRIVASTAVA and FLOODGATE (1966)[27], NEWMAN et al. (1972)[35] などの報告と一致する結果である。

小　　括

北海道立水産孵化場森支場および忍路湾飼育場における飼育環境水および飼育魚の腸内容物について生菌数とその菌叢の観察を行い次のごとき結果を得た。

1. 森支場（淡水）および忍路湾飼育場（海水）の飼育環境水の生菌数は約10^3/ml 程度で、年間を通じて観察した前者における結果では季節的変動が認められず、周年ほぼ一定であった。

2. 飼育魚の腸内容物中の生菌数は10^3～10^7/gの範囲でかなりの個体差が認められ、季節的にも特定の傾向は認められなかった。

3. 飼育環境水の菌叢は、淡水、湾内海水共に Flavobacterium / Cytophaga, Achromobacter, Pseudomonas がその主体を占めた。

4. 飼育魚の腸内容物中の菌叢は、飼育環境水のそれに比較し、その構成は単純で、特に淡水飼育魚では Aeromonas および Enterobacteriaceae, 海水飼育魚では Vibrio がその主体をなすことが知られた。

第2章　人為的海水移行および飼止め飼育の腸内細菌叢におよぼす影響

目　　的

前章で淡水中で飼育中のサクラマス（Oncorhynchus masou）およびマスノスケ（Oncorhynchus tschawytscha）ならびに海水中で飼育中のマスノスケの腸内細菌叢を調査した結果、前者では genus Aeromonas および family Enterobacteriaceae，後者では genus Vibrio がそれぞれ腸内細菌叢の主体を成すことを明らかにしたが[61]、この結果は genus Achromobacter，Flavobacterium / Cytophaga，Pseudomonas などを主体とする飼育環境水の菌叢とは全く異った所見である[60,61]。

本章ではこのような淡水飼育魚と海水飼育魚における腸内細菌叢の相違が如何なる理由によるものかを実験的に確かめる目的で、飼育水（淡水）を漸次人為的に海水で置換しながら最終的に海水で飼育した銀化サクラマスの

非給餌群と給餌群について、飼育水が腸内菌叢におよぼす影響を観察すると共に、その結果を終始淡水中で飼止め飼育した群と対比して飼止めの影響を併せて観察した。また消化管の菌種選択能に関連し、給餌飼育魚の腸内容物、飼育用水および餌料から分離した菌株について低pH値および胆汁に対する抵抗性を検討すると共に、これらの分離菌株の来源を推察する意味で日高(1964, 1965)[85,86]およびHIDAKA and SAKAI (1968)[87]の方法によって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海洋(M)型，好塩(H)型および陸(T)型の型別を行ったので、以上の結果について述べる。

実験方法

1. 供試魚

1972年7月および同年10月、Fig.3に示す森支場で飼育中の銀化サクラマス計117尾を道立栽培漁業センター(茅部郡鹿部村、以下栽

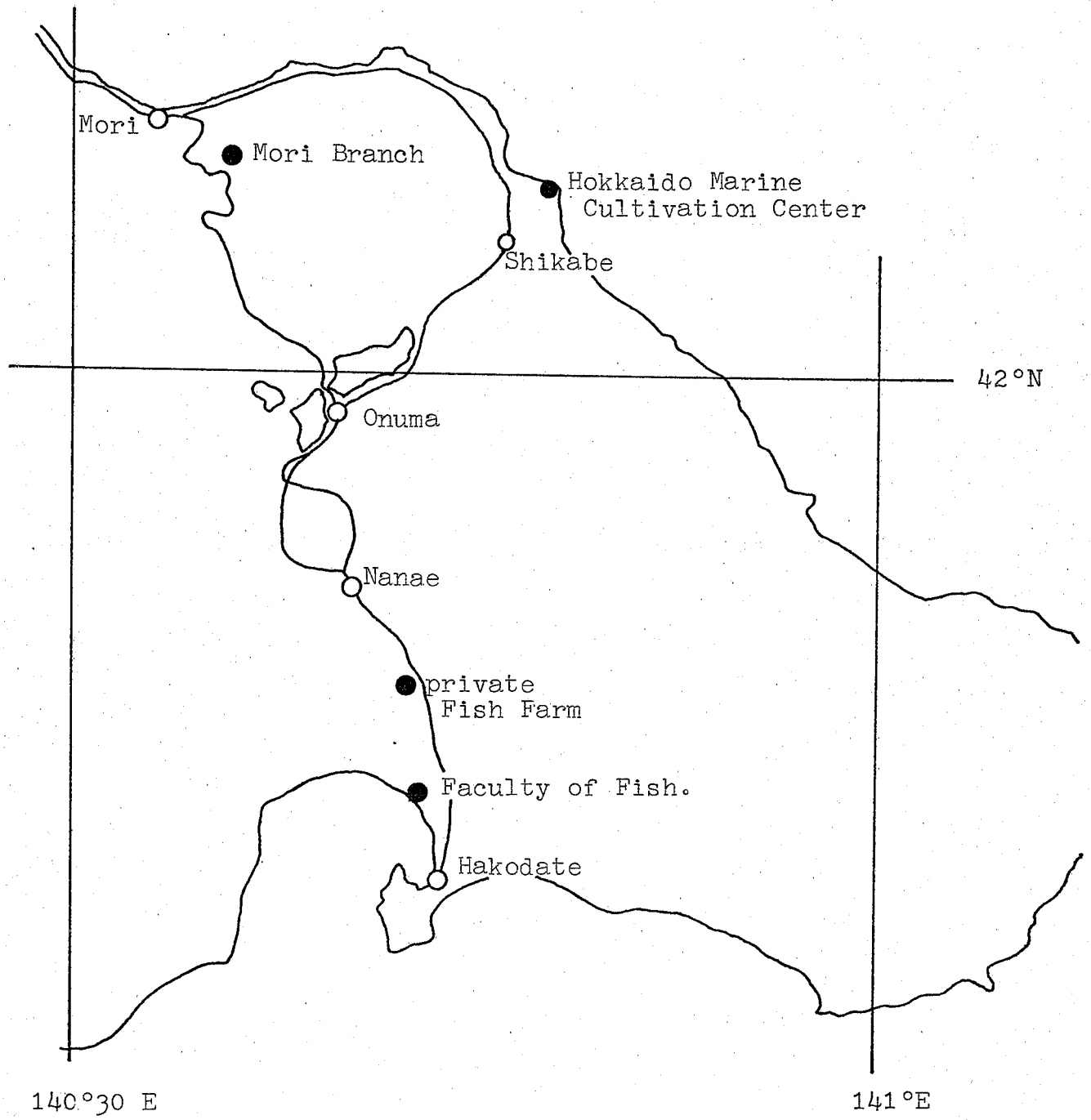


Fig. 3. Geographic location of the Mori Branch of Hokkaido Fish Hatchery, the Hokkaido Marine Cultivation Center and the private fish farm.

培センター」と略称）の15℃培養室中のFRP製1ton水槽2基に移して海水移行実験に供試し、また1973年7月、森支場の銀化サクラマス38尾を、函館市近郊七飯町内の民営養魚場に移して15℃の湧水中で飼育し、淡水中における飼育実験に供試した。

2. 飼育方法

Table 16に示す供試魚をFig.4にみられるように4群に分け、下記の方法で飼育した。

第1群：給餌せず飼育水の海水の割合を0%から漸次高めて10日後に100%海水となるようにし、以後の9日間は給餌しながら飼育した。

第2群：給餌しながら漸次海水の割合を高め12日後に100%海水とし、その後さらに14日間給餌飼育した。

第3群：第2群の100%海水への移行完了後、その一部について給餌せず14日間飼育した。

第4群：淡水中で20日間給餌せず飼育した。

Table 16. Fish used for the experiment

group	rearing: place	rearing: date	species of fish	Number of fish	B.L.*1 cm (average)	B.W.*2 g (average)
1	H.M.C.C.*3	June-July'72	masu salmon (O.masou)	64	17.5	59.0
2	〃	Oct.-Nov.'72	〃	43	20.3	107.3
3	〃	Nov.'72	〃	10	21.0	106.2
4	P.F.F.*4	June'73	〃	38	15.0	41.7

cf. *1: body length of fish, *2: body weight of fish
*3: Hokkaido Marine Cultivation Center
*4: private fish farm

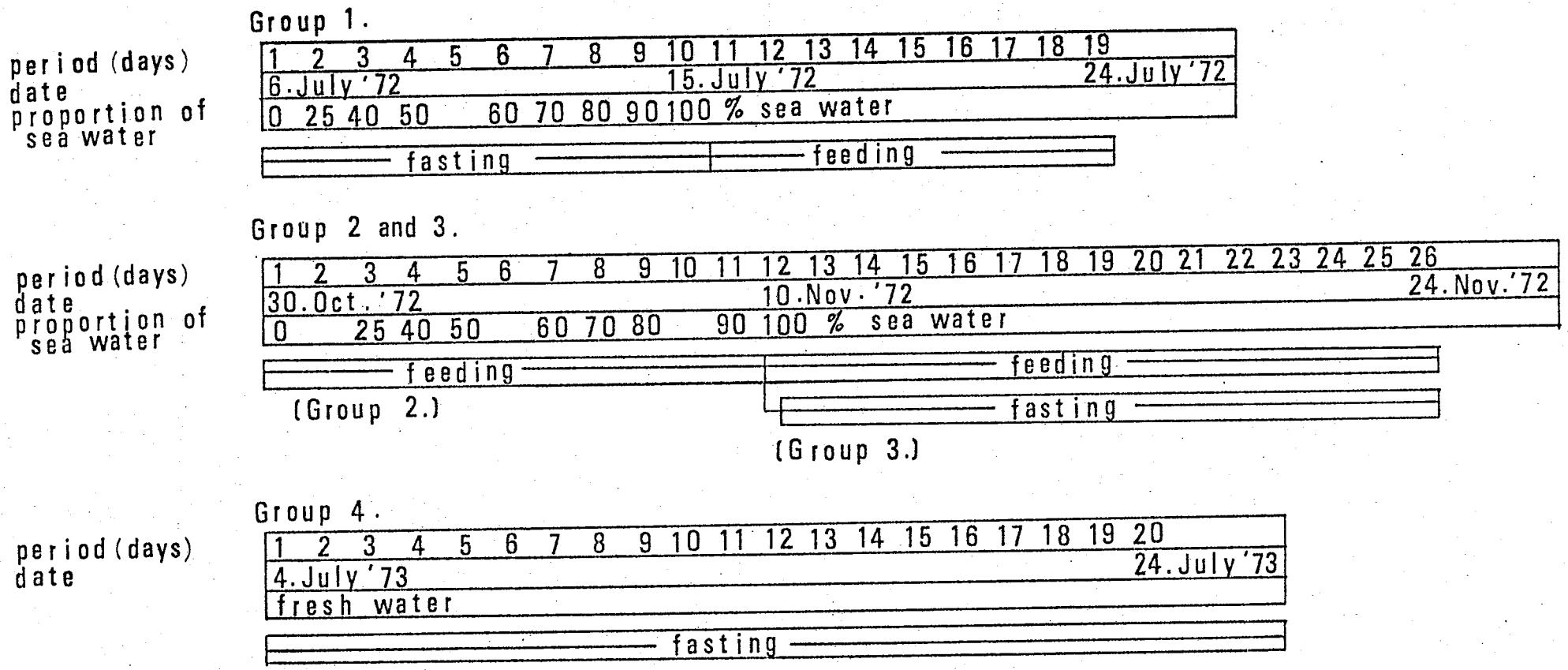


Fig. 4. Rearing condition at each stage in the artificially transplanting period from fresh water into sea water, and in fresh water without being fed.

3. 培養材料

腸内容物：第1群，第2群および第3群は飼育水の海水割合が、0，25，50，70，100%の各時点および実験最終日に．第4群は実験開始後0，1，4，7，10，14および20日目において、それぞれ各群5尾宛総計94尾の腸内容物を下記の方法で採取した。

飼育用水：栽培センターでは1972年7月および10月の実験期間中に前後5回に亘り飼育用淡水および海水を、また民営養魚場では1973年7月の実験期間中に2回飼育用湧水を、それぞれ滅菌フラスコを用いて採水した。

餌料：飼育魚の給餌に用いた冷凍オキアミ類（Neomysis sp.）を1972年7月および同年12月の2回無菌的に採取し、それぞれ滅菌した乳鉢で摩砕後培養に供した。

4. 腸内容物の採取法

前章と同様の方法によったが．腸管内に内容物がほとんど認められなかった供試魚については腸管内の粘質物を採取した。また1972

年7月の供試魚のうち、腸管内にほとんど粘質物も認められないものについては同様の部位の腸管の両端を結紮し、これに注射器で飼育水の海水割合に応じて希釈した滅菌海水0.5 mlを注入し、数回腸管内に出入させて洗浄液を採取した。

5. 生菌数測定法と分離菌株の分類法

前章において記載した方法と同様である。なお培養材料の希釈液は、飼育水中の海水割合が25%までの試料については滅菌生理的食塩水、50%および75%の場合は1/2濃度、100%海水時の場合は全濃度のHERBSTの処方[75]による滅菌人工海水を用い、培地はTable 3に示した基礎培地と同一組成の淡水培地、1/2濃度海水培地および3/4濃度海水培地を併用した。また生菌数は腸内容物あるいは粘質物および餌料については1g当り、また飼育用水および腸内洗浄液については1ml当りの生菌数として算出した。

6. 分離菌株の低pHおよび胆汁に対する抵抗

性

第2群の供試魚の腸内容物、飼育用水および餌料からの分離菌株のそれぞれより、genus別に無作為に抽出した代表菌株計53株について、pH 5.0, 5.5および6.0に調製した基礎培地の組成から寒天を除いた液体培地、および基礎培地（pH 7.2～7.5）に胆汁末（極東）を0.5, 1.0, 2.5, 5.0および10.0%の割合に添加した平板培地で、25℃・5日間培養を行い、それぞれの発育状態を観察した。

7. 分離菌株の発育に対する海水中の主要無機塩要求性に基づく型別

第2群の供試魚の腸内容物、飼育用海水および餌料からの分離菌株のそれぞれより、genus別に無作為に抽出した代表菌株計116株について、日高およびHIDAKA and SAKAIの方法[85~87]に準拠して海洋型，好塩型，陸型の型別を行った。

結　　果

1. 飼育用水および餌料中の生菌数

Fig. 4 に示した各群の実験期間中に採取した飼育用水および餌料の生菌数を Table 17 に示した。すなわち栽培センターで採取した飼育用淡水および海水ならびに民営養魚場の飼育用湧水の生菌数は少ない場合で 10^2/ml, 多い場合には 10^5/ml, 多くは 10^3/ml 程度であり、また餌料の生菌数は 10^5 ~ 10^6/g 程度であった。

2. 飼育魚の腸内生菌数

海水移行過程および餌止め飼育中の各段階における飼育魚の腸内生菌数の推移を Table 18 ~ Table 20 に示した。第1群では Table 18 にみられるように非給餌飼育の経過と共に淡水培地および海水培地による生菌数が共に減少する傾向を示し、特に海水割合が 70% ~ 100% の時点では上記の培養条件で菌数の測定が不能な個体が増加した。しかし例数は少いがこのような供試魚も海水移行完了後の給餌飼育で再び生菌数の増加する傾向がみられた。第2群（給餌群）においては、Table 19 に示すごとく

Table 17. Viable microbial counts in the waters and in the diets

sample	sampling date	water temp.	medium	viable counts
Group 1				
fresh water (a)	6.July'72	14.7	F*1	2.0 x 10^5/ml
sea water (a)	15.	14.5	S*2	1.1 x 10^3 "
sea water (b)	24.	14.8	S	1.8 x 10^3 "
fresh water (b)	24.	14.8	F	1.7 x 10^2 "
diet (Neomysis sp.)	24.July'72	-	S	1.0 x 10^5 /g
Group 2 and 3				
fresh water (c)	2.Nov.'72	12.3	F	4.8 x 10^4/ml
sea water (c)	24.	11.6	S	3.1 x 10^2 "
sea water (d)	24.	12.0	S	9.5 x 10^3 "
fresh water (d)	24.	11.9	F	9.2 x 10^3 "
diet (Neomysis sp.)	15.Dec.'72	-	S	1.2 x 10^6 /g
Group 4				
fresh water (e)	14.June'73	15.5	F	1.2 x 10^4/ml
fresh water (e)	17.	16.2	F	6.3 x 10^3 "

cf. *1: fresh water agar,
*2: three quater strength sea water agar

Table 18. Viable microbial counts in the intestinal contents or slime of smolt masu salmon in the artificially transplanting period from fresh water into sea water (Group 1)

fish No.	sampling date	proportion of sea water (%)	body length (cm)	body weight (g)	viable counts/intestinal contents or slime (FWA)*1	(SWA)*2
fasting						
1	7.July'72	0	15.0	39.0	5.5×10^5	-
2			16.5	50.0	3.4×10^6	-
3			18.0	58.0	1.0×10^7	-
4			18.5	58.0	3.3×10^7	-
5			15.5	38.0	7.2×10^4	-
6	8.July'72	25	17.0	55.0	N*3	N
7			16.5	48.0	6.0×10^5	6.2×10^5
8			21.5	90.0	N	N
9			19.5	85.0	7.8×10^3	1.5×10^3
10			20.0	70.0	1.2×10^5	1.0×10^5
11	11.July'72	50	20.5	98.0	4.3×10^3	2.9×10^3
12			18.9	65.0	2.9×10^7	1.1×10^7
13			18.5	58.0	N	N
14			16.5	51.0	1.0×10^4	1.7×10^4
15			17.5	50.0	2.0×10^3	2.3×10^3
16	13.July'72	70	18.0	56.0	N	N
17			19.5	79.0	4.5×10^3	N
18			19.0	76.0	2.0×10^5	N
19			16.5	40.0	1.5×10^3	N
20			-	-	N	N
21	16.July'72	100	18.0	63.0	N	N
22			17.0	49.0	N	N
23			17.5	51.0	4.0×10^2	3.9×10^3
24			19.0	67.0	N	N
25			19.0	61.0	1.9×10^3	4.7×10^3
feeding						
26	24.July'72	100	19.0	80.0	2.4×10^5	2.7×10^4
27			18.5	55.0	N	N
28			17.5	53.0	N	N
29			18.5	70.0	N	N
30			17.5	56.0	7.5×10^3	1.2×10^4

cf. *1: fresh water agar, *2: sea water agar
*3: negative result

Table 19. Viable microbial counts in the intestinal contents or slime of smolt masu salmon in the artificially transplanting period from fresh water into sea water (Group 2 and 3)

fish No.	sampling date	proportion of sea water (%)	body length (cm)	body weight (g)	viable counts/intestinal contents or slime (FWA)*1	(1/2 SWA)*2	(SWA)*3
feeding							
31	2.Nov.'72	0	15.0	50.0	LA*	LA	-
32			22.0	128.0	1.9×10^5	1.1×10^5	-
33			21.5	105.0	5.0×10^2	1.4×10^7	-
34			23.5	130.0	7.6×10^3	2.0×10^3	-
35			21.5	107.0	2.1×10^5	-	-
36	3.Nov.'72	25	19.0	94.0	3.0×10^2	6.6×10^2	-
37			21.5	128.0	5.0×10^2	1.1×10^3	-
38			20.5	104.0	2.8×10^5	3.2×10^5	-
39			19.5	90.0	3.4×10^3	4.2×10^3	-
40			22.5	122.0	2.0×10^3	8.0×10^2	-
41	6.Nov.'72	50	21.5	114.0	5.5×10^2	1.6×10^3	-
42			19.0	96.0	1.6×10^3	2.2×10^4	-
43			21.5	115.0	1.2×10^5	3.7×10^4	-
44			22.5	136.0	3.8×10^5	8.9×10^4	-
45			18.5	95.0	N*4	N	-
46	8.Nov.'72	70	20.0	92.0	-	3.0×10^2	N
47			19.0	100.0	-	1.6×10^5	1.3×10^5
48			21.0	96.0	-	1.8×10^3	1.1×10^3
49			20.0	86.0	-	1.9×10^5	2.5×10^5
50			22.5	114.0	-	N	N
51	24.Nov.'72	100	16.5	91.5	-	1.2×10^5	2.3×10^4
52			18.5	121.5	-	1.6×10^5	2.0×10^3
53			19.0	134.0	-	1.3×10^6	5.7×10^5
54			17.0	105.0	-	5.4×10^4	1.4×10^4
55			19.0	70.0	-	2.6×10^4	1.1×10^4
fasting							
56	24.Nov.'72	100	20.5	90.0	-	N	N
57			21.5	111.0	-	5.6×10^3	6.1×10^3
58			21.0	106.0	-	N	N
59			18.5	80.0	-	N	N
60			23.5	144.0	-	1.3×10^2	N

cf. *1: fresh water agar, *2: half strength sea water agar,
*3: three quater strength sea water agar,
*4: negative result
* : laboratory accident

個体差は認められるが生菌数の減少傾向は認められず．海水移行過程を通じほぼ一定に経過し．また海水移行完了後海水中で餌止め飼育した第3群では第2群に較べ著しい生菌数の減少が認められた。また対照の終始淡水中で餌止め飼育した第4群においてはTable 20に示すごとく経日的に生菌数の漸減傾向が認められたが．第1群に較べその傾向は著明でなかった。以上の結果を図示するとFig. 5に示すごとくである。

3．細菌叢

供試魚の腸内容物（あるいは腸内粘質物），飼育用水および餌料より分離した1,559株中から継代不能株を除く1,427株について．前章同様SHEWAN et al.の方法[18]に準拠してgenusレベルの分類を行った。その結果を分離菌株数に対する各genusの出現率で表わすとTable 21～Table 24に示すとおりである。

飼育用水ではTable 21に示すごとく淡水，海水ともにPseudomonasおよびAchromobacterがその

Table 20. Effect of the fasting on viable microbial counts in the intestinal contents or slime of smolt masu salmon reared in fresh water without being fed (Group 4)

fish No.	duration of fasting	sampling date	body length (cm)	body weight (g)	sex	viable counts/g intestinal cont.or slime*1
61	0	4.June'73	14.2	25.0	f*2	1.3×10^5
62			14.5	26.0	f	-
63			15.5	40.0	f	1.9×10^7
64			13.5	38.0	m*3	1.6×10^3
65			16.5	70.0	m	2.4×10^4
66	1	5.June'73	16.0	45.0	f	6.5×10^6
67			17.0	46.0	f	1.2×10^6
68			15.5	47.0	f	5.7×10^5
69			14.5	31.5	f	1.0×10^7
70	4	8.June'73	14.5	39.5	f	1.2×10^4
71			16.0	54.0	f	1.1×10^4
72			15.5	35.0	f	1.3×10^6
73			14.5	35.0	f	3.1×10^3
74			15.0	39.5	f	5.0×10^3
75	7	11.June'73	15.0	40.0	f	N*4
76			15.5	48.5	f	N
77			13.5	39.5	m	N
78			15.0	48.0	f	3.6×10^7
79			16.5	60.0	f	4.4×10^6
80	10	14.June'73	15.5	37.0	f	1.0×10^7
81			16.0	47.5	f	4.0×10^2
82			15.0	43.5	f	1.0×10^7
83			12.0	33.0	m	5.6×10^3
84			16.0	53.5	f	N
85	14	18.June'73	15.0	32.0	f	N
86			15.5	38.5	f	N
87			15.5	44.5	f	5.0×10^4
88			13.5	33.5	m	1.4×10^3
89			17.5	46.0	f	1.5×10^5
90	20	24.June'73	15.0	44.5	f	N
91			15.5	48.0	f	N
92			13.5	35.0	f	4.4×10^3
93			13.5	43.5	m	1.9×10^3
94			12.5	32.0	m	N

cf. *1: intestinal contents or slime
*2: female, *3: male, *4:negative result

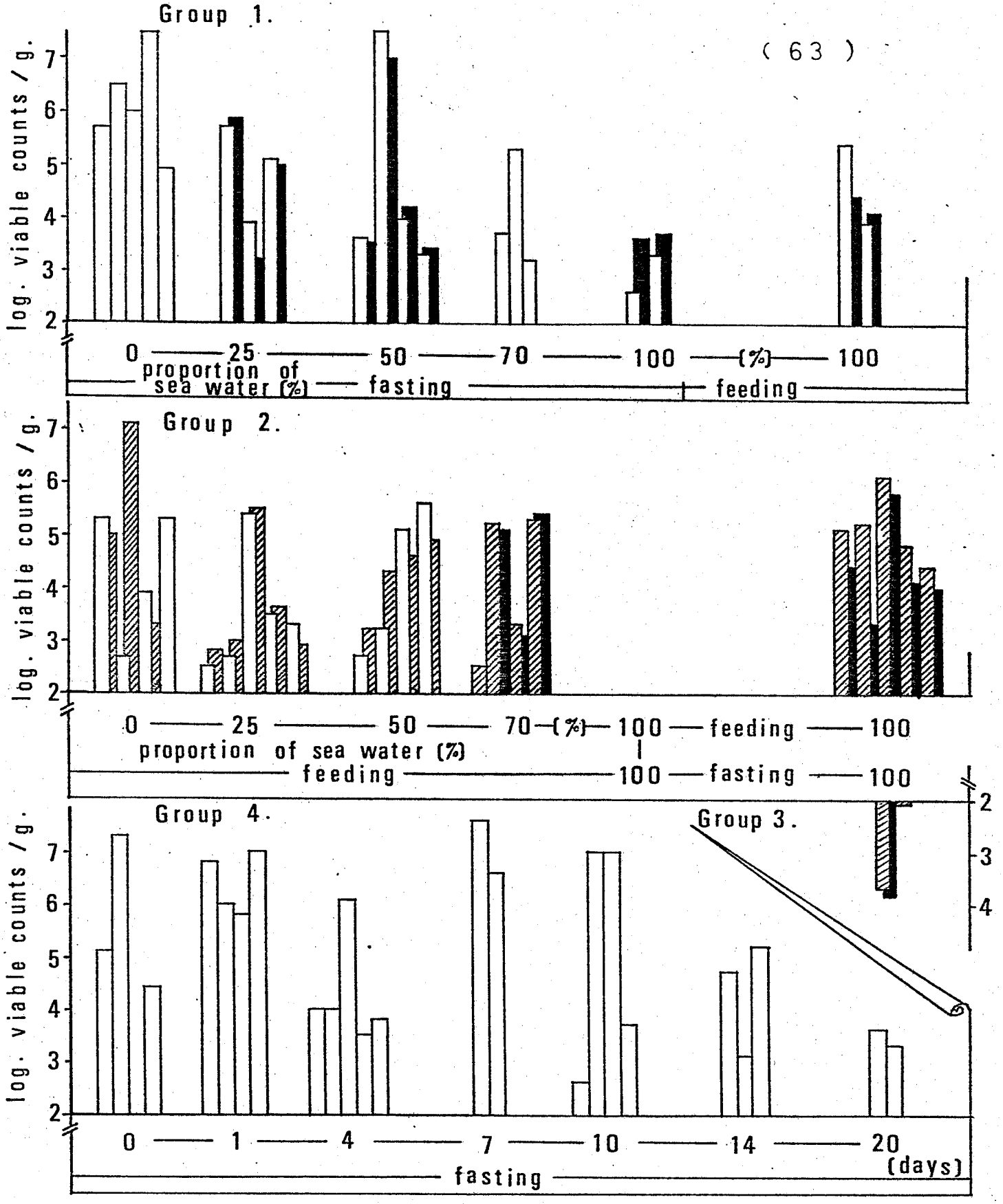


Fig. 5. Viable microbial ccunts in the intestinal contents or slime of smolt masu salmon in the artificially transplanting period from fresh water into sea water and in fresh water without being fed.

cf. ▭ : viable counts on fresh water agar medium,
▨ : on half strength sea water agar medium,
■ : on three quater strength sea water agar medium

Table 21. Generic distribution of microorganisms isolated from the waters and the diets

sample*1	sampling date	medium		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Vibrio	Aeromonas	Yeast	Number of the isolates
Group 1													
fresh water (b)	24.July'72	F*2	%	0	0	5	0	0	95	0	0	0	20
sea water (b)	24.	S*3		0	0	47	0	0	53	0	0	0	17
diet(Neomysis sp.)	24.July'72	S		83	13	0	0	0	0	0	0	4	30
Group 2 and 3													
fresh water (d)	24.Nov.'72	F	%	9	0	0	5	0	86	0	0	0	21
sea water (c)	24.	S		0	0	20	0	0	68	12	0	0	25
sea water (d)	24.	S		0	0	37	0	0	73	0	0	0	30
diet(Neomysis sp.)	15.Dec.'72	S		90	10	0	0	0	0	0	0	0	30
Group 4													
fresh water (f)	17.June'73	F	%	8	15	35	23	0	19	0	0	0	26

cf. *1: see Table 17., *2: fresh water agar,
*3: three quater strength sea water agar

主体を占め、さらに海水ではVibrioが若干検出された。また餌料ではgenus Micrococcus, Coryneformsなどのグラム陽性菌が菌叢を構成していた。

第1群においてはFig.5に示したように飼育水の海水割合の増加と非給餌飼育の経過と共に、腸内生菌数が急激に減少したが、その菌叢はTable 22にみられるごとく実験開始時にその主体を占めていたAeromonasおよびEntero--bacteriaceaeが漸次減少する傾向を示し、これらに代ってPseudomonas, Micrococcus, Achromobacter, CoryneformsおよびYeastなどが出現して一時複雑な様相を示したが、その後徐々に出現菌種が単純化する傾向が認められた。しかし海水移行完了後の給餌飼育により、Table 21に示した餌料の菌叢において、その主体を成したグラム陽性のMicrococcus, Coryneforms およびYeastの他に、飼育用水中に検出されるPseudomonas, Achromobacter, Vibrioなどから成る複雑な菌叢を示すに至った。

Table 22. Generic distribution of microorganisms isolated from the intestinal contents or slime of smolt masu salmon in the artificially transplanting period from fresh water into sea water

fish No.	sampling date	proportion of sea water	medium		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Vibrio	Aeromonas	Yeast	Number of the isolates
fasting (Group 1)*1														
1	7.July'72	0%	F*2	%	0	0	0	0	37	0	0	63	0	30
2					0	0	0	0	83	0	0	17	0	30
3					0	0	0	0	0	5	0	95	0	22
6	8.July'72	25%	F	%	0	50	0	0	0	50	0	0	0	2
7					0	0	0	0	4	96	0	0	0	30
8					60	0	20	0	0	0	0	20	0	5
9					0	0	0	0	0	16	0	84	0	19
12	11.July'72	50%	F	%	0	0	0	0	0	0	0	100	0	29
14		1/2	S*3		37	11	0	0	0	4	0	0	48	27
15			F		4	21	8	0	0	4	0	0	63	24
18	13.July'72	70%	F	%	0	0	0	0	0	0	0	0	100	27
19					0	0	0	0	4	0	0	0	96	26
23	16.July'72	100%	S*4	%	0	0	0	0	0	0	0	0	100	28
25					0	0	0	0	0	100	0	0	0	30
feeding (Group 1)*1														
26	24.July'72	100%	S	%	0	5	0	0	0	0	0	0	95	20
30			F.S		68	11	6	0	6	5	4	0	0	59

cf. *1: see Table 18., *2: fresh water agar
*3: half strength sea water agar,
*4: three quater strength sea water agar

第2群ではTable 23にみられるごとく、実験開始時にAeromonasが主体を成すことは第1群の場合と同様であったが飼育水中の海水割合が25%の時点で急激にPseudomonasの占める割合が大きくなり、引きつづき海水割合の上昇と共にVibrioが徐々にこれに代り、海水移行完了時にはVibrioが菌叢の主体を占めるに至った。また第3群もFig. 5にみられるごとく、海水移行完了後の非給餌により著明な生菌数の減少が認められたが、菌叢はTable 23に示すごとく第2群と同様にVibrioがその主体を成した。

淡水中で終始餌止め飼育した第4群は、Fig. 5にみられるごとく、腸内生菌数は経日的に漸減したが、その菌叢はTable 24にみられるように、餌止め10日後までは一般的にAeromonasがその主体を占め、14日後に至り体力の消耗と共にこれに代ってCorynetormsが主体を成す個体がみられるようになった。なお以上の第1群から第4群までの腸内菌叢の推移をFig. 6

Table 23. Generic distribution of microorganisms isolated from the intestinal contents or slime of smolt masu salmon in the artificially transplanting period from fresh water into sea water

fish No.	sampling date	proportion of sea water	medium		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Vibrio	Aeromonas	Yeast	Number of the isolates
feeding (Group 2)*1														
32	1.Nov.'72	0%	F*2	%	3	0	7	0	0	20	0	70	0	30
34			F		17	28	38	0	0	0	0	17	0	29
35			F		0	0	3	0	13	17	0	67	0	30
36	2.Nov.'72	25%	1/2 S*3	%	0	17	0	0	0	83	0	0	0	6
37			1/2 S		0	17	0	0	0	67	16	0	0	6
38			F		0	0	0	0	0	89	11	0	0	27
39			1/2 S		0	0	0	0	0	94	6	0	0	18
42	5.Nov.'72	50%	1/2 S	%	0	0	5	0	0	37	58	0	0	19
43			1/2 S		0	0	0	0	0	37	63	0	0	30
46	7.Nov.'72	70%	1/2 S	%	0	0	0	0	0	10	90	0	0	30
47			S*4		3	0	3	0	0	17	73	0	0	30
48			1/2 S		0	0	12	0	0	0	88	0	0	8
49			1/2 S		0	0	0	0	0	17	83	0	0	30
52	24.Nov.'72	100%	S	%	0	0	3	0	0	0	97	0	0	30
53			S		0	0	3	0	0	0	97	0	0	30
54			S		0	0	0	0	0	0	100	0	0	30
fasting (Group 3)*5														
57	24.Nov.'72	100%	S	%	0	0	0	0	0	0	100	0	0	19

cf. *1: see Table 19., *2~*4: see Table 22., *5: see Table 19.

Table 24. Generic distribution of microorganisms isolated from the intestinal contents or slime of smolt masu salmon reared in fresh water without being fed

fish No.	sampling date	duration of fasting (days)		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Vibrio	Aeromonas	Yeast	Number of the isolates
fasting (Group 4)*1													
61	4.July'73	0	%	0	7	20	0	0	14	0	59	0	29
62				0	0	0	0	0	0	0	100	0	30
64				15	10	5	0	0	15	0	55	0	20
65	5.July'73	1	%	0	0	0	0	0	0	0	100	0	30
66				0	0	0	0	0	0	0	100	0	30
69	8.July'73	4	%	9	55	0	0	0	9	0	27	0	11
70				0	0	0	0	0	0	0	100	0	30
71				0	0	0	0	0	0	0	100	0	30
74	11.July'73	7	%	40	40	20	0	0	0	0	0	0	5
75				0	0	0	0	0	40	0	60	0	25
78				0	0	0	0	0	0	0	100	0	30
79	14.July'73	10	%	0	0	0	0	0	0	0	100	0	30
80				0	13	0	0	0	0	0	0	87	8
81				0	0	0	0	0	0	0	100	0	22
82				0	10	90	0	0	0	0	0	0	30
84	18.July'73	14	%	0	100	0	0	0	0	0	0	0	2
86				0	75	20	0	0	0	0	0	5	20
87				0	100	0	0	0	0	0	0	0	7
88				0	0	0	0	0	0	0	100	0	30

cf. *1: see Table 20.

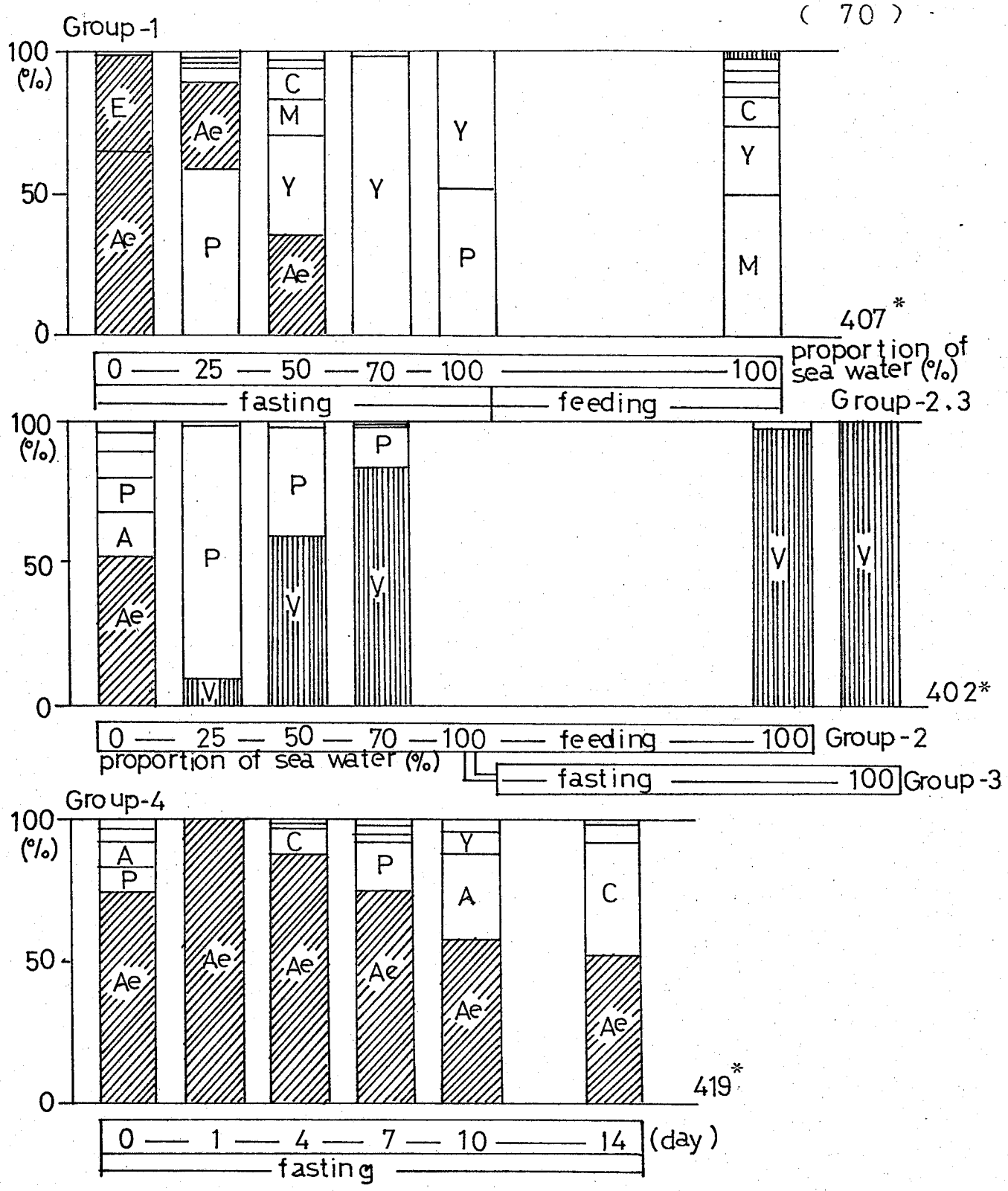


Fig. 6. Change of the intestinal microflora of masu salmon in artificially transplanting period from fresh water into sea water and reared in fresh water without being fed.

cf. * : number of the isolates employed

に図示した。

4. 分離菌株の低pHおよび胆汁に対する抵抗性

第2群の供試魚の腸内容物，飼育用水および餌料より分離した菌株からgenusごとに無作為に抽出したそれぞれの代表菌株について，低pH液体培地および胆汁添加培地における発育能を観察した結果、Table 25およびTable 26にみられるごとく、腸内容物由来のAeromonas，Pseudomonasおよびvibrio，海水由来のPseudomonasの一部とVibrioのすべてはpH5.5および5～10%胆汁添加培地で発育が可能であった。一方餌料由来のMicrococcusとCoryneformsのほとんどは5%胆汁添加培地で発育が可能であったが、pH 5.5 液体培地における発育は認められなかった。

5. 分離菌株の発育に対する海水中の主要無機塩要求性に基づく型別

第2群の供試魚の腸内容物・飼育用海水および餌料からの分離菌株より分離材料および

Table 25. Growth of some isolates in low pH medium

pH	number of strains grown in given low pH					
	Aeromonas	pseudomonas		Vibrio		Micrococcus Coryneforms
6.0	10/10*1	10/10*1	4/10*2	10/10*1	3/3*2	10/10*3
5.5	10/10	10/10	4/10	10/10	3/3	0/10
5.5	0/10	3/10	2/10	0/10	3/3	0/10

cf. *1: isolated from the intestinal contents
*2: isolated from sea water
*3: isolated from the diets

Table 26. Susceptibility of some isolates to bile

concentration of bile in the medium	number of strains grown in given concentration of bile					
%	Aeromonas	Pseudomonas		Vibrio		Micrococcus Coryneforms
0.0	10/10*1	10/10*1	10/10*2	10/10*1	3/3*2	10/10*3
0.5	10/10	10/10	6/10	10/10	3/3	9/10
1.0	10/10	10/10	6/10	10/10	3/3	9/10
2.5	10/10	10/10	4/10	10/10	3/3	9/10
5.0	10/10	10/10	4/10	10/10	3/3	9/10
10.0	9/10	8/10	-	8/10	-	-

cf. *1: isolated from the intestinal contents
*2: isolated from sea water
*3: isolated from the diets

genus別に無作為に抽出した116株について、日高および HIDAKA and SAKAI の方法[85~87]により型別を行いその結果を Table 27 に示した。淡水飼育魚の腸内容物由来の Aeromonas はすべて陸型、海水移行過程における供試魚の腸内容物由来の Pseudomonas は陸型と好塩型が相半ばし、海水移行完了後の供試魚の腸内容物由来の Vibrio はすべて好塩型であった。一方海水ならびに餌料由来株は、いずれの genus においても前者は好塩型あるいは海洋型，後者は陸型乃至好塩型であった。

考　　察

飼育水の海水割合を人為的に漸次高めつつ淡水環境から海水環境へ移行飼育した供試魚を非給餌群（第1群）と給餌群（第2群）に分けて、移行過程における供試魚の腸内生菌数および腸内菌叢の推移を観察した結果、非給餌群の腸内菌数は経日的に減少し、同様の

Table 27. Typification by inorganic salt requirement for growth of some isolates

genus	number of strains isolated from								
	intestine			sea water			diets		
	T*1	H*2	M*3	T	H	M	T	H	M
Aeromonas	30/30	0/30	0/30						
Pseudomonas	12/25	13/25	0/25	0/11	5/11	6/11			
Vibrio	0/30	30/30	0/30	0/ 3	3/ 3	0/ 3			
Achromobacter				0/ 2	0/ 2	2/ 2			
Micrococcus							9/13	4/13	0/13
Coryneforms							2/ 2	0/ 2	0/ 2

cf. *1: terrestrial type, *2: halophilic type, *3: marine type

ことは海水移行完了後餌止め飼育した第3群および淡水中で終始餌止め飼育した第4群においても認められたが、その傾向は特に海水割合の増加につれて著明であった。これに対し給餌群においては海水への移行過程および移行完了後の飼育中においても腸内菌数の減少は観察されなかった。(Fig.5)

一方腸内菌叢については、各群を通じ実験開始時では Aeromonas が主体を成していたが、非給餌群の第1群では海水割合の増加につれ腸内菌数が減少し Aeromonas, Enterobacteriaceae の検出率が低下すると共に、Table2に示した飼育用水中の優性種 Pseudomonas と Achromobacter, 餌料中の優勢種 Micrococcus と Coryneforms などの影響を受け一時は複雑な菌叢を呈したが、その後 Yeast あるいは Pseudomonas などで構成される単純な菌叢を示すに至った。このような餌止めによる体力の消耗が推察される供試魚もその後の給餌により飼育用海水の菌叢(Pseudomonas Achromobacter, Vibrio が主体を成す)や、餌料の

菌叢などの影響を受け、再び複雑な菌叢を示すに至った（Fig. 6）。

一方給餌しながら海水移行を行った第2群では、第1群と同様に実験開始時のAeromonasおよびその他の構成菌叢が消滅すると共に、飼育用淡水および海水の菌叢の影響を受けつつ推移し、海水移行完了時においてその腸内菌叢はほとんどVibrioによって占められ、このような供試魚はその後の餌止め海水飼育によっても依然としてVibrioがその主体を成していた。これに反し淡水中で餌止め飼育した第4群では、Aeromonasが終始菌叢の主体を成したが、餌止めによる体力の消耗と共にCorynefoms などが主要菌叢構成員として出現するに致った（Fig. 6）。

以上の結果は前章[61]において淡水飼育魚の腸内菌叢はAeromonasおよびEnterobacteriaceae，海水飼育魚ではVibrioが主体を成すことを明らかにした観察所見を実験的に確認し得たものと考えられる。

次に上述の供試魚にみられた腸内菌叢は、Table 21に示した飼育用水や餌料の菌叢とは明らかに異り、淡水飼育魚および海水飼育魚のそれぞれに特異的な菌叢が認められた。このことに関連して、Table 25およびTable 26に示すごとく腸内容物、飼育用海水および餌料のそれぞれの分離菌株から無作為に抽出した代表株について、低pH液体培地および胆汁添加寒天培地における発育能を検査した結果、腸内容物由来株は菌種による差異は認められず、いづれもこれらの培地によく発育し、Aiso et al. (1968)[29]、SERA and ISHIDA (1972 a, d)[39,40]、SERA et al. (1972)[41]の報告にみられるごとく、魚体側の腸内菌叢に対する菌種選択能の存在することが推定された。また日高およびHIDAKA and SAKAIの型別法[85~87]に従って淡水飼育、海水移行過程および海水移行完了後の各供試魚の腸内由来株を型別した結果、Table 27にみられるごとく、淡水飼育魚由来のAeromonas株はすべて陸型、海水移行過程中の供試魚由来のPseudomonas株

は陸型と好塩型が相半ばし、海水移行完了後の供試魚由来のVibrio株はすべて好塩型であった。この結果は前章の環境水の違いによる腸内菌叢の相違および上記の魚体側の腸内菌叢に対する菌種選択能の存在と併せて注目される所見である。

ところでサケ科魚類には生息環境水の浸透圧変化に対応する手段として、海水環境に移行する際のいわゆる“水飲み現象”[88~90]なる行為が知られている。しかるにFig. 5にみられるごとく、海水移行過程（第1群）および移行完了後の非給餌飼育魚（第3群）の腸内菌数は飼育用水の菌数に比較しその数はきわめて少い。このことは淡水飼育の非給餌群（第4群）においても認められるが、海水移行群に比しそれ程著明でない。すなわち海水飼育魚の腸内菌数は海水摂取による影響よりもむしろ摂餌による影響が大きいものと推察される。

また淡水、海水飼育の如何にかかわらず、

非給餌群における腸内菌数は減少するが、その菌叢は前者ではAeromonas，後者ではVibrioが主体を成し、これらの菌種は少くとも本実験実施期間の約10日間は腸管内から検出された。このことは摂餌物を容れていない腸管あるいは絶食後の腸内からは細菌が検出されないとする報告[11~16]とは若干異るが、供試魚の体力が消耗しない限り、かなり長期間腸管内に保持されるものと考えられる。

小　　括

淡水で飼育中の銀化サクラマスの飼育水を、人為的に漸次海水で置換して海水割合を高めながら飼育した非給餌群と給餌群について、海水移行の腸内菌叢におよぼす影響を調べると共に、淡水中で餌止め飼育をした群を対照に餌止め飼育の影響を観察し、次のごとき結果を得た。

1．給餌飼育群では海水移行による腸内生菌

数の変化はほとんど認められず、その菌叢は淡水飼育時にその主体を成した日高らの型別によるいわゆる陸(T)型のAeromonasが漸次好塩(H)型のPseudomonasおよびVibrioに置きかわり、遂にはVibrioがその主体を成すに至った。

2. 非給餌飼育群では腸内生菌数は急激に減少し、その傾向は特に飼育水中の海水割合の増加につれて著しく、その構成菌叢は一時複雑化したが徐々に単純化する傾向を示した。

しかしこのような供試魚もその後の給餌により生菌数の増加と魚体の衰弱によると考えられる餌料中の菌叢の影響が観察された。

3. 海水移行後餌止め飼育した供試魚も腸内生菌数の減少がみられたが、その菌叢は好塩型のVibrioが主体を成した。

4. 終始淡水中で餌止め飼育した供試魚も経日的に腸内生菌数が減少したが、比較的長期間Aeromonasが菌叢の主体を成すことが観察された。

5. 終始給餌しながら淡水より漸次海水に移

行させて飼育した供試魚の腸内容物、飼育用海水および餌料から分離した菌株からそれぞれ無作為に抽出した代表菌株について、低pHおよび胆汁抵抗性を検査した結果、腸内由来のAeromonasおよびVibrio，海水由来のPseudomonasの一部およびVibrioはpH 5.5の液体培地ならびに5～10％胆汁添加寒天培地で発育が可能であったが、一方餌料由来のほとんどの菌株は5％胆汁添加培地で発育したがpH 5.5の液体培地で発育が認められなかった。

6. 5と同様に無作為に由来別ならびにgenus別に抽出した菌株について日高らの方法による型別を行った結果，淡水飼育魚の腸内由来のAeromonasはすべて陸型，海水移行過程の供試魚の腸内由来のPseudomonasは陸型と好塩型が相半ばし、海水移行完了後の供試魚の腸内由来のVibrioはすべて好塩型であった。一方飼育用海水および餌料由来株はgenusに関係なく．前者は好塩型あるいは海洋型，後者は陸型あるいは好塩型であった。

7. 以上の結果から淡水魚および海水魚はそれぞれ腸内菌叢に対する固有の菌種選択能を有することを推察した。

第3章　河川および湖沼生息魚の腸内細菌叢

目　　的

第1章および第2章において、淡水中で飼育中のサケ科魚類の腸内細菌叢は飼育水の菌叢とは異り、genus Aeromonas および family Enterobacteriaceae がその構成の主体を成すことを明らかにした[60-62]。

本章では飼育魚において認められたことが、自然の淡水環境に生息するサケ科魚類においても、同様に認められるかどうかを知るため、河川および湖沼で捕獲した2,3のサケ科魚類を対象に、その腸内生菌数と菌叢を観察すると共に、それらの生息環境水および餌料生物についても同様の観察を行い、前章までの結果と比較検討した。

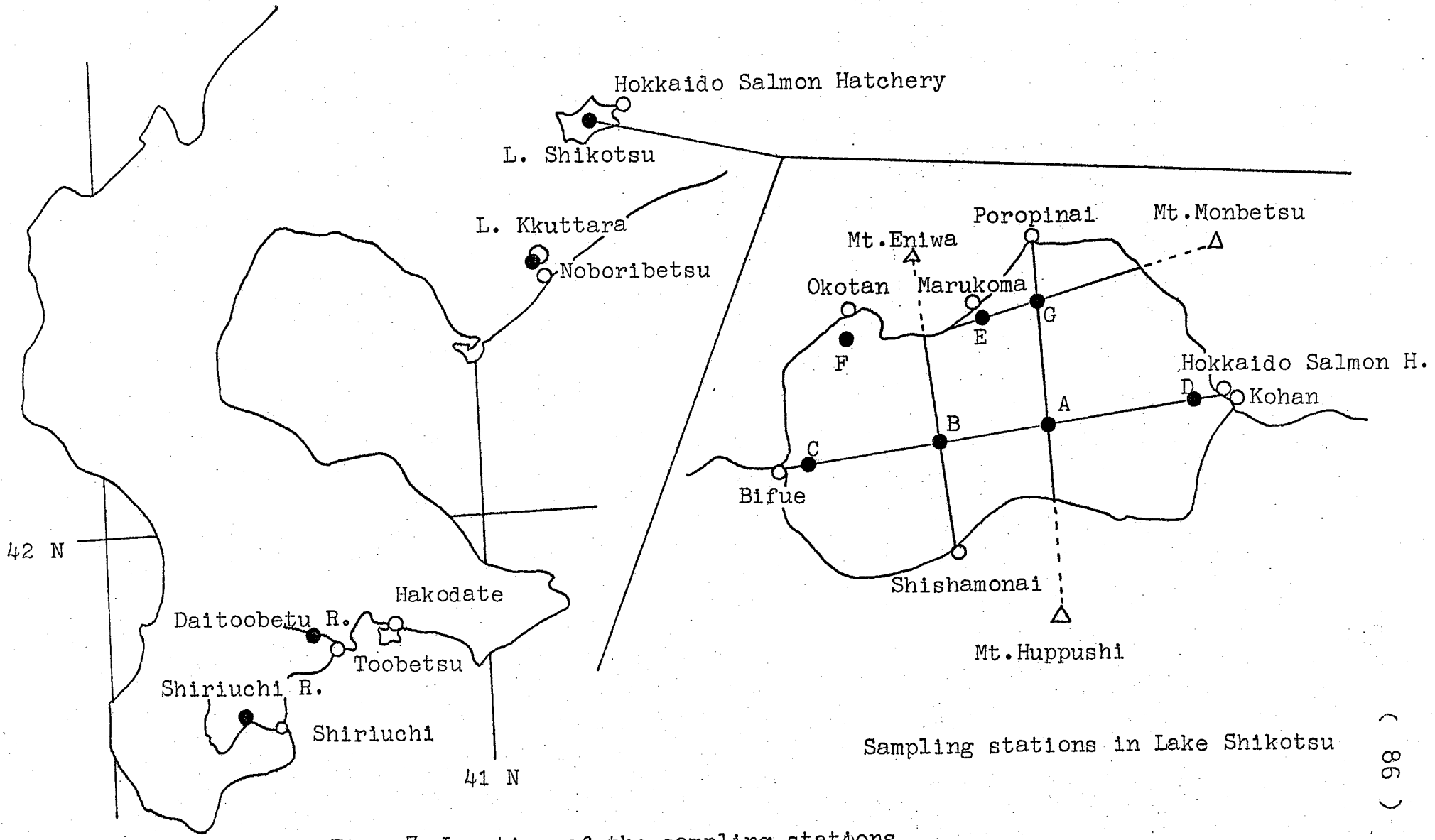
実　験　方　法

1. 供試魚

Fig.7 に示す知内川において 1973年5月から12月の間に5回および大当別川において1973年6月から1974年4月の間に8回の計13回にわたって三角網により捕獲したサクラマス(Oncorhynchus masou) 計55尾，支笏湖において1975年5月から11月の間に3回にわたって流網により捕獲したアメマス (Salvelinus leucomaenis) 6尾およびクッタラ湖において1975年5月釣獲したヒメマス (Oncorhynchus nerka) 3尾の総計64尾について、それぞれ捕獲直後即殺氷蔵し、前二者は函館市の北大水産学部に、後二者は北海道さけ・ますふ化場支笏湖事業場に持ち帰り、直ちに実験に供した。なお供試魚の体重体長ならびに性別は Table 31, Table 32 および Table 33 に示す通りである。

2. 供試生息環境水

上記の知内川および大当別川においては供試魚の捕獲時に、また支笏湖においては1975年5月から1976年3月の間に、Fig.7 に示すA



Sampling stations in Lake Shikotsu

Fig. 7. Location of the sampling stations

～Gの7点において6回，それぞれ表面水を滅菌フラスコで無菌的に採水し、供試魚と同様にしてそれぞれの研究室に持ち帰り、直ちに実験に供した。

3．供試餌料生物

上記支笏湖における生息環境水の採水時に、Fig.7に示すA，C，Dの3点において、XX-13，φ23.5プランクトンネットによる水深50mから水面までの垂直引き法で採集した動物プランクトンを滅菌フラスコにとり、供試魚と同様に直ちに研究室に持ち帰り、滅菌した乳鉢で摩砕後培養に供した。

4．培地および培養条件

生菌数測定ならびに菌株の分離に対しては、第1章で記載した淡水平板培地を用い、20℃5日間の培養を行った。

5．生菌数測定と分離菌株の分類

生菌数測定は第1章および第2章と同様の方法によったが、支笏湖の湖水については後に述べるごとく生菌数がきわめて少なかった

ことから上述の平板法および同培地より寒天を除いた液体培地による最確数(MPN)法を併用して算出し、腸内容物および餌料生物については1g当り、生息環境水については1mlおよび100ml(支笏湖の湖水)当りに換算して示した。

菌株の分離は最適希釈平板上の発生集落を釣菌し、また1976年3月の試料についてはミリポアフィルターHA 25型で湖水20mlを無菌的操作で沪過し、この沪過膜を同様の淡水平板培地面にはり付けて培養し、発生した集落を釣菌し、純培養を繰返して分離菌株を得た。また分離菌株の分類は前章までと同様にSHEWAN et al.の分類法[18]に準拠して実施した。

結　　果

1. 生息環境水の生菌数

知内川および大当別川の河川水ならびに支笏湖の湖水の生菌数は、それぞれ採水年月日、

水温と共にTable 28およびTable 29に示した。

Table 28にみられるように知内川および大当別川の河川水の生菌数は10^2~10^4/mlの範囲内で水温の季節的変化にやや遅れながら、夏季に多く冬季に少い傾向を示した。

次に支笏湖の湖水の生菌数はTable 29に示すごとく9~10^4/100 mlの範囲内で、同様にFig.8に示した水温の季節的変化にやや遅れ9~11月に最高値10^4/100ml (10^2/ml) 前後を示したが一般に生菌数は少く、特に冬季から春季にかけては100/100 ml以下のきわめて小さい値を示した。

2. 餌料生物の生菌数

支笏湖のA, C, Dの各点において採集した動物プランクトンの生菌数はTable 30に示すように、一般に10^4~10^6/gの範囲内で、湖水同様秋季に最高値を示す季節的な変化を示した。

3. 供試魚の腸内生菌数

知内川・大当別川ならびに支笏湖・クッタラ湖で捕獲したサケ科魚類の腸内容物中の生菌数を、それぞれ捕獲年月日、魚種、魚体、

Table 28. Viable microbial counts in the waters sampled in the Shiriuchi River and Daitoobetsu River

sampling place	sampling date	water temp. (°C)	viable counts /ml
Shiriuchi R.	5.May '73	9.2	3.0×10^2
	31.July'73	18.5	8.3×10^2
	15.Oct.'73	9.0	1.3×10^3
	12.Dec.'73	0.9	3.8×10^2
Daitoobetsu R.	22.June'73	14.2	1.4×10^3
	7.July'73	16.2	3.8×10^3
	28.Sep.'73	13.4	2.2×10^4
	19.Nov.'73	5.2	5.4×10^2
	31.Jan.'74	0.5	2.2×10^2
	26.Feb.'74	1.8	4.4×10^2
	27.Mar.'74	1.8	7.2×10^2
	21.Apr.'74	5.0	9.5×10^2

Table 29. Viable microbial counts in the surface waters sampled in Lake Shikotsu (/ 100 ml)

sampling date	A	B	C	D	E	F	G
22.May '75	23	23	1100	23	9	23	75
23.June	43	23	43	93	23	1100	9
25.July	93	43	240	1100	150	460	460
23.Sep.	3500	3000	11500	10000	8000	1000	1100
12.Nov.	460	12750	10750	6750	7500	10500	3500
17.Mar.'76	23	75	23	43	43	43	93

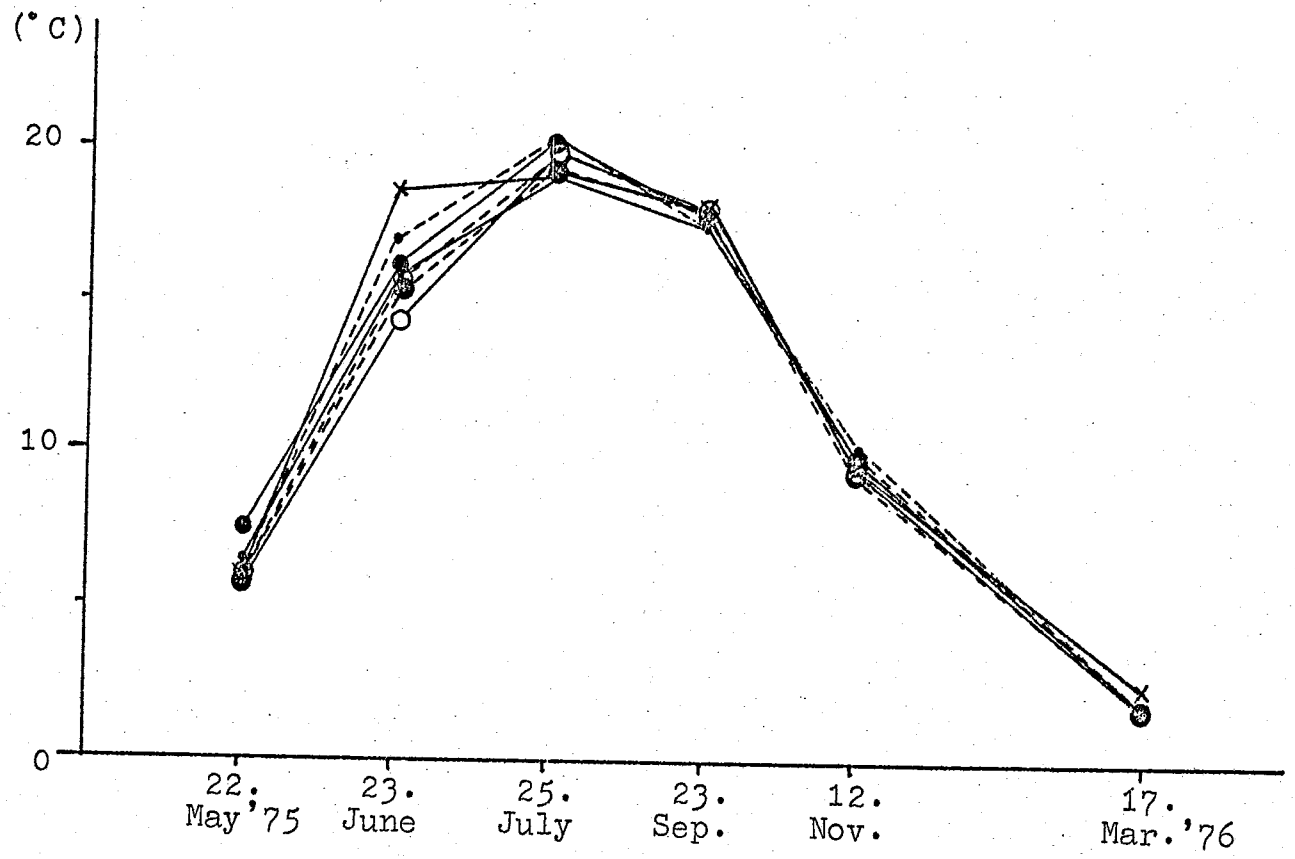


Fig. 8. Seasonal change of water temperature (°C) in Lake Shikotsu.

cf. O—O : station A , ●—● : station B, o—o : station C,
O---O : station D , ●---● : station E, o----o : station F,
×—× : station G

Table 30. Viable microbial counts on the zoo-plankton sampled in Lake Shikotsu

sampling date	A*1	C*1	D*1
22.May '75	1.4×10^5	8.3×10^5	3.4×10^4
23.June	6.3×10^4	6.2×10^6	1.7×10^5
25.July	7.1×10^6	1.9×10^6	1.4×10^6
23.Sep.	1.8×10^6	2.6×10^6	1.3×10^6
12.Nov.	6.0×10^6	7.9×10^6	5.9×10^5
17.Mar.'76	3.9×10^5	1.6×10^6	2.5×10^5

cf. *1: see Fig. 7.

性別と共にTable 31, Table 32, およびTable 33に示した。

知内川で捕獲したサクラマスの腸内生菌数はTable 31に示すごとく 10^3～10^7/gの範囲内で、かなりの個体差が認められたが、全般的には初夏に多く、冬季に少い傾向が認められた。

また大当別川で捕獲したサクラマスの腸内生菌数は、Table 32にみられるごとく 10^2～10^8/gの範囲内で、同様に初夏に多く、冬季に少く早春に再び多くなる傾向が認められた。

次に支笏湖で捕獲したアメマスおよびクッタラ湖で捕獲したヒメマスの腸内生菌数は、Table 33にみられるごとく、この場合にもかなりの個体差が認められ、10^3～10^7/gの範囲内で高水温期に多い傾向が認められた。

4. 生息環境水の菌叢

知内川・大当別川の河川水ならびに支笏湖の湖水から分離した計551株のうち継代不能の19株を除いた532株の分類結果はTable 34およびTable 35に示すごとくである。

Table 31. Viable microbial counts in the intestinal contents of masu salmon collected in the Shiriuchi River

fish No.	sampling date	body length (cm)	body weight (g)	sex	viable counts / g.
1	5.May '73	13.0	23.0	f*1	3.5×10^4
2		14.0	30.0	m*2	5.3×10^4
3		12.0	17.0	m	1.9×10^4
4		14.0	26.0	f	8.0×10^4
5		13.5	19.0	m	3.2×10^4
6	25.	11.5	21.0	m	1.9×10^3
7		15.5	40.0	m	8.7×10^4
8	31.July'73	12.5	30.0	m	3.7×10^6
9		14.9	50.0	m	7.8×10^7
10		13.8	35.0	m	3.6×10^5
11		10.2	16.0	m	8.1×10^5
12	15.Oct.'73	9.0	10.0	m	2.9×10^6
13		8.6	6.0	m	1.1×10^4
14		9.0	8.0	m	6.1×10^4
15		11.2	14.0	m	4.6×10^5
16		8.5	6.0	m	1.6×10^4
17	12.Dec.'73	11.5	15.2	m	1.0×10^3
18		10.8	12.5	f	2.2×10^3
19		9.4	8.1	m	1.1×10^3
20		11.5	16.2	m	1.5×10^4
21		9.9	9.3	m	3.8×10^3

cf. *1: female, *2: male

Table 32. Viable microbial counts in the intestinal contents of masu salmon collected in the Daitoobetsu River

fish No.	sampling date	body length (cm)	body weight (g)	sex	viable counts / g.
22	22.June'73	11.4	20.0	m*1	1.9×10^8
23		12.3	24.0	m	1.0×10^6
24		11.6	20.0	m	4.2×10^6
25		12.1	23.0	m	5.0×10^3
26		11.4	19.0	m	3.0×10^5
27	7.July'73	13.5	35.0	m	2.4×10^7
28		14.3	35.0	m	1.8×10^7
29		12.1	21.0	m	8.4×10^6
30		11.0	17.0	m	4.7×10^6
31		11.9	20.0	m	8.6×10^6
32	28.Sep.'73	8.6	10.0	f*2	3.9×10^4
33		9.0	8.0	m	4.3×10^4
34		10.4	14.0	f	1.1×10^5
35		8.5	6.0	f	3.4×10^4
36	19.Nov.'73	10.5	11.5	m	1.3×10^5
37		10.4	12.9	m	4.0×10^6
38		11.3	13.3	m	3.0×10^4
39		10.5	13.1	m	1.2×10^4
40		10.1	9.8	m	1.0×10^4
41	31.Jan.'74	11.2	11.1	f	4.0×10^2
42	26.Feb.'74	9.5	8.5	m	4.0×10^4
43		9.3	7.5	f	1.8×10^3
44		12.8	23.0	m	1.4×10^4
45		9.3	7.3	f	8.6×10^3
46		11.4	14.3	f	9.1×10^5
47	27.May.'74	12.5	17.0	m	2.2×10^6
48		13.0	20.0	m	5.0×10^7
49		10.8	11.0	f	7.1×10^7
50		12.5	17.0	m	6.2×10^6
51		11.8	16.0	m	1.4×10^6
52	21.Apr.'74	11.7	15.0	f	5.0×10^4
53		11.3	11.5	f	9.3×10^4
54		10.1	11.0	m	1.1×10^5
55		9.0	6.0	m	5.2×10^7

cf. *1: male, *2: female

Table 33. Viable microbial counts in the intestinal contents of white-spotted char collected in Lake Shikotsu and of kokanee salmon collected in Lake Kkuttara

fish No.	sampling place	sampling date	body length (cm)	body weight (g)	sex	viable counts / g.
56	Shikotsu	22.May '75	25.0	170	f*1	1.7×10^6
57			23.0	150	m*2	6.5×10^6
58		23.Sep.'75	19.0	86	m	3.2×10^7
59			23.5	136	f	2.0×10^7
60		12.Nov.'75	16.5	55	m	1.6×10^3
61			24.0	147	f	5.4×10^4
62	Kkuttara	22.May '75	18.5	65	m	6.3×10^3
63			18.0	55	m	2.9×10^4
64			16.0	49	f	8.0×10^3

cf. *1: female, *2: male

Table 34 にみられるように知内川および大当別川の河川水の菌叢は、周年を通じ比較的高率に検出される genus Flavobacterium/Cytophaga および Pseudomonas のほか、Aeromonas, Enterobacteriaceae, Achromobacter などにより構成されていた。

次に支笏湖の湖水で生菌数のきわめて少なかった5～7月を除く9月，11月の分離菌ならびにミリポアフィルターHA型沪過膜による培養から釣菌・分離を行った3月の湖水の菌叢を Table 35 に示したが、上記の河川水の場合と同様に Flavobacterium /Cytophaga, Pseudomonas, Enterobacteriaceae, Aeromonas ならびに Achromobacter などにより構成されていた。

5. 餌料生物の菌叢

支笏湖のA,C,Dの各点において採集した動物プランクトンから分離した計450株から、継代不能の6株を除く444株の分類結果は、Table 36 に示すごとくで、上記の湖水の場合と同様に Flavobacterium /Cytophaga, Pseudomonas および Enterobacteriaceae, Aeromonas がその主体を成し、

Table 34. Generic distribution of microorganisms isolated from the waters sampled in the Shiriuchi and Daitoobetsu Rivers

sampling place	sampling date	Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Aeromonas	Vibrio	Yeast	Number of the isolates
		%									
Shiriuchi	5.May '73	3	17	13	40	3	7	13	0	3	30
	31.July'73	0	0	10	17	21	14	38	0	0	29
	15.Oct.'73	0	0	11	39	25	18	7	0	0	28
	12.Dec.'73	0	0	0	37	15	22	22	0	4	27
	average*1	%1	4	9	33	16	15	20	0	2	114
		%									
Daitoobetsu	22.June'73	0	0	7	48	19	7	19	0	0	27
	28.Sep.'73	0	3	0	40	20	14	20	0	3	30
	19.Nov.'73	0	7	7	40	7	30	10	0	0	30
	31.Jan.'74	0	0	18	36	0	46	0	0	0	28
	26.Feb.'74	0	0	11	30	7	41	7	4	0	27
	27.Mar.'74	0	0	0	23	18	53	6	0	0	17
	21.Apr.'74	0	0	9	43	0	39	9	0	0	23
	average*1	%0	1	8	38	10	31	10	1	1	182

cf. *1: % in the total isolates

Table 35. Generic distribution of microorganisms isolated from the surface waters sampled in Lake Shikotsu

sampling date	station	Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Xanthomonas *	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Vibrio	Aeromonas *[1]	Yeast	Number of the isolates
		%										
23.Sep.'75	A	0	0	33	0	0	17	0	0	50	0	6
	C	0	0	0	15	0	0	15	0	70	0	20
	D	0	0	5	0	0	30	45	0	20	0	20
	F	0	0	0	0	0	45	55	0	0	0	20
	G	0	0	0	17	0	17	0	0	67	0	6
12.Nov.'75	C	0	0	0	20	0	75	0	0	5	0	20
	D	0	0	0	36	0	50	0	0	9	5	22
	G	0	0	0	50	0	33	0	0	17	0	6
17.Mar.'76	A	0	0	0	41	0	6	53	0	0	0	17
	C	0	0	0	50	0	10	40	0	0	0	20
	D	0	0	0	55	0	0	35	0	10	0	20
	E	0	0	0	65	0	5	30	0	0	0	20
	F	0	0	0	35	0	0	65	0	0	0	20
	G	0	0	0	53	0	5	42	0	0	0	19

cf. *[1]: include some strains, no gas from glucose, no sensitivity to 0/129 and terrestrial type
* : by Bergey's manual, 8 ed.

Table 36. Generic distribution of microorganisms isolated from the zoo-plankton sampled in Lake Shikotsu

sampling date	station	Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Xanthomonas *	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Vibrio	Aeromonas	Yeast	Unclassified	Number of the isolates
		%											
22.May '75	A	0	0	10	50	4	0	30	0	0	3	3	30
	C	0	0	0	20	0	20	47	0	3	0	10	30
	D	0	7	0	0	0	0	60	0	6	17	10	30
25.July'75	A	0	0	0	22	4	7	57	0	0	3	7	29
	C	0	0	0	13	3	0	20	0	64	0	0	30
	D	0	19	15	11	0	7	22	0	11	0	15	27
23.Sep.'75	A	0	0	0	14	3	43	7	0	33	0	0	30
	C	0	0	0	3	0	47	3	0	47	0	0	30
	D	0	0	0	0	0	73	27	0	0	0	0	30
12.Nov.'75	A	0	0	0	20	0	80	0	0	0	0	0	30
	C	0	0	0	7	0	86	0	0	7	0	0	30
	D	0	0	0	0	0	87	13	0	0	0	0	30
17.Mar.'76	A	0	0	0	59	0	0	41	0	0	0	0	29
	C	0	0	0	33	0	3	57	3	4	0	0	30
	D	0	0	0	62	0	24	14	0	0	0	0	29

cf. * : by Bergey's manual, 8 ed.

季節的には夏季にAeromonas，秋季にEnterobacteriaceaeが高率に検出された。

6．供試魚の腸内菌叢

知内川・大当別川ならびに支笏湖・クッタラ湖で捕獲した供試魚の腸内容物から分離した計948株から継代不能の32株を除く916株について分類を行った結果はTable 37，Table 38ならびにTable 39に示す通りである。

知内川のサクラマスの腸内菌叢は、Table 37にみられるように、春季から冬季に至る間のほとんどすべての供試魚においてはAeromonasが高率に検出され、また季節的には春季から夏季にAeromonas，秋季にEnterobacteriaceaeの占める割合が比較的高い傾向が認められた。

また大当別川で捕獲されたサクラマスの腸内菌叢もTable 38にみられるごとく、周年を通じてみればAeromonasが比較的高率に検出され、季節的には春季から夏季にAeromonas，秋季にEnterobacteriaceae，冬季にはPseudomonasの占める割合が比較的高くなる傾向が認められた。

Table 37. Generic distribution of microorganisms isolated from the intestinal contents of masu salmon collected in the Shiriuchi River

fish No.*	sampling date		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Aeromonas	Vibrio	Yeast	Number of the isolates
1	5.May '73	%	0	33	8	0	12	0	46	0	0	24
2			0	11	0	0	21	0	68	0	0	28
8	31.July'73		0	10	0	0	0	0	90	0	0	30
10			0	3	0	0	3	0	94	0	0	30
11			0	0	0	0	0	0	100	0	0	30
13	15.Oct.'73		0	0	0	0	18	0	82	0	0	28
14			0	0	0	0	50	0	50	0	0	30
16			0	0	0	0	87	0	13	0	0	30
17	12.Dec.'73		0	0	0	0	13	12	75	0	0	8
18			0	11	0	0	56	5	28	0	0	18
19			0	30	0	0	20	0	50	0	0	10
20			0	5	0	0	10	65	20	0	0	20
21			0	60	0	0	0	40	0	0	0	5
average (in the total isolates)		%	0	8	1	0	24	6	61	0	0	291

cf. * : see Table 31.

Table 38. Generic distribution of microorganisms isolated from the intestinal contents of masu salmon collected in the Daitoobetsu River

fish No.*1	sampling date	Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Aeromonas	Vibrio	Yeast	Number of the isolates
		%									
22	22.June'73	0	0	0	0	0	0	100	0	0	28
24		0	4	0	0	0	0	78	0	18	27
26		0	0	0	0	0	0	100	0	0	30
32	28.Sep.'73	0	11	0	0	81	0	8	0	0	26
33		0	4	0	0	89	0	4	0	3	28
35		0	7	0	0	93	0	0	0	0	29
36	19.Nov.'73	0	10	0	0	80	10	0	0	0	30
37		0	4	0	0	82	14	0	0	0	28
40		0	15	0	0	48	11	26	0	0	27
41	31.Jan.'74	0	62	13	0	0	0	25	0	0	8
42	26.Feb.'74	0	21	0	0	4	33	21	8	13	24
43		0	0	16	0	16	28	28	4	8	25
44		0	10	55	0	5	20	0	5	5	20
45		0	0	95	0	0	0	5	0	0	20
47	27.Mar.'74	0	47	27	0	0	26	0	0	0	15
48		0	0	0	0	0	100	0	0	0	20
51		0	0	0	0	0	100	0	0	0	20
52	21.Apr.'74	0	0	0	0	0	100	0	0	0	20
53		0	0	0	5	0	80	15	0	0	20
54		0	0	0	0	0	5	95	0	0	20
	average*2	%0	7	8	1	30	24	27	1	2	465

cf. *1: see Table 32.
*2: % in the total isolates

次に支笏湖で捕獲した アメマスおよびクッタラ湖で捕獲したヒメマスの腸内菌叢をTable 39に示した。支笏湖の5月における アメマスは、前述のSHEWAN et al. の方法[18]では Aeromonas あるいは Vibrio, また Bergey's Manual, 8 ed.[91] によれば genus Chromobacterium に分類される細菌がその主体を成したが、9月および11月の供試魚および5月のクッタラ湖のヒメマスでは Aeromonas および Enterobacteriaceae あるいは Achromobacter が菌叢の主体を成していた。

考　　察

前章までの実験に供試した飼育魚の腸内容物中には 10^4～10^8/g の範囲の生菌数が認められたが[60~62]、本章で供試した河川および湖沼で捕獲した2,3の天然のサケ科魚類においても 10^2～10^8/g の範囲の生菌数が検出され(Table 31～Table 32)、かなりの個体差は認められるが、季節的には一般に水温の上昇し始める早春か

Table 39. Generic distribution of microorganisms isolated from the intestinal contents of white-spotted char collected in Lake Shikotsu and kokanee salmon collected in Lake Kkuttara

fish No. *1	sampling place	sampling date		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Aeromonas	Vibrio	Yeast	Number of the isolates
56	Shikotsu	22.May '75	%	0	0	0	5	0	5	90*2	0	0	20
57				0	0	0	0	0	0	100*2	0	0	20
58		23.Sep.		0	0	0	0	100	0	0	0	0	20
59				0	0	0	0	15	0	85	0	0	20
60		12.Nov.		0	0	0	0	100	0	0	0	0	15
61				0	0	0	0	40	0	60	0	0	25
average (in the total isolates)			%	0	0	0	1	40	1	(31)*2 58	0	0	120
62	Kkuttara	22.May '75	%	0	0	95	0	0	0	5	0	0	20
63				0	0	0	0	0	0	100	0	0	20
average (in the total isolates)			%	0	0	47	0	0	0	53	0	0	40

cf. *1: see Table 33., *2: Chromobacterium sp. by Bergey's manual, 8 ed.

ら夏季にかけて多く、水温が低下する晩秋から冬季にかけて少くなる傾向が認められた。特に厳冬期では魚の生活活動が低下し、摂餌も不活発となることが考えられるが、この時期において腸内菌数は著しく減少し、第2章において観察されたように、腸内菌数は魚の摂餌活動と関連することが推察された。

腸内菌叢については全般的にAeromonasおよびEnterobacteriaceaeの占める割合が高く、季節的には春季から夏季にかけてAeromonas, 秋季にはEnterobacteraceaeの占める割合が高くなる傾向が認められた(Table 37~Table 39)、しかし冬季は腸内菌数の減少と共にCoryneforms, Pseudomonasの検出率が相対的に高くなる傾向がみられ(Table 38)、このような傾向は長期間の絶食などによる魚体の活力低下あるいは生理機能の低下等に起因する結果と推察される。しかしその後早春融雪期に至り再び摂餌活動が活発化するにつれ、一時的にPseudomonasが優勢となるが、春季にはAeromonasが主体を成す個体が

出現し始め、さらに周年を通じてみるとAeromonasの検出率が高率であって、Aeromonasは淡水生息魚の腸内菌叢の主要な構成員であることが認められた。

一方河川水および湖水の生菌数は水温の上昇にやや遅れながらも同様に夏季あるいは秋季に多く冬季に少い傾向を示し（Table 28およびTable 29）、水温との相関関係が観察されたがこれら淡水の菌叢は周年を通じて比較的高率に検出されるFlavobacterium/Cytophaga，およびPseudomonasのほか、Aeromonas，Enterobacteriaceae Achromobacterなどにより構成され、生息魚の腸内菌叢と明らかに異る様相を示した（Table 34およびTable 35）。

また支笏湖で採集した動物プランクトンの生菌数は10^4～10^6/gの範囲で測定され（Table 30）湖水同様秋季に最高値を示す季節的変動が認められ、またその菌叢はPseudomonas，Flavobacterium/Cytophagaおよび Enterobacteriaceae，Aeromonasがその主体を成し、季節的には夏季にAeromonas

秋季にEnterobacteriaceaeの検出率が増加する傾向を示して(Table 36)、湖水の菌叢を反映していることが観察された。

以上のように本章における自然環境の河川および湖沼に生息するサケ科魚類の腸内菌叢についての観察結果は、前章までの人為的に淡水中で飼育された魚の結果に一致し、このことは淡水魚の腸内菌叢の主要構成員を*Aeromonas*, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas*, *Bacillus* *Acinetobacter*などと考えるMATTHEIS (1966a,b,c,d)[54~56,22] 鍾・郭(1973)[57] TRUST (1974・1975)[58,59]らの報告ともかなり一致するような結果であった。

小　　括

知内川、大当別川、支笏湖ならびにクッタラ湖で捕獲した2、3のサケ科魚類の腸内容物およびそれらの生息環境水あるいは餌料生物について、生菌数とその菌叢の観察を行い次のごとき結果を得た。

1. 生息環境水および餌料生物の生菌数は水温の変化に伴い夏季から秋季に多く、冬季に少い傾向が認められた。

2. 生息環境水の菌叢の構成は、周年を通じて比較的高率に検出されるFlavobacterium/Cytophagaおよび*Pseudomonas*の他、*Aeromonas*, Enterobacteriaceae *Achromobacter*、などにより成ることが観察された。

3. 餌料生物の菌叢は生息環境水の菌叢に類似し、生息環境の菌叢を反映することが観察された。

4. 河川および湖沼に生息する2,3のサケ科魚類の腸内容物中の生菌数は10^2～10^8/gの範囲内でかなりの個体差が認められたが、全般的には、春季から夏季において多く、冬季に少い傾向が観察された。

5. 腸内菌叢は周年を通じてみると、全般的には*Aeromonas*が優勢で、季節的には一般に春季から夏季にかけて*Aeromonas*秋季にEnterobacteri-aceae, 冬季に*Pseudomonas*の占める割合が比較

的高くなる傾向が認められ、生息環境水や餌料の菌叢とは明らかに異り、第1章および第2章の飼育魚の場合と同様に比較的単純な菌叢を示した。

第4章　海洋生息魚の腸内細菌叢

目　　的

第1章および第2章において、海水中で飼育中のサケ科魚類の腸内細菌叢は飼育水のそれと異り、特定の細菌すなわちgenus Vibrioがその主体を成すことを明らかにした[60~62]。従来Vibrioは夏季高水温期のわが国沿岸海域における優勢種であることが知られており[80,92]したがって沿岸海域での漁獲魚の体表あるいは消化管からはVibrioが高率に検出されるという報告がみられる[82]。

本章では広く海洋に生息する魚類の腸内細菌叢においてもVibrioがその主体を成すかどうかを知ることを目的に、外洋に遊泳するサケ科魚類ならびに外洋あるいは近海域に生息する数種の底棲魚類を対象に、それらの腸内菌数とその菌叢を観察すると共に、生息環境水ならびに餌料生物についても同様の観察を行

い、両者の関連性について検討を行った。

実験方法

1. 生息環境水

1974年7月北海道大学練習船おしょろ丸・第53次北洋航海において、Fig.9に示した南ベーリング海・中部アリューシャン列島アムチトカ水道付近のA～Fの各点において、丁Z式細菌検査用採水器[74]により水深5mから採水した海水、また1973年9月おしょろ丸・第50次北海道エリモ沖航海に際しFig.10に示した北海道東部太平洋岸沖合のNo.4～7の各点において、同様にして水深5mおよび100m（No.7は50m）から採水した海水を、直ちに船内実験室において培養に供した。

2. 餌料生物

上記A.D,Eの各点において、NORPACネットを用いて水深50mあるいは30mより海面までの垂直引き法により採集した動物プランクト

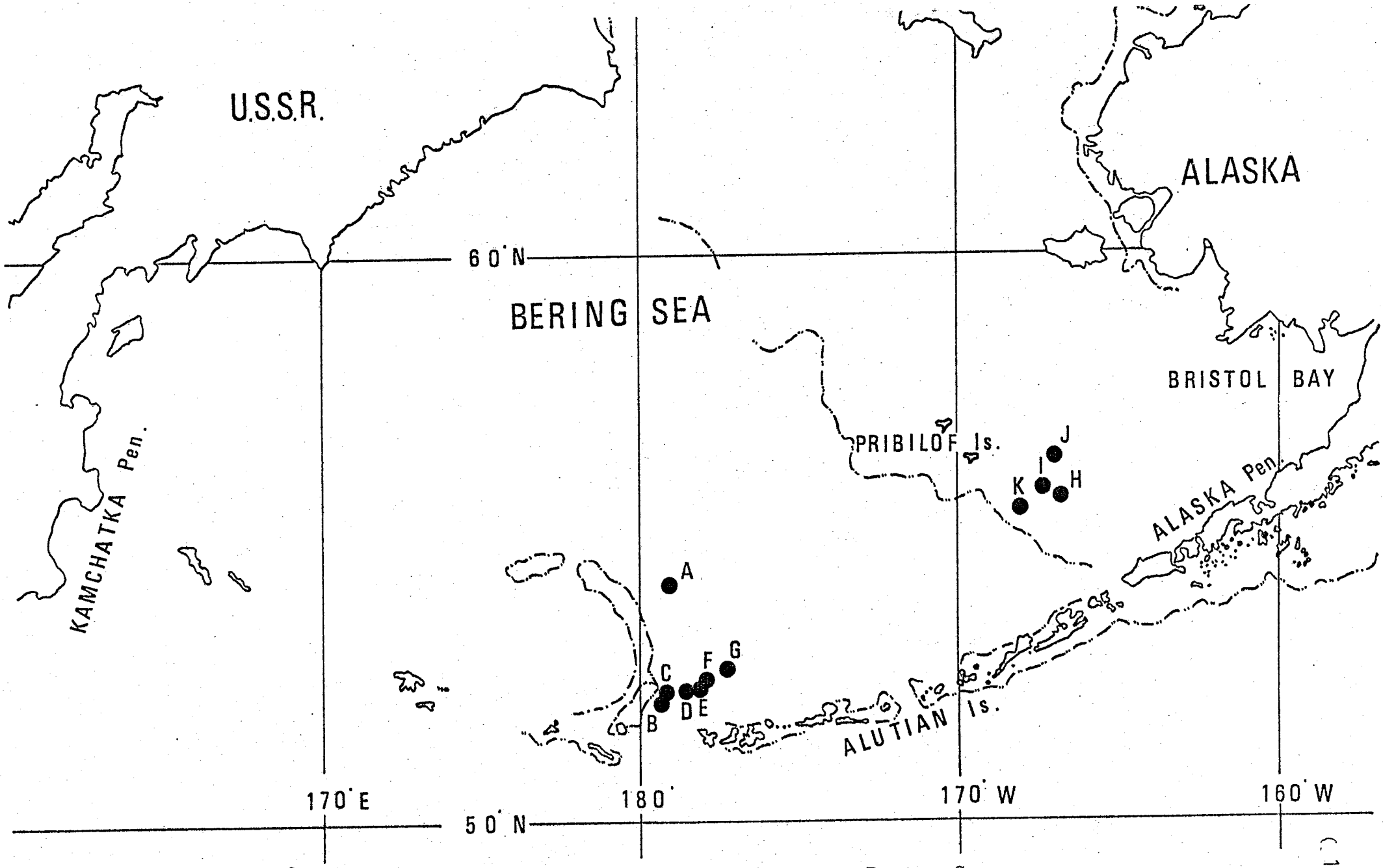


Fig. 9. Location of the sampling stations in the Bering Sea.

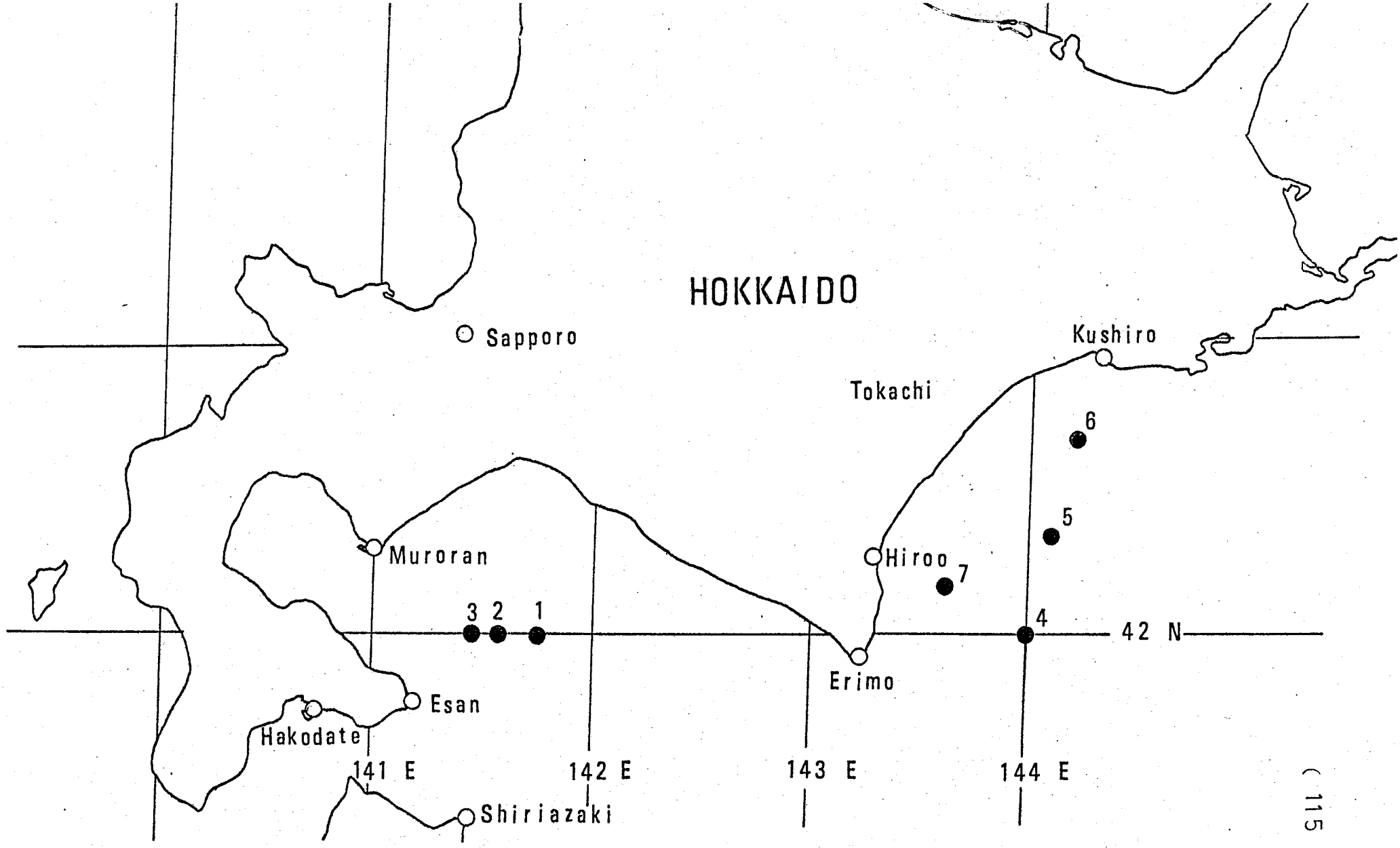


Fig. 10. Location of the sampling stations along the south coast of Hokkaido.

ンの3検体および、上記No.4～7の各点の水深150mあるいは125mから海面までの垂直引き法により採集した動物プランクトンの4検体の計7検体より、サケ科魚類の主要な餌料生物と考えられる4種の動物プランクトン(Calanus sp., Parathemisto sp., Tissanoessa sp., Euphausia sp.)を直ちに船内実験室内で無菌的に選出し、それぞれ滅菌した乳鉢で摩砕後培養に供した。

3. 供試魚

1974年6月上記のA～Gの各点において流網により漁獲したサケ科魚類，すなわちベニマス(Oncorhynchus nerka)、サケ(Oncorhynchus keta)、カラフトマス(Oncorhynchus gorbuscha)，およびマスノスケ(Oncorhynchus tschawytscha)、の4種33尾ならびに同年7月Fig.9に示したベーリング海南東部プリビロフ諸島東部大陸棚上のH～Kの各点および1973年9月、Fig.10に示した北海道南部恵山沖のNo.1～3の各点において、おなじくおしょろ丸によりトロール漁法で漁獲した底棲魚類12種26尾、計59尾についてそれぞれ

漁獲直後船内実験室において、第1章の記載同様に腸内容物を採取し培養を行った。これらの各検体の詳細についてはそれぞれTable 44. Table 46, Table 47に示したが、すべて生存中のものを選別して供試した。

4. 培地および培養条件

生菌数測定ならびに菌株の分離には第1章と同様の組成の海水培地を使用し、1973年の恵山沖および十勝沖の試料は25℃、1974年のベーリング海の試料では15℃でそれぞれ5日間培養を行った。分離菌株の各種性状検査には、前述の海水培地、同培地組成分中の肉エキスを0.5%の割合にハートインヒュージョン末で置換した培地およびZoBell 2216E培地[93]にglucoseを0.1%の割に添加した3種の培地を併用した。

5. 生菌数測定と分離菌株の分類

生菌数の測定は第1章に準拠して行い腸内容物および餌料生物については1g当り、生息環境水は1ml当りの生菌数で示した。また分

離菌株の分類も同様にSHEWAN *et al.* の分類法[18]によった。

結　　果

1. 生息環境水の生菌数と菌叢

ベーリング海のA～Fの各点の水深5mの海水および十勝沖のNo.4～7の各点の水深5mおよび100m（No.7は50m）の海水の生菌数はTable 40に示すごとくで、ベーリング海の試水は640/ml以下で、多くは10^1/mlのオーダーであったが、十勝沖の試水では水深5mの海水では610/ml以下で、その大半が10^2/mlのオーダー，また水深100mでは40/ml以下で、水深5mの場合の約1/10程度であった。

ベーリング海の海水由来の計80株から継代不能の4株を除いた76株の分類結果はTable 41に示すごとくgenus *Pseudomonas* とgenus *Achromobacter* の二者で全体の98%を占め、*Vibrio* は本実験の試水からは全く検出されなかった。

Table 40. Viable microbial counts in the waters collected off the south coast of Hokkaido and south of the Bering Sea

sampling date	sampling station	depth (m)	water temp.(°C)	viable counts /ml
4.Sep.'73	4*1	5	14.2	3.5×10
		100	-	3.5×10
4.	5*1	5	14.4	6.1×10^2
		100	-	2.5×10
5.	6*1	5	14.3	2.1×10^2
		100	-	2.5×10
6.	7*1	5	15.8	2.1×10^2
		50	-	4.0×10
13.July'74	A*2	5	5.3	less 5
14.	B*2	5	5.5	9.2×10
16.	C*2	5	6.0	5.5×10
16.	D*2	5	6.7	1.8×10
18.	E*2	5	6.6	6.0×10
20.	F*2	5	6.4	6.4×10^2

cf. *1: see Fig.10., *2: see Fig. 9.

Table 41. Generic distribution of microorganisms isolated from the waters collected south of the Bering Sea

sampling date	sampling station		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Aeromonas	Vibrio	Yeast	Number of the isolates
14.July'74	B*1	%	0	0	33	0	0	66	0	0	0	9
16.	C*1		0	0	29	14	0	57	0	0	0	14
16.	D*1		0	0	20	0	0	80	0	0	0	5
18.	E*1		0	0	0	0	0	100	0	0	0	19
20.	F*1		0	0	0	0	0	100	0	0	0	29
average (in the total isolates)		%	0	0	11	2	0	87	0	0	0	76

cf. *1: see Fig. 9.

2. 餌料生物の生菌数と菌叢

ベーリング海のA, D, Eの各点および十勝沖のNo. 4~7の各点において採集した動物プランクトンの生菌数をTable 42に示した。ベーリング海の試料ではいづれも 10^3~10^5/g, 十勝沖の試料では 10^5~10^7/gの範囲で、後者において若干生菌数の多い傾向がみられた。

これらの動物プランクトン由来の計135株から継代不能の9株を除いた126株の分類結果はTable 43に示すごとくで、ベーリング海の試料は上記ベーリング海の海水における菌叢に酷似し、*Pseudomonas* および *Achromobacter* の二者で全体の99%を占めたが、海水から検出し得なかった *Vibrio* がD点の試料から若干検出された。一方十勝沖の試料では *Pseudomonas* および *Vibrio* の2者で85%を占め、次いで *Achromobacter* が7%、その他family Enterobacteriaceaeが3%検出されたが、特に *Vibrio* は39%とベーリング海の試料に比較してきわめて高率であった。

3. サケ科魚類の腸内生菌数と菌叢

Table 42. Viable microbial counts on the zoo-plankton collected by the NORPAC net off the south coast of Hokkaido and south of the Bering Sea

sample No.	sampling date	station	depth (m)	species	viable counts/g
1	4.Sep.'73	4*1	150 - 0	Euphausia sp. Tissanoessa sp. Calanus sp.	2.4×10^5
2	4.	5*1	150 - 0	"	6.0×10^5
3	5.	6*1	150 - 0	"	2.3×10^6
4	6.	7*1	125 - 0	"	3.0×10^7
5	14.June'74	A*2	50 - 0	Calanus cristatus Parathemisto pacifica Calanus plumchrus	5.2×10^3
6	17.	D*2	30 - 0	Tissanoessa sp. Euphausia sp.	7.3×10^3
7	18.	E*2	50 - 0	Calanus cristatus	1.5×10^5

cf. *1: see Fig.10., *2: see Fig. 9.

Table 43. Generic distribution of microorganisms isolated from the zoo-plankton collected by the NORPAC net off the south coast of Hokkaido and south of the Bering Sea

sample No.	sampling date	sampling station		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Vivrio	Aeromonas	Yeast	Unclassified	Number of the isolates
1	4.Sep.'73	4*1	%	0	0	8	0	0	75	0	0	0	17	12
2	4.	5*1		0	0	23	0	15	9	45	0	0	0	13
3	5.	6*1		0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	16
4	6.	7*1		0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	16
average (in the total isolates)			%	0	0	7	0	3	46	39	0	0	0	57
5	14.July'74	A*2	%	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	9
6	17.	D*2		0	0	0	0	0	97	3	0	0	0	30
7	18.	E*2		0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	30
average (in the total isolates)			%	0	0	13	0	0	86	1	0	0	0	69

cf. *1: see Fig.10., *2: see Fig. 9.

サケ科魚類4種，33尾の腸内生菌数を漁獲年月日，魚種，体重，体長，性別と共にTable 44に示した。腸内生菌数は10^2～10^7/gの範囲でかなりの個体差がみられ、また魚種ではカラフトマスで10^7/g，次いでベニマスで10^5～10^7/gと高い値を示し、サケで10^2～10^5/g，マスノスケでは10^2～10^3/gと少なく魚種による差異が認められ、数値としては現わし得なかったが、この腸内生菌数は腸内容物量に比例するような傾向が観察された。

これら4種のサケ科魚類の腸内容物に由来する計570株より継代不能の32株を除く538株についての分類結果をTable 45に示した。またこの結果を前述の腸内生菌数の結果と共に図示するとFig. 11のごとくである。全菌株の69%はVibrioに属してその大半を占め、次いでAchromobacter 14%，Pseudomonas 10%，genus Aeromonas 6%等で前述の生息環境水および餌料生物にみられる結果とは明らかに異る様相を示した。またこの結果を魚種別にみると

Table 44. Viable microbial counts in the intestinal contents of the salmon collected by gillnet fishing south of the Bering Sea

fish No.	sampling date	sampling station	species	body length (cm)	body weight (g)	sex	viable counts/g intestinal contents
1	14.June'74	A*1	sockeye*2	59.2	1840	f*6	5.0×10^5
2				62.0	3600	m*7	6.9×10^5
3				57.4	2800	m	3.9×10^6
4				57.0	2380	m	1.2×10^5
5				55.0	2300	f	1.6×10^4
6	15.	B*1		53.4	1920	f	1.6×10^5
7				59.5	2360	m	5.6×10^4
8	16.	C*1		56.5	2460	m	1.9×10^7
9	17.	D*1		57.1	2500	f	6.3×10^6
10				58.1	2530	f	3.9×10^5
11	18.	E*1		58.9	2440	f	3.5×10^5
12	20.	G*1		54.6	2100	f	4.6×10^6
13	14.June'74	A	chum*3	53.2	1750	f	5.2×10^3
14	15.	B	salmon	59.1	2400	f	1.9×10^3
15				56.5	2300	f	6.7×10^4
16				54.7	1950	m	3.0×10^2
17	16.	C		53.0	1760	f	6.3×10^3
18				57.3	2020	f	3.2×10^3
19				55.5	2100	f	1.1×10^3
20	18.	E		48.5	1900	m	1.0×10^6
21				59.3	1930	f	2.0×10^3
22				56.3	1960	m	4.2×10^4
23				57.8	2030	f	1.0×10^3
24	20.	G		56.8	2440	m	1.2×10^7
25	16.June'74	C	pink*4	49.5	1260	m	3.5×10^7
26	17.	D	salmon	46.4	1170	m	1.9×10^7
27				46.6	1180	m	6.7×10^6
28	19.	F		47.4	1210	f	1.8×10^7
29				48.5	1390	m	2.9×10^7
30				43.8	1100	f	1.8×10^7
31	17.June'74	D	king*5	50.7	1500	f	1.6×10^3
32	19.	F	salmon	62.8	2770	f	1.4×10^3
33				48.7	1400	m	7.0×10^2

cf. *1: see Fig. 9.
*2: Oncorhynchus nerka, *3: Oncorhynchus keta,
*4: Oncorhynchus gorbuscha, *5: Oncorhynchus tschawytscha
*6: female, *7: male

Table 45. Generic distribution of microorganisms isolated from the intestinal contents of the salmon collected by gillnet fishing south of the Bering Sea

fish No*1	sampling date	sampling station	species		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Vibrio	Aeromonas	Yeast	Unclassified	Number of the total isolates
1	14.July'74	A*2	sockeye*3	%	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	26
3					0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	27
5					0	0	0	0	0	56	41	0	0	3	27
6	15.	B*2			0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	30
8	16.	C*2			0	0	33	0	0	0	67	0	0	0	30
10	17.	D*2			0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	30
11	18.	E*2			0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	30
13	14.July'74	A	chum*4	%	0	0	0	0	0	50	50	0	0	0	28
15	15.	B	salmon		0	0	66	0	0	0	34	0	0	0	30
18	16.	C			0	0	0	0	0	13	87	0	0	0	30
20	18.	D			0	0	31	0	0	0	69	0	0	0	27
21					0	0	0	0	0	0	43	57	0	0	30
24	20.	G*2			0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	30
25	16.June'74	C	pink*5	%	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	30
26	17.	D	salmon		0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	23
28	19.	F*2			0	0	0	0	0	9	17	74	0	0	23
30					0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	30
31	17.July'74	D	king*6	%	0	0	27	3	0	43	27	0	0	0	30
32	19.	F	salmon		0	0	0	0	0	57	43	0	0	0	14
33					0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	13
average (in the total isolates)				%	0	0	14	1	0	10	69	6	0	1	538

cf. *1: see table 44., *2: see Fig. 9., *3~*6: see Table 44.

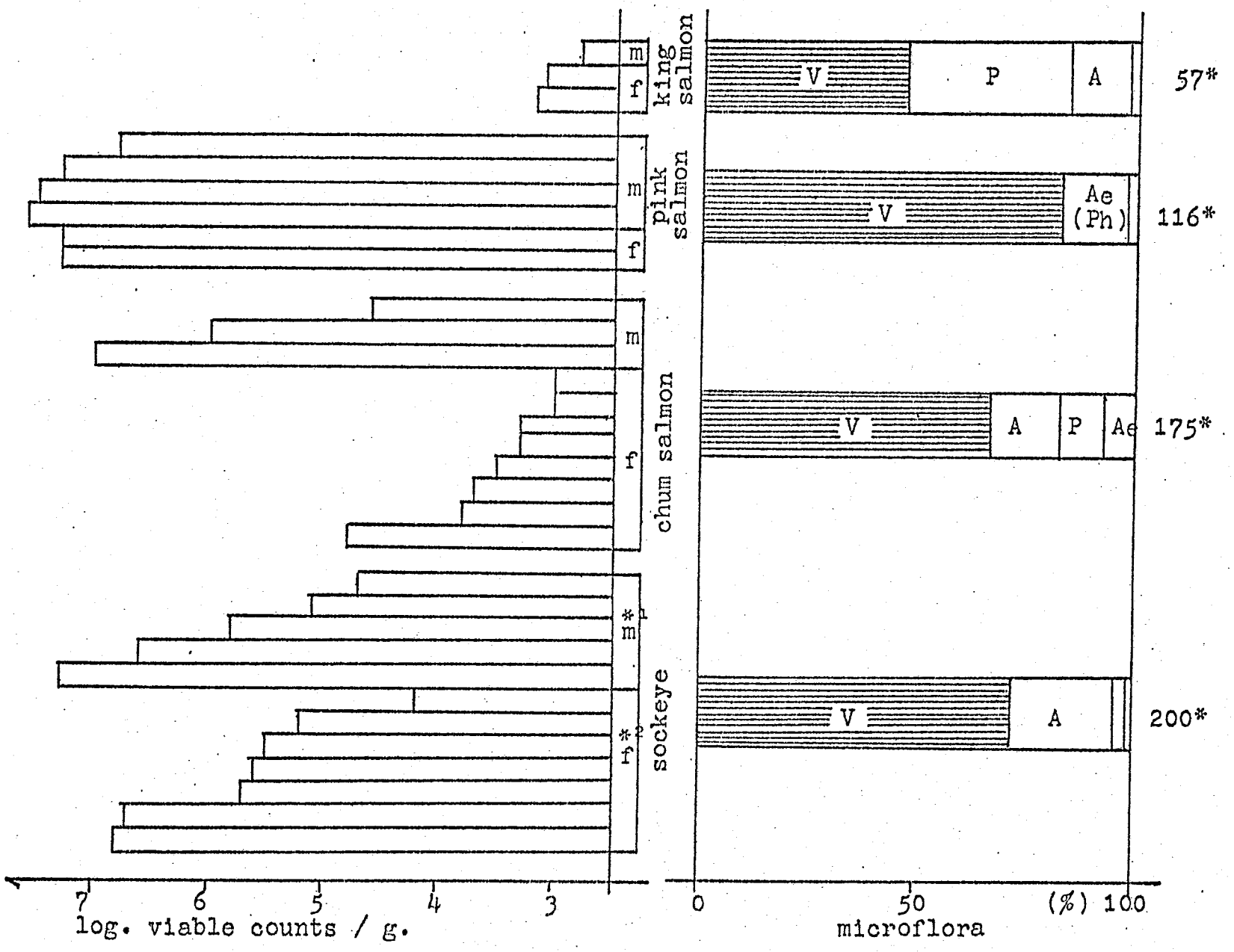


Fig.11. Intestinal microflora and number of viable microorganisms of salmon living in open sea.
(cf. * : number of the classified isolates *1: male , *2: female)

Vibrio の占める割合はカラフトマスで82%，ベニマス72%，サケ66%、マスノスケ47%で魚種間にかなりの差異がみられ、Fig. 11にみられるように腸内生菌数との相関性、すなわち生菌数の多かった魚種ほど腸内菌叢に占めるVibrio の割合の高い傾向がみられた。なおこれらVibrio，Achromobacter，Aeromonas の各属の約40%は発光性を有する菌株であった。

4. 底棲魚類の腸内生菌数と菌叢

恵山沖で漁獲された7種12尾の底棲魚の腸内生菌数を漁獲年月日、魚種、体重、体長、性別と共にTable 46に示した。すなわちこれらの腸内生菌数は、魚種、魚体、性別に関係なく 10^2～10^7/gの範囲でかなりの個体差が認められた。

同様にベーリング海で漁獲された6種14尾の底棲魚の腸内生菌数はTable 47に示すごとくで、これらの腸内生菌数も恵山沖の試料と同様に 10^2～10^7/gの範囲でかなりの個体差が認められた。

Table 46. Viable microbial counts in the intestinal contents of several marine fish collected by trawling net fishing off the south coast of Hokkaido

fish No.	sampling date	sampling station	species	body length (cm)	body weight (g)	sex	viable counts/g intestinal contents
1	7.Sep.'73	1*1	Sangomenuke (Sebastes flameus)	18.0	110	F*2	2.1×10^7
2				18.5	100	f	2.7×10^4
3	7.	1	Shirogenge (Lycogramma zesta)	52.0	530	f	4.4×10^5
4				46.0	600	m*3	4.6×10^3
5	7.	1	Itohikidara (Laemonema longipes)	43.0	400	f	6.5×10^3
6				48.0	500	m	8.3×10^3
7	7.	2*1	Hadakaiwashi (Diaphus coeruleus)	13.5	23	f	2.5×10^5
8				15.5	29	f	9.0×10^2
9	7.	3*1	Aburagarei (Atheresthes evermanni)	44.0	750	f	8.0×10^2
10				37.0	500	m	2.8×10^5
11	7.	3	Suketodara (Theragra chalcogramma)	41.0	550	m	2.0×10^4
12	7.	3	Meganekasube (Raja pulchra)	65.0	1900	m	5.9×10^3

cf. *1: see Fig.10., *2: female, *3: male

Table 47. Viable microbial counts in the intestinal contents of several marine fish collected by trawling net fishing east of Pribilof Islands in the Bering Sea

fish No.	sampling date	sampling station	species	body length (cm)	body weight (g)	sex	viable counts/g intestinal contents
13	13.July'74	H*1	Umagarei	40.0	550	f*2	6.5×10^3
14			(Hippoglossoides elassodon)	40.5	590	m*3	1.9×10^5
15				37.8	460	m	6.5×10^2
16	13.	I*1	Arasukashishamo	21.5	71	m	1.0×10^4
17			(Mallotus cateryarius)	23.5	105	m	1.9×10^4
18				21.5	94	m	3.8×10^3
19	13.	I	Madara	46.5	1050	m	3.1×10^6
20			(Gadus macrocephalus)	37.5	580	f	1.5×10^7
21	14.	J*1	Tsunokasube	44.5	2810	f	2.2×10^3
22			(Breviraja permifera)	37.5	1270	m	1.5×10^3
23	14.	J	Suketodara	43.5	580	m	4.4×10^7
24			(Theragra chalcogramma)	45.5	780	m	6.1×10^7
25	15.	K*1	Hakusengaji	31.5	150	f	2.7×10^6
26			(Lycodes palearis)	33.0	160	f	1.9×10^6

cf. *1: see Fig. 9., *2: female, *3: male

これらの底棲魚の腸内容物に由来する計320株より継代不能の31株を除く289株についての分類結果はTable 48に示す通りである。恵山沖およびベーリング海のいづれの場合も分離菌株の61%がVibrioにより占められ、前述のサケ科魚類の場合に酷似する結果を示した。また恵山沖の底棲魚由来株ではVibrioに次いでAeromonasが21%，Achromobacter 7%，Pseudomonas 6%などに分類されたが、これらのうちAeromonasは全て発光性を有し、またベーリング海の底棲魚由来株ではVibrio以外は全てAchromobacterにより占められそれら各属の約40%も発光性の菌株であった。

考　　察

第1章および第2章の実験に供試したサケ科の飼育魚の腸内容物には10^4～10^5/gの範囲内の生菌数が認められ、相当の個体差を認めたが、本章における外洋生息サケ科魚類(Table 44)

Table 48. Generic distribution of microorganisms isolated from the intestinal contents of several marine fish collected by trawling net fishing off the south coast of Hokkaido and east of Pribilof Island in the Bering Sea

fish No.*1	sampling date	sampling station	fish name		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Aeromonas	Vibrio	Yeast	Number of the isolates
2	7.Sep.'73	1*2	Sangomenuke*3	%	0	0	0	0	0	0	50	50	0	16
4			Shirogenge*3		0	0	0	0	0	0	90	10	0	20
5			Itohikidara*3		0	0	45	0	0	0	0	55	0	20
8		2*2	Hadakaiwashi*3		0	6	0	0	0	29	0	41	24	17
10		3*2	Aburagarei*3		0	0	0	0	0	0	0	100	0	17
11			Suketodara*3		0	0	0	0	0	0	0	100	0	15
12			Meganekasube*3		0	0	0	0	0	11	0	89	0	18
average (in the total isolates)				%	0	2	7	0	0	6	21	61	3	123
13	13.July'74	H*2	Umagarei*3	%	0	0	60	0	0	0	0	40	0	25
17		I*2	Arasukashishamo*3		0	0	97	0	0	0	0	3	0	29
19			Madara*3		0	0	0	0	0	0	0	100	0	28
22	14.	J*2	Tsunokasube*3		0	0	0	0	0	0	0	100	0	30
23			Suketodara*3		0	0	55	0	0	0	0	45	0	29
26	15.	K*2	Hakusengaji*3		0	0	20	0	0	0	0	80	0	25
average (in the total isolates)				%	0	0	39	0	0	0	0	61	0	166

cf. *1: see Table 46,47., *2: see Fig. 9., *3: Table 46. and Table 47.

および数種の底棲魚類（Table 46 および Table 47）においても 10^3 ～ 10^7 /g の範囲内で相当の個体差が認められた。なお、本章において外洋生息サケ科魚類の腸内菌数が腸内容物量に比例する傾向が観察されたが、第2章において観察されたように腸内菌数は摂餌活動に関連性を有することが推察される。

腸内菌叢については、ベーリング海および恵山沖の4種のサケ科魚類および数種の底棲魚のいずれにおいても Vibrio の占める比率が高く、第2章までの海水飼育魚のみならず、海洋生息魚においても Vibrio がそれらの腸内菌叢の主体を成すことが知られた。

また十勝沖で採集した動物プランクトンからは Vibrio が高率に検出され（Table 43）、上記のサケ科魚類における腸内菌叢に占める Vibrio の高い比率および腸内菌数と腸内容物量との相関性などから考察し、Vibrio が海洋生息魚の腸内菌叢の主体を成すことは、SEKI (1969)[94] の報告にみられる食物連鎖による結果とも考え

られるが、一方ベーリング海におけるそれらの生息環境水および主要餌料生物からはほとんどVibrioが検出されないにもかかわらず(Table 41およびTable 43)、同海域で漁獲されたサケ科魚類および底棲魚の腸内容物からは高率にVibrioが検出され(Table 45およびTable 48)、後者に関してはみかけ上食物連鎖との相関傾向は認められなかった。すなわち海洋生息魚の腸内菌叢の主体を成すVibrioの来源は単に食物連鎖のみでは説明し得られず、魚体側の菌種選択能および選択された菌種の腸管内定着性あるいは増殖能などについても検討されなければならないものと考えられる。

なおベーリング海で漁獲されたサケ科魚類および底棲魚のいずれにおいても、それらの腸内菌叢の主体を成すVibrio, Achromobacterおよび*Aeromonas*のそれぞれにおいて約40%は発光性を有したが、これらはBerge's Manual, 8ed.[91]によれば、genus *Photobacterium*に分類される結果となるが、この点に関しては今後の検討を要

する。

以上のように外洋生息魚で得られた結果は、第2章までの海水飼育魚の結果によく一致すると共にVibrioを海産魚の腸内菌叢の主要構成員と考えるLISTON (1957)[25], OKUTANI (1966)[28], AISO et al. (1968)[29], 奥積・堀江 (1969)[31], 金子 (1971a,b,c)[82~84] 瀬良・木俣 (1972)[32]の報告、また生息環境の菌叢に対比して海産魚類の腸内からはVibrioが高率に検出されるとするCOLWELL (1962)[26], SHRIVASTAVA and FLOODGATE (1966)[27], NEWMAN et al. (1972)[35]などの報告を肯定する結果であり、さらに海産魚の腸内からは発光性菌が高率に検出されるというLISTON (1954)[95], SPENCER (1961)[96], SHEWAN (1970)[97]の報告にも一致する結果であった。なおベーリング海で採集した動物プランクトン試料ではVibrioの検出率はきわめて低かったが、十勝沖で採集した同様の試料からはVibrioが高率に検出され(Table 43)、わが国沿岸海域では高水温期にVibrioが高率に分布するという金子 (1969)[80], 清水・相磯 (1962)[92], SHIMIDU et al. (1971)[98]らの報

告と一致する結果であった。

小　　括

外洋に遊泳するサケ科魚類ならびに外洋あるいは沿岸海域に生息する数種の底棲魚類を対象に、それらの腸内容物，生息環境水および餌料生物の生菌数とその菌叢を観察した結果、以下のごとき結果を得た。

1．ベーリング海で漁獲されたサケ科魚類4種33尾の腸内容物中の生菌数は10^2～10^7/gの範囲内でかなりの個体差が認められたが、このことは各魚種の摂餌活動の相違による結果と推察された。

2．ベーリング海および北海道沿岸に生息するサケ科以外の数種の底棲魚類においても、魚種，魚体，性別などに無関係に腸内生菌数は10^2～10^7/gの範囲内でかなりの個体差が認められた。

3．ベーリング海に生息するサケ科魚類およ

び底棲魚類の腸内菌叢は共に、生息環境水および餌料生物の菌叢とは明らかに異り、一般にVibrioがその主体を成すことが知られた。

4. 北海道沿岸に生息する底棲魚類の腸内菌叢についても、一般にVibrioがその主体を成していた。

第5章　遡河魚の腸内細菌叢

目　　的

前章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生息する時期においてはgenus Aeromonas, family Enterobacteriaceae あるいはgenus Pseudomonas, また海水で飼育中あるいは海洋環境に生息する時期においてはgenus Vibrio がその主体を成すことを明らかにした[60~64, 99]。

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(T)型のAeromonasは、飼育水中の海水割合が増加するにつれて陸型から好塩(H)型のPseudomonasに、次いで好塩型のVibrioによって置きかわり、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た[60, 62]。

本研究の対象魚であるサケ科魚類は習性上

産卵期に海洋から母河へ遡上する。したがって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ことになる。このことから、成熟産卵期の遡上魚の腸内細菌叢が上記の淡水環境から海水環境に移る時の結果とは逆に推移するか否かを観察することは興味ある問題と考えられる。

本章では遡上中に捕獲され、淡水池で短期間蓄養された遡上カラフトマス（Oncorhynchus gorbuscha）および産卵のため遡上中のサケ（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、前章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遡河の過程を含む一連の生活環中における腸内細菌叢の変遷について観察を行った。なお以上の供試魚は何れもこの時期にはほとんど摂餌活動を行わない状態にある

ものと考えられる。

実験方法

1. 供試魚

1972年10月、Fig. 12に示す北海道さけ・ますふ化場渡島支場の蓄養池で、捕獲後採卵のため約3ヵ月間無給餌の状態で蓄養中の湖上カラフトマス、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ーラップ川において捕獲した湖上中のサケ、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ヶ月間餌止めして飼育中の成熟期のサクラマスのそれぞれ雌雄5尾宛、計40尾の腸管を渡島支場あるいは森支場の採卵室で下記の方法により無菌的に摘出し、以後の実験に供した。供試魚の体重，体長，性別などはTable 49，Table 50およびTable 51に示した通りである。

2. 腸管摘出法

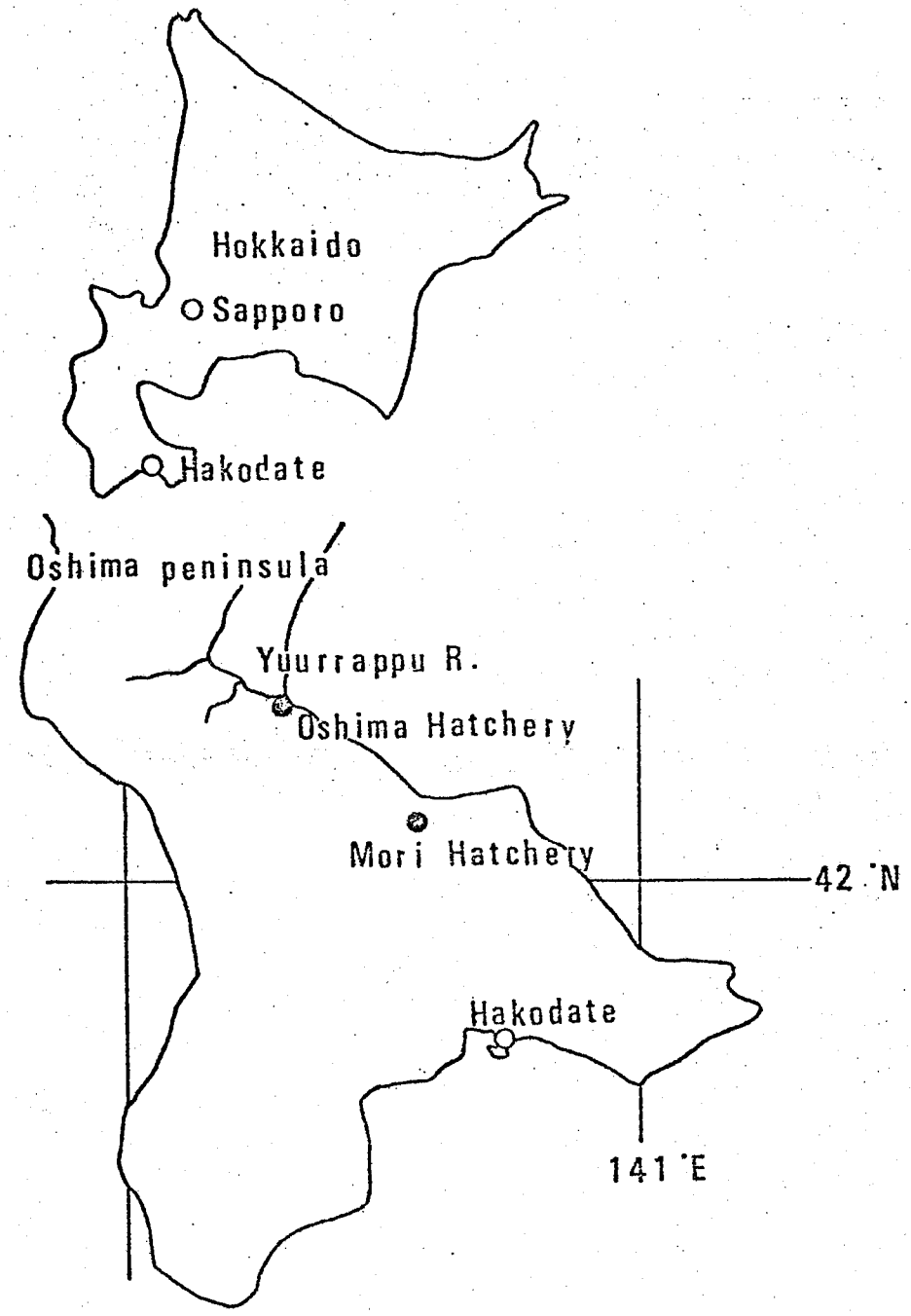


Fig. 12. Location of the Yuurrappu River, Oshima Hatchery (Branch of Hokkaido Salmon Hatchery), and Mori Hatchery (Branch of Hokkaido Fish Hatchery).

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（雌の場合には卵巣を摘出後）腹水を滅菌ガーゼで十分ふき取り、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て腸管を切断し、結紮部を摘出して滅菌シャーレ中にとり、氷蔵して函館市の北大水産学部に持ち帰り、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分である。

3. 生菌数測定と分離菌株の分類

生菌数測定は前章までと同様の方法で行い、また分離菌株の分類も同様にSHEWAN et al. の分類法[18]に準処して実施した。なお本実験の供試魚はいずれもほとんど腸管内に内容物が認められない状態にあるので、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質物をかきとって培養試料とした。また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

にして培養試料の採取を行った。

4. 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第2章における場合と同様に1/2希釈海水で調製した海水培地また森支場の試料については淡水培地を供試し、25℃で5日間培養を行った。

5. 分離菌株の発育に対する主要無機塩の要求性に基づく型別

蓄養中の遡上カラフトマスおよび遡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genus別に無作為に計215株を抽出し、これら代表株について日高およびHIDAKA and SAKAIの方法[85~87]に準拠して陸型，好塩型および海洋型の型別を行った。

結　　果

1. 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の測定結果を供試魚の捕獲年月日、魚種、体長、体重、性別と共にTable 49, Table 50およびTable 51に示した。

Table 49にみられるごとく、淡水池で無給餌のまま約3カ月間蓄養された湖上カラフトマスの腸内粘質物中の生菌数は、かなり個体差が認められるが、雌雄ともに10^2～10^7/gの範囲内で測定され、また湖上中のサケではTable 50に示すように1972年および1973年の供試魚ともに生菌数は10^2～10^8/gの範囲内であった。

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 51にみられるように雌の場合は雄に較べきわめて少く、本研究で採用した方法では菌数測定のできない個体が4検体存在したが、雄では10^3～10^5/gの範囲内で生菌数が測定された。

2. 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から分離した486株より継代が不能であった菌株を除いた370株について、

Table 49. Viable microbial counts in the intestinal slime of anadromous pink salmon reared about 3 months in fresh water without being fed

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	6.0×10^6
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	2.7×10^6

cf. *1: female, *2: male

Table 50. Viable microbial 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	3.3×10^3
12				69.0	3200	1.3×10^5
13				68.0	3300	4.6×10^5
14				69.0	3700	3.0×10^4
15				71.0	3650	5.9×10^5
16			m*2	75.0	5000	3.5×10^5
17				78.0	5200	2.1×10^7
18				72.0	4400	7.6×10^5
19				75.0	5300	3.3×10^6
20				69.0	3800	1.7×10^3
21		8.Nov.'73	f	74.0	4000	2.8×10^6
22				74.0	4100	3.0×10^2
23				77.0	4900	8.7×10^6
24				75.0	4100	4.8×10^3
25				71.0	4100	7.9×10^6
26			m	76.0	4800	3.1×10^6
27				75.0	4300	9.4×10^5
28				73.0	4000	2.3×10^3
29				72.0	4400	1.1×10^6
30				71.0	4200	1.6×10^7

cf. *1: female, *2: male

Table 51. Viable microbial 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*1	2.Oct.'72	f*2	33.0	445	N*4
32				26.8	246	N
33				29.5	291	N
34				27.8	230	4.8×10^3
35				28.5	228	N
36			m*3	24.8	181	1.4×10^5
37				25.3	205	1.3×10^4
38				26.8	248	2.1×10^4
39				24.3	215	8.8×10^3
40				26.5	252	N

cf. *1: Mori Branch of Hokkaido Fish Hatchery
*2: female, *3: male, *4: negative result

SHEWAN et al. の方法[18]に準処して属レベルの分類を行ったが、その結果を分離菌株数に対するgenus別の出現率(%)で示すとTable 52, Table 53およびTable 54の通りである。

すなわちTable 52にみられるように蓄養中の湖上カラフトマスの腸内菌叢は、Vibrioあるいは Aeromonas が単独、またはその両者が混在する状態で構成され、また湖上中のサケの場合はTable 53に示すごとく全般的にはVibrio と Pseudomonas, あるいは Aeromonas との三者が混在または単独の状態で腸内菌叢を構成していた。

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 54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。

3. 発育に対する海水中の主要無機塩要求性に基づく型別

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genus別にそれぞれ無作為に代表株を抽出し、日高およびHIDAKA and SAKAIの方法[85~87]

Table 52. Generic distribution of microorganisms isolated from the intestinal slime of anadromous pink salmon reared about 3 months in fresh water without being fed

fish No. *1	sampling date	sex		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Pseudomonas	Enterobacteriaceae	Aeromonas	Vibrio	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
average (in the total isolates)			%	0	0	0	0	0	0	44	56	0	90

cf. *1: see Table 49., *2: female, *3: male

Table 53. Generic distribution of microorganisms isolated from the intestinal slime of anadromous chum salmon

fish No. *1	sampling date	sex		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophaga	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Aeromonas	Vibrio	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	0	19
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	19
28				0	0	0	0	0	5	50	45	0	20
29				0	0	0	0	0	10	0	90	0	21
average (in the total isolates)			%	1	0	2	0	1	32	12	51	1	210

cf. *1: see Table 50., *2: female, *3: male

Table 54. 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
average (in the total isolates)			%	0	0	4	0	0	1	36	0	59	70

cf. *1: see Table 51., *2: female, *3: male

に準拠して発育に対する海水中の主要無機塩の要求性に基づく型別を行い、その結果をTable 55に示した。すなわち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った。

考　　察

以上は淡水池で蓄養中の湖上カラフトマス、河川を遡上中のサケおよび対照の淡水池で成熟期まで飼育された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はかなりの個体差がみられるが、10^2～10^8/gの範囲内で測定され(Table 49およびTable 50)前章までの飼育魚および自然環境生息魚の観察結果[60~64, 99]とほぼ同様の値を示した。また本章において供試した上記サケ科魚類の多くは摂餌活動を行わない成熟産卵期に観察が行

Table 55. Typification by inorganic salts requirement for growth of some isolates

genus	number of some strains isolated from the intestinal slime of anadromous			
	pink salmom		chum salmon	
	T*1	H,M*2	T	H,M
Aeromonas	18	0	27	9
Pseudomonas	-	-	25	26
Vibrio	0	46	0	61
Enterobacteriaceae	-	-	1	0
Achromobacter	-	-	1	0
Micrococcus	-	-	1	0

cf. *1: Terrestrial type, *2: Halophilic or Marine type

れにもかかわらず、実験的に餌止め飼育した同種魚について観察された結果に比較すると、絶食の影響はさほど顕著でなかった。これに対し終始淡水池で餌止め飼育された成熟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 ～ 10^5/g 程度であり（Table 51）約1ヵ月間の餌止め飼育の影響が推察された。

以上の結果は、絶食状態の腸内からは細菌が検出されないと報告しているMARGOLIS (1953)[16]や産卵期のサケの消化管内は無菌的状態であると報告しているHUNTER (1920)[13]およびBLAKE (1935)[14]の報告とはかなり異っており、上記の著者の観察結果は、マス類において絶食により腸内菌数は減少するが、4.5ヵ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報告しているMATTHEIS (1966d)[22]の見解を支持するものである。

次に腸内菌叢については、淡水池で蓄養中の湖上カラフトマスではVibrioおよびAeromonas

(Table 52), 湖上中のサケでは Vibrio, Pseudomonas および Aeromonas (Table 53), 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 54) 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菌株の発育に対する無機塩要求性に基づく日高らの型別において、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 はその大部分が陸型に型別された (Table 55)。

本章で供試した蓄養中の湖上カラフトマスおよび湖上中のサケは、いずれもユーラップ川を湖上中に捕獲されたもので、すなわち生息環境水が海水から淡水へ変わる過程の魚であって、第2章における淡水飼育魚を人為的に漸次海水に移行させた実験の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連性はよく一致している。このことは生息環境の変化に応じ腸内菌叢は変化すると推定した第2章の実験的観察結果

を、自然環境に生息する同種魚において実証し得たものと考える。

以上の本章における結果を前章までの結果と併わせまとめてFig. 13に図示した。すなわちFig. 13の右側に淡水および海水中で飼育中の魚、左側に自然環境の河川および海洋における生息魚を図示し、それらの腸内菌叢を魚体の中央に、また生息環境水、餌料あるいは餌料生物の菌叢を魚体の下方にそれぞれ帯グラフで示した。

すなわちこのFig. 13にまとめたこれ迄の観察結果は、サケ科魚類の腸内細菌叢は淡水生息時においては陸型のAeromonasおよびEnterobacteriaceae，海水生息時には好塩型乃至海洋型のVibrioがそれぞれの主体を成し、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、その生息環境に応じ漸次変換することを示すものと考える。

小　　括

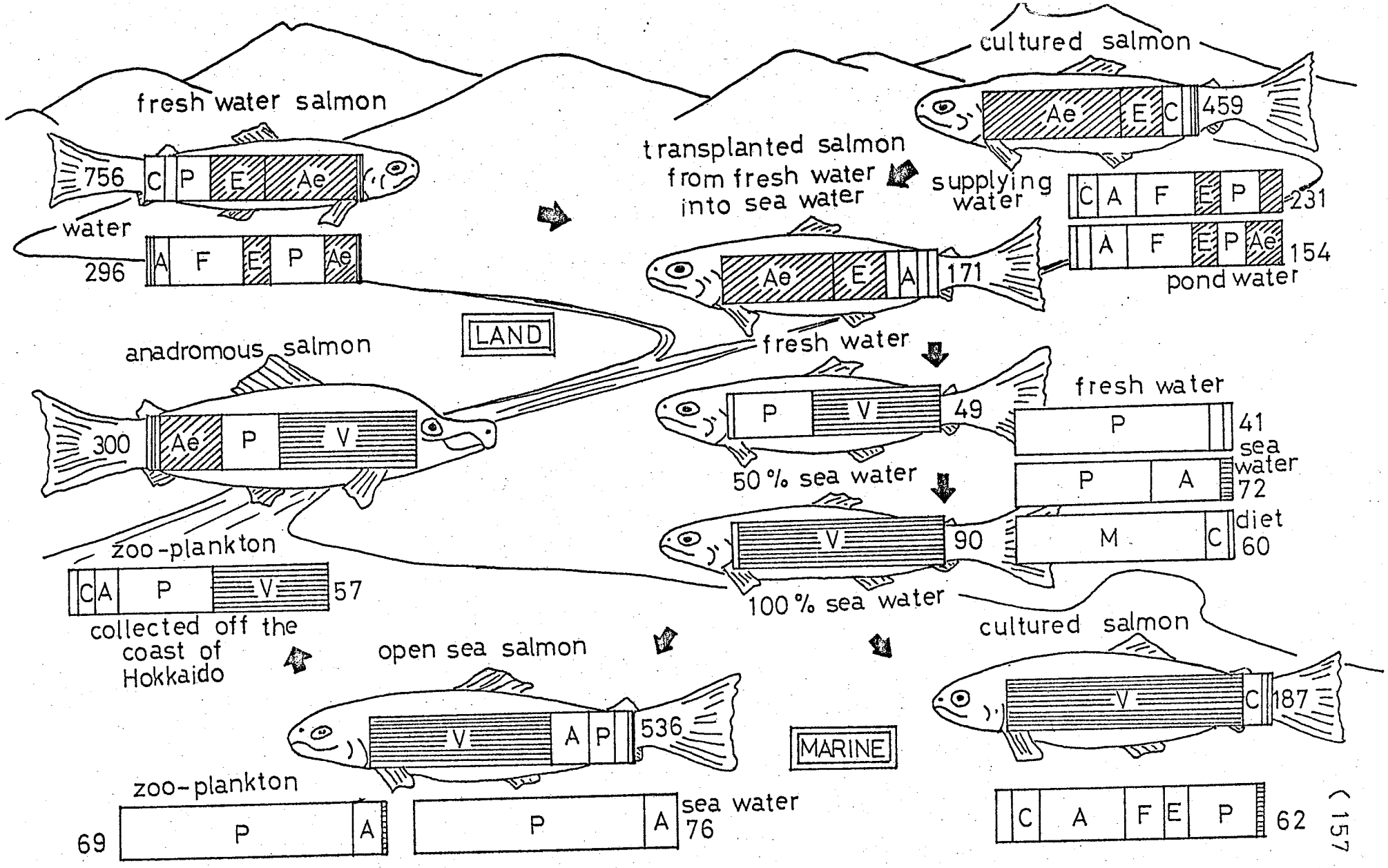


Fig. 13. Change of the intestinal microflora in the course of salmonid life history.
(cf. *: number of the isolates employed)

湖上中捕獲され淡水池で短期間蓄養中の湖上カラフトマスおよび産卵のため湖上中のサケならびに対照として終始淡水中で飼育された成熟期のサクラマスを対象に、それらの腸内容物の生菌数とその菌叢の観察を行い以下のごとき結果を得た。

1. 淡水池で飼育された成熟期のサクラマスの雌を除き、淡水池で蓄養中の湖上カラフトマスと湖上中のサケはいずれも、その腸内粘質物中の生菌数は 10^2 ～ 10^8/g の範囲内で測定された。

2. 淡水池で成熟期まで飼育されたサクラマスの腸内菌叢は Aeromonas がその主体を成していた。

3. 湖上直後のサケ科魚類の腸内菌叢は、日高らの好塩(H)型乃至海洋(M)型の Vibrio がその主体を成し、その後徐々に好塩型乃至海洋型の Pseudomonas、つづいて陸(T)型の Pseudomonas、および Aeromonas によって置き換わり、生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移行することが推察された。

第6章　稚仔魚期における腸内細菌叢の形成

目　　的

温血動物の胎児は妊娠期間を通じて子宮内で無菌状態に保たれているが、出生にあたり母体の産道内の常在菌やその他の外来菌により、まず皮膚が汚染され、次いで口腔および鼻腔に菌が出現し、それらを起点として消化管および気道に菌が運ばれると考えられている[1,2]。

ヒトをはじめウシ、ブタ、ヒツジ、イヌ、ニワトリなど種々の温血動物の出生後における消化管内細菌叢に関しては、既に多くの報告がみられるが[100~108]、水圏生物の魚類におけるこの分野の研究は未だ皆無に等しく、わずかにBELL et al. (1971)[109]がサケの卵表面の細菌叢を観察した報告がみられるにすぎない。

前章までにサケ科魚類の生活史を通じ、そ

れらの腸内細菌叢について観察を行ってきたが、生活史中の初期、すなわち淡水中に生息している時期の腸内細菌叢は、環境水あるいは餌料における菌叢とは異り、genus Aeromonas および family Enterobacteriaceae, 時には genus Pseudomonas がその主体を成すことが明らかになった[60~64]。

本章では、このような腸内細菌叢が、稚仔魚の成長過程の如何なる時期において形成されるかを知る目的で、サクラマス（Oncorhynchus masou）およびサケ（Oncorhynchus keta）を対象に、それらの受精後の胚胎期から稚魚に至る成長過程における卵表面、孵化稚魚の体表、腸ノ内容物、消化管、浮上稚魚の腸内容物について、生菌数とその菌叢の変化を観察すると共に、飼育用水・餌料についても同様の検査を行い、微生物生態学的に腸内細菌叢の形成時期を探索した。

実験材料および方法

1. 飼育用水

1975年9月より1976年3月に至る間に計17回，森支場（Fig.1，B点）における飼育用水を無菌的に滅菌フラスコ中に採取・氷蔵して研究室に持ち帰り、直ちに実験に供した。

2. 飼育用餌料

1975年9月と12月に計3回森支場で稚魚の飼育に使用している人工餌料（日清製粉社製）を滅菌フラスコ中に採取し、飼育用水と同様にして研究室に持ち帰り、直ちに実験に供した。

3. 供試魚卵

1975年9月，森支場で飼育中の成熟サクラマスから採卵した卵および同年11月、函館市銭亀沢漁協組合の汐泊川孵化場で遡上中に捕獲したサケから採卵した卵についてそれぞれ人工受精を行った後、直ちに森支場の孵化室に移し、以後の実験に供した。すなわちサクラマスについては受精後6日目から発眼期に至るまでの間に計5回、またサケについては

受精直後から孵出するに至るまでの間に計8回、それぞれ卵5個体を1検体として無菌的に試験管中に採取し、秤量後10倍量の生理的食塩水で卵表面を十分に洗浄し、その洗浄液を培養に供した。

4. 孵化稚魚

1975年11月より12月の間にサクラマスの稚魚計11尾（孵化後10～20日，体長2.3～2.8 cm，体重0.15～0.19 g）、また1976年2月中にサケの稚魚計16尾（孵化直後～20日，体長2.4～3.7 cm，体重0.21～0.60 g）をそれぞれ無菌的に試験管中に取り、氷蔵して研究室に持ち帰り、直ちに実験に供した。なお体表の生菌数を測定する場合は上記同様に秤量後10倍量の生理的食塩水で体表を十分に洗浄し、この洗浄液を培養に供した。

5. 浮上稚魚

1976年1月，サクラマスの稚魚5尾（孵化後約2カ月，体長3.2～4.4 cm，体重0.35～0.68 g）また同年3月、サケの稚魚4尾（孵化後約2

カ月、体長3.8～4.3cm，体重0.40～0.55g）をそれぞれ採捕・即殺して上記と同様にして研究室に持ち帰り直ちに実験に供した。

6．春稚魚

1976年2月および3月、サクラマス稚魚計8尾（孵化後約3カ月および4カ月，体長6.8～7.6cm，体重1.3～3.3g）を採捕・即殺して上記同様に研究室に持ち帰り直ちに実験に供した。

7．腸ノウ内容物，消化管および腸内容物

孵化稚魚の腸ノウ内容物については、体表をアルコールで消毒後腹部腸ノウ膜を切開し、内容物を白金耳で無菌的に採取し培養に供した。また孵化稚魚の消化管は同様に体表を消毒後、腸ノウをとり除き、食道部から肛門直前までの消化管全体を無菌的に摘出、滅菌乳鉢中で十分すりつぶして培養に供した。さらに孵化稚魚、浮上稚魚および春稚魚の腸内容物については上記と同様に摘出した消化管の幽門垂末端から肛門直前までの内容物をピン

セットで無菌的に採取し培養に供した。

8、生菌数測定と分離菌株の分類

生菌数測定は前章までと同様に淡水培地を供試して20℃・5日間培養を行い、飼育用水については1 me当り、卵表面では卵重量1g当り、孵化稚魚体表では体重1g当り、また腸ノウ内容物、消化管ならびに腸内容物については1g当りの生菌数で示した。

また分離株の分類法も前章までと同様にSHEWAN et al.の方法[18]に準処して実施したが、本法で分類が不能な多数の黄色色素産生株については、HENDRIE et al. (1968)[110]の方法およびBergey's Manual, 8 ed.[91]を参照して考案したFig.14に示す方法によりgenusレベルの分類を行った。

結　　果

1．飼育用水および飼育用餌料の生菌数と菌叢

飼育用水および飼育用餌料の生菌数を試料

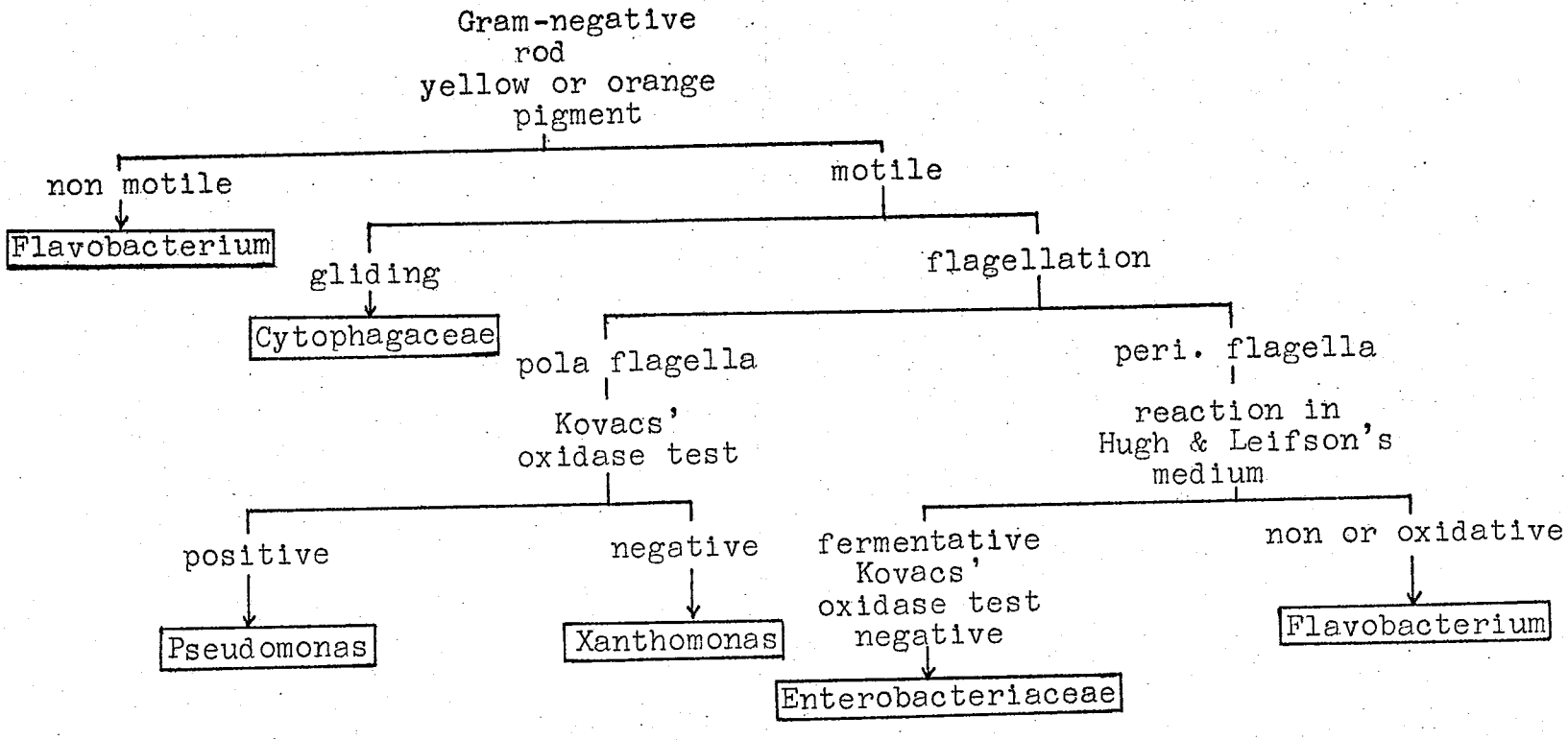


Fig.14. An outline of the sequence of tests used in the screening of isolates.

採取年月日および水温と共にTable 56に示したが、飼育用水の生菌数は10^2～10^4/mlの範囲内で測定され、厳冬期においては若干減少する傾向が認められたが、ほぼ10^3/mlのオーダーで終始した。また飼育用餌料の生菌数も10^2～10^4/g程度であった。

次に飼育用水および飼育用餌料から分離された180株から継代が不能となった7株を除いた173株について分類を行った結果はTable 57に示すごとくで、飼育用水の菌叢においては*Pseudomonas*, genus *Flavobacterium*, family Cytophagaceae, Coryneforms, genus *Micrococcus*などが主体を成し、一方飼育用餌料の菌叢の構成は比較的単純でCoryneformsおよび*Micrococcus*がその主体を成していた。

2. 胚胎期の卵表面の生菌数と菌叢

サクラマスおよびサケの胚胎期の卵表面の生菌数を、試料採取年月日、受精後の飼育日数、発育過程の時期および5個体を一括した重量と共にTable 58およびTable 59に示した。

Table56. Viable microbial counts in the supplying water and the diet

sample	sampling date	water temp. (° C)	viable counts (/ml or g.)
water	29.Sep.'75	13.8	4.2×10^3
	2.Oct.	13.7	2.2×10^3
	7.	12.6	2.2×10^3
	14.	11.0	4.1×10^3
	21.	11.0	1.2×10^4
	2.Dec.'75	8.3	3.2×10^3
	9.	8.0	2.9×10^3
	16.	7.0	1.1×10^4
	23.	8.2	3.0×10^3
	6.Jan.'76	8.6	4.9×10^3
	13.	8.2	8.7×10^3
	20.	7.0	1.0×10^3
	27.	8.2	7.4×10^2
	3.Feb.'76	7.8	4.8×10^3
	10.	-	8.8×10^2
	27.Feb.'76	9.2	2.5×10^3
	24.Mar.'76	10.0	2.2×10^4
diet	21.Oct.'75	-	1.3×10^3
	9.Dec.	-	2.7×10^2
	18.	-	1.4×10^4

Table 57. Generic distribution of microorganisms isolated from the supplying water and the diet

sample	sampling date	Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophagaceae	Xanthomonas	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Vibrio	Aeromonas*	Yeast	Unclassified	Number of the isolates
		%											
water	29.Oct.'75	11	5	5	11	11	5	47	5	0	0	0	19
	9.Dec.	0	0	11	22	0	5	56	0	5	0	0	18
	20.Jan.'76	4	21	9	4	4	0	54	0	0	0	4	24
	27.Feb.	11	21	11	32	0	0	21	0	4	0	0	19
	24.Mar.	0	4	4	56	0	0	32	0	4	0	0	25
diet	21.Oct.'75	16	44	0	0	0	0	20	0	0	0	20	25
	9.Dec.	50	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
	18.Dec.	4	79	4	0	0	0	13	0	0	0	0	23

cf. * : include some strains, no gas from glucose, no sensitivity to O/129 and terrestrial type.

Table 58. Viable microbial counts on the egg surface of masu salmon

sampling date	duration of the day	sample	number of the samples	sample weight (g)	viable counts / g
29.Sep.'75	6	fertilized egg	5	0.895	9.7×10^4
2.Oct.	9	"	5	0.771	9.2×10^4
		"	5	0.928	2.7×10^5
8.	15	"	5	0.990	7.9×10^4
		"	5	0.914	5.2×10^4
14.	21	"	5	0.682	1.4×10^6
		"	5	0.758	1.9×10^6
21.	28	eyed egg	5	0.837	1.2×10^6

すなわちTable 58にみられるように発眼期までのサクラマスの卵表面からは 10^4～10^6/gの範囲内で生菌数が測定され、飼育日数の経過と共に漸増する傾向を示した。

一方サケの卵表面の生菌数はTable 59にみられるように、10^3～10^5/gの範囲内でサクラマスの場合と同様に発眼期に至るまで漸増する傾向が観察されたが、その後は除々に減少し、孵化直前では 10^4/g程度の生菌数が測定された。

以上の胚胎期の卵表面より分離された計140株についての分類結果はTable 60に示す通りで、受精後6～9日目のサクラマスの卵表面からの分離菌株は、Flavobacterium / Cytophagaceae, Xanthomonas Pseudomonas などが主体を成し、またサケ卵の場合も初期の段階では類似した菌叢を示したが、飼育日数の経過と共にFlavobacterium / Cytophagaceae の割合が増加し、発眼期以後はこれが最優勢種として経過した。

3. 孵化稚魚の腸ノウ内容物, 体表ならびに消化管の生菌数と菌叢

Table 59. Viable microbial counts on the egg surface of chum salmon

sampling date	duration of the day	sample	number of the samples	sample weight (g)	viable counts (/g)
2.Dec.'75	0	fertilized egg	5	1.133	3.7×10^3
9.	7	"	5	1.150	6.1×10^3
16.	14	"	5	1.037	1.1×10^4
23.	21	"	5	1.273	1.6×10^4
6.Jan.'76	35	eyed egg	5	1.252	3.7×10^4
13.	42	"	5	1.050	4.8×10^5
20.	49	"	5	1.054	2.1×10^5
27.	56	"	5	1.372	1.9×10^4

Table 60. Generic distribution of microorganisms isolated from the egg surface of masu and chum salmon

species	sampling date	stage		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophagaceae	Xanthomonas	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Vibrio	Aeromonas	Yeast	Unclassified	Number of the isolates
masu salmon	29.Sep.'75	fertilized egg	%	0	20	5	35	15	0	25	0	0	0	0	20
	2.Oct.			0	0	0	25	50	0	20	0	5	0	0	20
chum salmon	2.Dec.'75	fertilized egg	%	0	0	0	45	10	0	45	0	0	0	0	20
	9.			0	0	0	20	15	10	45	0	10	0	0	20
	23.			0	0	25	5	10	0	55	0	5	0	0	20
	13.Jan.'76	eyed egg		0	0	15	60	0	0	25	0	0	0	0	20
	20.			0	10	0	90	0	0	0	0	0	0	0	20

サクラマスおよびサケの孵化稚魚の腑ノウ内容物，体表ならびに消化管の生菌数を試料採取年月日、受精後の経過日数，体表，体重と共にTable 61およびTable 62に示した。

Table 61にみられるように腑ノウ内容物からは細菌は検出されなかったが、体表からは体重g当り10^2～10^3程度の生菌数が測定され、また消化管からは10^1～10^3/gの範囲内で測定された。

一方サケの場合もTable 62にみられるように腑ノウ内容物からはいずれも細菌は検出されず、また稚魚（3尾を1検体とした）の体重g当りの体表の生菌数は10^3～10^4程度であったが、消化管では3個体中の2個体において細菌が検出されず、1検体においてのみ10^4/gのオーダーの生菌数が測定された。

以上の孵化稚魚の腑ノウ内容物，体表および消化管のうち、生菌数が測定された体表および消化管からの分離菌株から継代が不能であった9株を除く131株について実施した分類

Table 61. Viable microbial counts in the york, on the body surface, and in the digestive tract of the sacfry of masu salmon

fish No.	sample	sampling	duration of the day	body length (cm)	body weight (g)	viable counts / g.
1	york	27.Nov.'75	65	2.3	0.15	N*[1]
2				2.3	0.15	N
3				2.3	0.15	N
4	body surface	2.Dec.	70	2.6	0.18	1.7×10^3
5				2.5	0.17	5.3×10^2
6				2.6	0.19	1.4×10^3
7		9.	77	2.7	0.18	2.2×10^3
8				2.3	0.16	2.9×10^2
9				2.8	0.19	9.3×10^2
10				2.8	0.19	2.2×10^3
11				2.5	0.16	4.7×10^2
7	digestive tract	9.Dec.	77	2.7	0.18	8.5×10^1
8				2.3	0.16	3.4×10^2
9				2.8	0.19	1.4×10^1
10				2.8	0.19	5.1×10^3
11				2.5	0.16	1.4×10^2

cf. *1; negative result

Table 62. Viable microbial counts on the body surface, in the york, and in the digestive tract of the alevins or the sacfry of chum salmon

fish No.	samples	sampling date	duration of the day	stage	body length (cm)	body weight (g)	viable counts / g.
-	body surface	3.Feb.'76	63	alevins	-	0.80	3.7×10^4
-		10.	70	sacfry	-	0.66	2.6×10^3
25	york	3.Feb.	63	alevins	2.4	0.21	N*[1]
26					2.3	0.21	N
27		10.	70	sacfry	2.5	0.23	N
28					2.5	0.26	N
29	digestive tract	27.Feb.	87	sacfry	3.5	0.59	4.3×10^4
30					3.3	0.53	N
31					3.4	0.55	N

cf. *[1]: negative result

の結果は、Table 63に示すごとくで、サクラマスおよびサケの両者共に、体表ではPseudomonasおよびFlavobacterium / Cytophagaceaeが菌叢の主体を成し、またサクラマスの消化管ではFlavobacterium / Cytophagaceaeの占める割合が減少し、前述の飼育用餌料において高率に認められたCoryneformsおよびMicrococcusの占める割合が増加し、菌叢はCoryneforms, Pseudomonas, Flavobacterium / Cytophagaceae, Micrococcusなどにより構成されていた。

4. 孵化稚魚、浮上稚魚および春稚魚の腸内生菌数と菌叢

サクラマスの浮上稚魚および春稚魚、ならびにサケの孵化稚魚および浮上稚魚の腸内生菌数を採捕年月日、飼育日数、体長ならびに体重と共にTable 64およびTable 65に示した。

Table 64にみられるように、サクラマスの浮上稚魚および春稚魚の腸内生菌数は共に10^3～10^7/gの範囲内で測定され、またサケにおいてもTable 65にみられるように孵化稚魚および浮

Table 63. Generic distribution of microorganisms isolated from the body surface and the digestive tract of the sacfry of masu and chum salmon

fish No.*1	species	sampling date	sample		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophagaceae	Xanthomonas	Enterobacteri-aceae	Pseudomonas	Vibrio	Aeromonas	Yeast	Unclassified	Number of the isolates
7	masu salmon	9.Dec.'75	body surface	%	0	0	0	11	0	0	83	0	6	0	0	18
8					0	7	0	32	0	7	47	0	7	0	0	15
11					0	0	0	40	0	0	55	0	0	0	5	20
7		9.Dec.	digestive tract	%	16	0	10	16	0	0	53	0	5	0	0	19
8					0	53	0	0	0	5	42	0	0	0	0	19
11					0	35	0	15	0	5	40	0	0	0	5	20
29	chum salmon	3.Feb.'76	body surface	%	0	25	0	60	0	0	15	0	0	0	0	20

cf. *1: see Table 61 and Table 62.

Table 64. Viable microbial counts in the intestinal contents of juvenile masu salmon

fish No.	sampling date	duration of the day	stage	body length (cm)	body weight (g)	viable counts / g.
12	27. Jan.'76	126	advanced fry	3.2	0.35	1.6×10^3
13				4.1	0.58	2.8×10^3
14				3.4	0.35	2.6×10^4
15				4.4	0.68	3.2×10^5
16				3.5	0.36	1.1×10^5
17	27.Feb.	157	fingerling	5.9	1.9	1.7×10^6
18				4.9	1.4	1.8×10^7
19				4.8	1.3	1.0×10^7
20				5.6	1.8	1.1×10^6
21				5.3	1.9	1.2×10^7
22	24.Mar.	182	fingerling	7.3	3.3	7.7×10^4
23				7.6	2.9	6.7×10^5
24				5.5	1.7	8.9×10^4

Table 65. Viable microbial counts in the intestinal contents of juvenile chum salmon

fish No.	sampling date	duration of the day	stage	body length (cm)	body weight (g)	viable counts / g.
32	27.Feb.'76	87	sacfry	3.7	0.60	1.1×10^5
33				3.5	0.60	1.2×10^5
34				3.6	0.58	5.7×10^3
35	24.Mar.	112	advanced fry	4.0	0.50	2.6×10^5
36				4.3	0.55	3.8×10^5
37				4.3	0.55	2.0×10^5
38				3.8	0.40	2.0×10^4

上稚魚の腸内生菌数は共に 10^3 ～ 10^5/g の範囲内で測定された。

以上の各稚魚の腸内容物より分離された計335株の分類結果はTable 66およびTable 67に示す通りである。すなわちTable 66にみられるように、サクラマスの浮上稚魚の腸内菌叢はPseudomonas, Coryneforms, Aeromonas, Achromobacterなどにより構成され、Table 57で示した飼育用餌料および飼育用水の影響が認められたが、春稚魚ではAeromonasが優勢となり、以後もこの状態が継続した。

一方サケにおいてはTable 67にみられるように孵化稚魚の腸内菌叢はFlavobacterium / Cytophagaceae Pseudomonas, Aeromonas, Coryneformsなどにより構成され、上記のサクラマスよりも飼育用水の菌叢の影響が強く認められた。しかし浮上稚魚ではAeromonasの占める割合が増大し、これが優勢種として終始する傾向が認められた。

考　　察

Table 66. Generic distribution of microorganisms isolated from the intestinal contents of juvenile masu salmon

fish No.*2	sampling date	stage		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophagaceae	Xanthomonas	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Vibrio	Aeromonas *1	Yeast	Unclassified	Number of the isolates
12	27.Jan.'76	advanced fry	%	0	45	10	0	0	0	15	0	0	20	10	20
14				5	10	60	0	0	0	15	0	10	0	0	20
15				0	0	0	0	0	0	45	0	55	0	0	20
16				0	25	0	0	0	0	60	0	10	0	5	20
17	27.Feb.	fingerling	%	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	20
19				0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	20
21				0	0	0	0	0	0	5	0	95	0	0	20
22	24.Mar.	fingerling	%	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	25
23				0	0	0	0	0	0	16	0	84	0	0	25
24				0	0	0	0	0	0	4	0	96	0	0	25

cf. *1: include some strains ; no gas from glucose, un-sensitivity to O/129, and terrestrial type
*2: see Table 64.

Table 67. Generic distribution of microorganisms isolated from the intestinal contents of juvenile chum salmon

fish No.*1	sampling date	stage		Micrococcus	Coryneforms	Achromobacter	Flavobacterium/ Cytophagaceae	Xanthomonas	Enterobacteriaceae	Pseudomonas	Vibrio	Aeromonas	Yeast	Unclassified	Number of the isolates
32	27.Feb.'76	sacfry	%	5	10	5	50	0	0	30	0	0	0	0	20
33				0	10	10	65	0	0	10	0	5	0	0	20
34				0	0	0	0	0	10	55	0	35	0	0	20
35	24.Mar.	advanced fry	%	0	0	0	0	0	28	32	0	40	0	0	25
36				0	4	0	0	0	0	8	0	88	0	0	25
37				0	10	0	0	0	0	10	0	80	0	0	10

cf. *1: see Table 65., *2: include some strains ; see Table 66.

以上はサクラマスおよびサケを対象に、胚胎期から稚魚に至る過程中の卵表面，孵化稚魚の体表・腑ノウ内容物および消化管，浮上稚魚および春稚魚の腸内容物についてそれらの生菌数と菌叢を観察した結果であるが、胚胎期の卵表面からは卵重量g当り 10^3 ～ 10^6 の範囲内で生菌数が測定され．発眼期を最高に増加する傾向が観察された(Table 58 および Table 59)。その菌叢は初期の段階では飼育用水の菌叢(Table 57)に類似して Pseudomonas，Flavobacterium / Cytophagaceae，Xanthomonas などにより構成されていたが、飼育日数の経過と共に Flavobacterium / Cytophagaceae の占める割合が増加し、これが発眼期にはその主体を成すに至ることが観察された(Table 60)。この結果は卵表面においては Flavobacterium あるいは Cytophaga が高率に検出されると報告している BELL et al. (1971)[109] の見解に一致し、これらは胚胎期の卵表面特有の菌叢であることが推察された。

次に孵化後腑ノウが未吸収の時期の孵化稚

魚においては、いずれの検体においても腑ノウ内容物から細菌が検出されなかったが、それらの体表からは体重g当り 10^2～10^4程度の生菌数が測定され（Table 61 および Table 62）、またその菌叢は Pseudomonas, Flavobacterium/Cytophagaceae Coryneforms などにより構成され、体表の菌叢は前述の飼育用水の菌叢に類似することが観察された（Table 63）。

次いで孵化稚魚の消化管からは 10^1～10^3/gの範囲内で生菌数が測定され、その菌叢は Pseudomonas, Flavobacterium/Cytophagaceae の他、餌料において高率を占めた（Table 57）Coryneforms, Micrococcus などの影響が推察され（Table 63）、またサケの同時期の腸内菌叢においても同様の傾向が認められた（Table 67）。ことから、この時期においては摂餌と共に取り込まれる飼育用水および餌料の菌叢の影響を受けることが観察された。

一方腑ノウ吸収後の浮上稚魚および春稚魚の腸内容物からは個体差は認められるが 10^3～

10^7/gの範囲内で生菌数が測定され、この結果は前章までの飼育魚、河川および湖沼生息魚の場合と同程度であった(Table 64 および Table 65)。またその菌叢については浮上当初 Coryneforms および Pseudomonas が検出されたがその後急速に Aeromonas の占める割合が増加し(Table 66 および Table 67)、臍うが吸収された後のこの時期において、固有の腸内菌叢が形成されることが推察された。なおこの時期は消化管が発達し、かつ各種消化腺も機能化することが知られており[111]、この時期に腸管内に特定の微生物生活環境が形成され、この腸管内の環境条件に適応した菌種により固有の菌叢が形成されるものと推察される。

このように水圏生物の魚類においても、陸上温血動物における場合[100~108]と同様に、孵化後、最初に体表・鰓および口腔が環境水中の細菌群により汚染され、次いで消化管の発達と共に菌が消化管内へ運ばれることが推察された。すなわち腸内細菌叢はまず生息水の

菌叢次いで摂餌により餌料の菌叢の影響を受けるが生長と共に消化管および消化腺が機能化し、臍ノウの吸収が完了する孵化後約2ヵ月前後より、前章までに観察されたサケ科魚類固有の腸内細菌叢が形成されるものと推察された。

小　　括

サクラマスおよびサケを対象に受精後胚胎期から稚魚に至る過程中の卵表面，孵化稚魚の体表・臍ノウ内容物および消化管，浮上稚魚および春稚魚の腸内容物，飼育用水ならびに餌料について、それらの生菌数とその菌叢を比較観察した結果、以下のごとき結果を得た。

1．胚胎期の卵表面からは発眼期を最高に10^3～10^6/(卵重量)gの範囲内で生菌数が測定され、その菌叢は*Flavobacterium* / *Cytophagaceae* および *Pseudomonas* が主体を成し、その後前者の割

合が経日的に漸増した。

2. 孵化稚魚の腑ノウ内容物から細菌は検出されないが、体表からは体重g当り 10^2 ～ 10^3 の生菌数が測定され、その菌叢は Pseudomonas, Flavobacterium / Cytophagaceae を主体とし、飼育用水の菌叢に類似した。

3. 孵化稚魚の消化管および腸内容物からは 10^1 ～ 10^5 /g の範囲内で生菌数が測定されたが、その菌叢は Pseudomonas, Coryneforms, Flavobacterium / Cytophagaceae などが主体を成し、この時期では未だ飼育用水あるいは餌料の菌叢の影響が残存した。

4. 腑ノウ吸収後の浮上稚魚および春稚魚の腸内容物からは、10^3 ～ 10^7 /g の範囲内で生菌数が測定され、またその菌叢は徐々に Aeromonas, が主体を成すに至る傾向を示し、この時期にこれら魚類固有の腸内細菌叢が形成されることが推察された。

第7章　サケ科魚類の腸内細菌叢形成に関与する菌種選択能についての検討

目　　的

前章までにサケ科魚類の全生活史を通し、その生息環境水および餌料乃至餌料生物を含め腸内細菌叢に関連する微生物生態学的観察を行って来たが、その結果サケ科魚類の腸内細菌叢は淡水中に生息する時期においては genus Aeromonas, family Enterobacteriaceae あるいは genus Pseudomonas, また海水中に生息する時期においては genus Vibrio がそれぞれの菌叢において主体を成すことが明らかになった[60~64, 99]。

本章では冷水性広塩魚類のサケ科魚類の生息環境に関連して、上記の genus あるいは family に分類される細菌が、腸管内において優勢種となる機構を知る手がかりを得ることを目的に、またAISO et al. (1968)[29]、SERA and

ISHIDA (1972a,b)[39,40]、SERA et al. (1972)[41] および著者 (1976.b)[62] が推察したような腸内細菌選択能が魚類に存在するか否かを確める目的で、前章までに供試した種々の試料から分離した総計 7,503株中より、genus別に無作為に抽出した計 876 株(腸内容物由来 616 株; 生息環境水・餌料・プランクトン由来 260 株)について、日高 (1964, 1965)[85,86] および HIDAKA and SAKAI (1968)[87] の発育に対する海水中の主要無機塩要求性に基ずく型別を行うと共に、上記 876 株中から抽出した 507 株について 37℃における発育能および供試菌株中の腸内容物由来株から抽出した 139 株について発育温度域を検討し、また低pH・胆汁の存在および酵素的な消化管内環境に関連して上記 507 株について低pHおよび胆汁に対する抵抗性を瀬良・木俣 (1972)[32] の方法に準拠して測定すると共に、さらにそのうちの 372株について嫌気条件下での発育能を検討した。

なお宇賀神 (1974)[112] は上記腸内容物由来の

616株中の淡水飼育魚由来のAeromonasおよびEnterobacteriaceae，海水飼育魚由来のVibrioからそれぞれ30株宛を抽出し、Bergey's Manual, 7ed. (1957)[65]〔本便覧は水圏微生物の同定には適しない〕の他、SCHUBERT (1967)[113]，COWAN and STEEL (1965)[114]，BASCOMB et al. (1971)[115]およびHENDRIE et al. (1971)[116]を参照して、種の同定を行った結果，上記の各genusあるいはfamilyにおける供試菌株はきわめて均一性に富み、それぞれAeromonas hydrophilaあるいはA. punctata，Hafnia alveiおよびVibrio fisheriに同定され、魚類における菌種選択能の存在を推察したが、著者は宇賀神の供試した菌株中の現在まで継代が行われているAeromonas 26株Enterobacteriaceae 27株およびVibrio 21株について、その後改版されたBergey's Manual, 8ed. (1974)[91]に準拠し、再び分類・同定を行い、宇賀神の見解の再確認を試みたので、以上の結果をまとめて本章において述べる。

実験材料と方法

1. 供試菌株

上記したように前章までの実験に供した種々の試料から分離された総計7,503株中より、genusごとに無作為に計876株を抽出し実験に供した。

すなわちサケ科魚類の腸内容物由来株としてTable 68に示したAeromonas 164株, Entero--bacteriaceae 58株, Pseudomonas 92株, Vibrio 265株, genus Achromobacter 37株の計616株, また生息環境水(淡水・海水), 飼育用餌料および海産餌料生物由来株として、Table 69に示すgenus Micrococcus 27株, Coryneforms 14株, Achromobacter 23株, genus Flavobacterium 18株, Enterobacteriaceae 24株, Pseudomonas 118株, Aeromonas 9株, Vibrio 27株の計260株を抽出した。なおTable 68における( )内の菌株数計247株は、発育に対する無機塩要求性に基づく型別以外の実験に供した菌株である。

Table 68. Origin and number of some strains used for the experiment (1)

genus \ origin	number of some strains isolated from the intestinal contents of				total
	fresh-water salmon	transplanted salmon *1	sea-water salmon	anadromous salmon	
Aeromonas	56 (26)	30 (15)	24 (15)	54 (14)	164 (70)
Enterobacteriaceae	57 (27)	- -	- -	1 -	58 (27)
Pseudomonas	- -	25 (25)	16 (8)	51 (8)	92 (41)
Vibrio	- -	30 (29)	128 (61)	107 (9)	265 (99)
Achromobacter	- -	- -	36 (10)	1 -	37 (10)
total	113 (53)	85 (69)	204 (94)	214 (31)	616 (247)

cf. *1: transplanted from fresh water into sea water, see Fig.4.

Table 69. Origin and number of some strains used for the experiment (2)

genus \ origin	number of some strains isolated from the waters, diets, and zoo-plankton				
	fresh water	sea water	diets	plankton	total
Micrococcus	14	-	13	-	27
Coryneforms	12	-	2	-	14
Achromobacter	19	4	-	-	23
Flavobacterium	18	-	-	-	18
Enterobacteriaceae	23	-	-	1	24
Pseudomonas	30	37	-	51	118
Aeromonas	9	-	-	-	9
Vibrio	-	3	-	24	27
total	125	44	15	76	260

2. 供試培地.

供試菌株の来源により、淡水環境由来株ではTable 3（第1章）に示した組成の淡水培地を使用し、また海水環境由来株では同様の組成の海水培地の他、同培地中の肉エキスを0.5%の割合のハートインヒュージョン末で置き換えた培地およびZoBell 2216E培地[93]にglucoseを0.1%の割合に添加した培地を併用した。

3. 発育に対する海水中の主要無機塩要求性に基づく型別

Table 68およびTable 69に示した供試菌株，計876株を、日高（1964，1965）[85,86]およびHidaka and Sakai（1968）[87]の方法により、陸(T)型，好塩(H)型および海洋(M)型に型別した。

4. 発育温度域の測定

Table 68に示した腸内容物由来の供試菌株から，森支場および忍路湾飼育場での飼育魚ならびにベーリング海で漁獲されたサケ科魚類由来の計139株について、上記の供試培地で、20℃、48時間の前培養を行って菌体を集め、菌

株の来源により滅菌生理的食塩水あるいはHERBSTの処法[76]による人工海水中に菌体を懸濁し、それぞれの1白金耳量を当該平板培地に画線培養し、0°, 15°, 20°, 25°, 30°, 37°, 40°, 43°Cにおける7日間の培養後その発育を肉眼的に観察した。

5. 37°Cにおける発育

Table 68およびTable 69に示した供試菌株から抽出した507株について、上記同様に作成した前培養菌懸濁液の1白金耳量を当該液体培地に接種し、37°C・3日間の培養後その発育を肉眼的に観察した。

6. 胃および腸内容物のpH測定

胃および腸内容物のおおよそのpH値を知るため、1975年6月から翌年6月に至る間に計7回、森支場で飼育中のサクラマス計32尾(体重15～256g, 体長10.0～27.0cm)を給餌1.5～2時間後に採捕し、氷蔵して函館に持ち帰り、直ちに胃および腸内容物のpHをpH試験紙(東洋沪紙社製)で測定した。なお運搬に要した

時間は約1時間である。

7. 胆汁のpH測定

同様におおよその胆汁のpH値を知るために1975年11月，北海道さけ・ますふ化場渡島支場において、採卵を目的に捕獲した遡上中のサケ44尾より胆のうを摘出し、氷蔵して函館に持ち帰り、全試料を混合して10,000 rpm・10分遠心分離し、その上澄液のpHをpH試験紙で測定した。

8. 低pH(pH 5.5)および胆汁(2%添加)に対する抵抗性の測定

上記同様にTable 68およびTable 69に示した供試菌株中から抽出した507株について、前記同様に作成した前培養菌懸濁液1白金耳量を瀬良・木俣(1972)[32]の方法に準拠して調製した液体培地に接種し、20°C・3日間培養後、日立・124型光電比色計により660 mμにおけるO.D.(濁度)を測定し、低pHおよび胆汁に対する抵抗性を下記の瀬良・木俣の計算式から、それぞれS.h. ValueおよびS.b. Valueとして

算出した。

$$S.h.\ Value = \frac{\text{pH5.5における液体培養の濁度}}{\text{pH7.5における液体培養の濁度}}$$

$$S.b.\ Value = \frac{\text{胆汁添加(2%)液体培養での濁度}}{\text{胆汁無添加液体培養での濁度}}$$

9. 嫌気条件下での発育

Table 68に示した( )内の供試菌のうち Achromobacter を除く237株およびTable 69に示した供試菌のうち淡水由来株を除く135株，計372株について、上記同様に前培養菌懸濁液の一白金耳量を当該液体培地に接種し、ガスパック法[117]（BBL社製）により20℃・3日間の嫌気的培養を行い、その発育を肉眼的に観察した。

10. 腸内容物由来菌株の同定

Table 68にみられる供試菌株のうち( )内に示した淡水飼育魚の腸内容物由来の Aeromonas 26株，Enterobacteriaceae 27株および海水飼育魚の腸内由来の Vibrio 21株（61株中のベーリング海漁獲魚からの分離菌40株を除く）につい

て、前述した宇賀神(1974)[112]の報告における各種性状検査の結果に基ずき、Bergey's Manual, 8ed.[91]に準拠して属および種の同定を行った。

結　　果

1. 発育に対する海水中の主要無機塩要求性に基づく型別

日高およびHIDAKA and SAKAIの方法[85~87]に準拠し、発育に対する海水中の主要無機塩要求性から供試菌株を陸型，好塩型および海洋型に型別し、その結果をTable 70およびTable 71に示した。

すなわちTable 70にみられるように、サケ科魚類の腸内容物由来の計616株のうち、知内川、大当別川および森支場の淡水魚から分離したAeromonasおよびEnterobacteriaceaeはすべて陸型，第2章における淡水から漸次海水に移行させた実験における供試魚から分離した菌株ではAeromonasはすべて陸型，Pseudomonasは

Table 70. Typification by inorganic salt requirement for growth of some isolates

genus	number of some strains isolated from the intestinal contents of									
	fresh-water salmon			transplanted salmon *4			sea-water salmon		anadromous salmon	
	T*1	H*2	M*3	T	H	M	T	H,M	T	H,M
Aeromonas	56	0	0	30	0	0	0	24	45	9
Enterobacteriaceae	57	0	0	-	-	-	-	-	1	0
Pseudomonas	-	-	-	12	13	0	0	16	25	26
Vibrio	-	-	-	0	30	0	0	128	0	107
Achromobacter	-	-	-	-	-	-	0	36	1	0

cf. *1: Terrestrial type, *2: Halophilic type, *3: Marine type
*4: transplanted from fresh water into sea water, see Fig.4.

陸型と好塩型が相半ばし、Vibrio はすべて好塩型であった。一方忍路湾飼育場の供試魚および ベーリング海の生息魚から分離した Aeromonas, Pseudomonas, Vibrio および Achromobacter はすべて好塩型あるいは海洋型で、さらに海洋から河川への遡上過程の供試魚から分離した Vibrio はすべて好塩型あるいは海洋型, Pseudomonas は陸型と好塩型が相半ばし、Aeromonas の大半は陸型に型別され、また Enterobacteriaceae および Achromobacter の各1株も陸型であった。

次に Table 69 に示した生息環境水、飼育用餌料、および海産プランクトン由来の計260株の型別結果は Table 71 にみられるごとくで、淡水由来株の大部分は陸型, また海水由来株の大部分は好塩型で、飼育用餌料由来株では陸型、また海産プランクトン由来株では好塩型および海洋型がそれぞれその大半を占めた。

2. 発育温度域

Table 68 に示した供試菌株から抽出した森支

Table 71. Typification by inorganic salt requirement for growth of some isolates

genus	number of some strains isolated from the waters, diets and zoo-plankton											
	fresh water			sea water			diets		plankton		
	T*1	H*2	M*3	T	H	M	T	H,M	T	H	M
Micrococcus	11	3	0	-	-	-	9	4	-	-	-
Coryneforms	11	1	0	-	-	-	2	0	-	-	-
Achromobacter	18	1	0	1	3	0	-	-	-	-	-
Flavobacterium	17	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterobacteriaceae	23	0	0	-	-	-	-	-	1	0	0
Pseudomonas	30	0	0	2	35	0	-	-	12	24	15
Aeromonas	9	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Vibrio	-	-	-	0	3	0	-	-	0	1	23

cf. *1: Terrestrial type, *2: Halophilic type, *3: Marine type

場、忍路湾飼育場およびベーリング海で捕獲したサケ科魚類の腸内容物由来の計139株における発育温度域の検討結果はTable 72に示すごとくで、淡水魚由来のEnterobacteriaceaeは43℃においても発育が可能な中温菌であったが、Aeromonasは37℃での発育が26株中の1株を除き不可能で、また海水魚由来のVibrio, Achromobacterおよび Aeromonas ではそのほとんどは37℃以上では発育しない低温細菌であった。

3. 37℃における発育能

Table 68およびTable 69に示した876株の供試菌株から抽出した507株について37℃における発育能を検討した結果は、Table 73にみられるごとくで、Enterobacteriaceaeおよび Micrococcus を除く大部分の供試菌株は、37℃における発育能を示さなかった。

4. 胃内容物、胆汁および腸内容物のpH.

森支場で飼育中のサクラマス32尾を給餌1.5~2時間後に採捕し、pH試験紙を用いて胃および

Table 72. Effect of temperature on growth of some strains isolated from the intestinal contents of salmon

source	genus \ temp.(°C)		0	15	20	25	30	37	40	43
Mori H.*1	Aeromonas	26*3	2	26	26	26	26	1	0	0
	Enterobacteriaceae	27*3	0	27	27	27	27	27	27	27
Oshoro Bay C.S.*2	Vibrio	21*3	14	21	21	21	21	0	0	0
Bering Sea	Vibrio	40*3	28	40	26	14	3	1	0	0
	Achromobacter	10*3	8	10	10	10	5	3	1	0
	Aeromonas	15*3	9	15	14	9	6	0	0	0

cf. *1: Mori Branch of Hokkaido Fish Hatchery
*2: Oshoro Bay Culture Station of Hokkaido Fish Hatchery
*3: Number of the strains employed

Table 73. Growth of some isolates on 37 °C

genus	number of some strains isolated from		
	intestinal contents	environmental water	diet plankton
Aeromonas	3/70	2/ 9	-
Enterobacteriaceae	27/27	20/23	1/ 1
Pseudomonas	5/41	6/67	8/51
Vibrio	1/99	0/ 3	2/24
Micrococcus	-	7/14	7/13
Coryneforms	-	2/12	0/ 2
Achromobacter	0/10	0/23	-
Flavobacterium	-	1/18	-

腸内容物のpHを測定した結果と、1974年12月、遡上中に捕獲したサケ44尾より採集した胆汁のpHを同様に測定した結果を併せてTable 74に示した。すなわち胃内容物のpHは2.0～5.0の範囲内、腸内容物のpHは6.4～8.8の範囲内で、かなりの個体差が認められたが、多くは前者で4.0～5.0，後者では7.0～7.8の範囲内で測定された。一方胆汁のpHは44尾分を1検体として測定した結果は7.4であった。なお上述のサクラマスの一部について胆汁のpHを測定した結果はTable中に示さなかったが6.8～7.6の範囲内であった。

5. 低pHおよび胆汁に対する抵抗性

Table 68およびTable 69に示した供試菌株より抽出した507株について、低pHおよび胆汁に対する抵抗性を、瀬良・木俣の方法[32]に準拠してS.h.およびS.b.値として測定し、その結果をTable 75に示した。すなわち腸内容物由来(247株)のAeromonas，Enterobacteriaceaeおよび Vibrioの三者ではS.h.およびS.b.値が共に0.5

Table 74. PH. value of the stomachic contents, intestinal contents and bile

	stomachic contents	bile	intestinal contents
pH.	2.0 ~ 5.0	7.4 (average)	6.4 ~ 8.8
number of the salmon employed	32*1	44*2	32*1

cf. *1: masu salmon reared in Mori Hatchery

*2: anadromous chum salmon catched in Oshima Hatchery

Table 75. Susceptibility of some isolates to bile and low pH.

genus	number of some strains isolated from: intestinal contents S.h.*1 (≧0.5)	intestinal contents S.b.*2 (≧0.5)	environmental water S.h. (≧0.5)	environmental water S.b. (≧0.5)	diets plankton S.h. (≧0.5)	diets plankton S.b. (≧0.5)
Aeromonas	63/70*	46/70*	9/ 9*	6/ 9*	-	-
Enterobacteriaceae	27/27	27/27	22/23	21/23	1/ 1	1/ 1
Pseudomonas	17/41	6/41	27/67	20/67	7/51	1/51
Vibrio	57/99	30/99	0/ 3	3/ 3	0/24	1/24
Micrococcus	-	-	2/14	0/14	2/13	0/13
Coryneforms	-	-	5/12	2/12	2/ 2	0/ 2
Achromobacter	9/10	2/10	7/23	9/23	-	-
Flavobacterium	-	-	3/18	1/18	-	-

cf. * : number of the strains employed
*1: S.h. value, by Sera and Kimata 1972
*2: S.b. value, " "

以上を示す菌株が大半を占めたが、*Pseudomonas* および *Achromobacter* では一般に上記三者に比し低率で、また生息環境水由来株(169株)および餌料・餌料生物由来株(91株)においては *Aeromonas* および *Enterobacteriaceae* を除き、S.h. および S.b. 値が共に0.5以上を示す菌株の比率は一般に低く、さらに *Vibrio* においては腸内容物由来株と生息環境水・餌料生物由来株の間に、低pHおよび胆汁に対する抵抗性において統計上かなり差のあることが認められた。

6. 嫌気条件下での発育能

Table 68で( )内に示した腸内容物由来の247株より *Achromobacter* の10株を除いた237株および Table 69に示した環境水(淡水・海水)・餌料・プランクトン由来の261株より淡水由来株125株を除いた135株の計372株について嫌気条件下での発育能を検討し、その結果を Table 76に示した。すなわち特に腸内容物由来の *Aeromonas*, *Enterobacteriaceae* および *Vibrio* ならびにプランクトン由来の *Vibrio* の大部分は

Table 76. Growth of some isolates in anaerobic condition

genus	number of some strains isolated from		
	intestinal contents	environmental sea water	diets plankton
Aeromonas	50/57	-	-
Enterobacteriaceae	27/27	-	1/ 1
Pseudomonas	22/38	7/39	19/51
Vibrio	51/59	1/ 3	19/23
Micrococcus	-	-	1/12
Coryneforms	-	-	0/ 2
Achromobacter	-	0/ 4	0/ 2

良好な発育を示したが、一般にPseudomonasの一部およびプランクトン由来のMicrococcus, Coryneforms, ならびに環境水（海水）由来のAchromobacterなどではその大部分において発育が認められなかった。

7、主なる腸内細菌叢におけるBergey's Manual, 8ed.（1974）[91]による属の検索

森支場における淡水飼育魚の腸内容物由来のAeromonas 26株およびEnterobacteriaceae 27株ならびに忍路湾飼育場における海水飼育魚の腸内容物由来のVibrio 21株について、宇賀神の報告（1974）[112]における各種性状検査の結果をもとに、Bergey's Manual, 8 ed[91]に準拠してgenusの検索を行い、その結果をTable 77, Table 78およびTable 79に示した。

すなわちTable 77にみられるようにSHEWAN et al.の分類方法[18]でVibrioおよびAeromonasに分類された供試菌株の主要性状をBergey's Manual, 8ed.のVibrioおよびAeromonasの記載性状と対比させると、それぞれの属において矛盾は

Table 77. Characteristics of the genus Vibrio and the genus Aeromonas

	isolates Shewan		Bergey's Manual 8 ed.	
	Vibrio (21 strains)	Aeromonas (26 strains)	Vibrio	Aeromonas
Flagella	polar	polar	polar	polar
Oxidase	+	+	+	+
O/129 sensitivity	+	-	+	-
Luminescence	d	-	d	-
Carbohydrate metabolism (O/F medium)	F	F	F	F
Gas production	-	+	-	+
Diffusible pigment	-	-	-	- or brown
DNA base ratio-moles % G+C	42 - 43	54 - 56	40 - 50	57 - 63

見出せず、供試菌株をそれぞれ genus Aeromonas および genus Vibrio に属させて差支えないものと考えられる。

次に同様に SHEWAN et al. の分類方法[18]により Enterobacteriaceae に分類された供試菌株の各種性状は Table 79 に示すごとくで、Bergey's Manual, 8 ed. における family Enterobacteriaceae が抱含する tribe, I : Escherichieae, II : Klebsielleae, III : Proteeae, IV : Yersinieae および V : Erwinieae の 5 tribe 中の tribe II、すなわち Table 78 にみられる group II Klebsielleae に属し、さらに Table 78 にみられる tribe Klebsielleae が抱含する 4 genus (Klebsiella, Enterobacter, Hafnia および Serratia) の中の genus Hafnia の性状にきわめてよく一致することから、これら 27 株は genus Hafnia に属するものと考えられた。

8. 主なる腸内細菌叢における種の同定

上記の属の検索において Vibrio, Aeromonas および Hafnia に同定された供試菌株についてさらに種 (species) の同定を行った結果は、

Table 78. Main biochemical characters of primary groups I to IV of family Enterobacteriaceae (by Bergey's Manual, 8 ed.[91])

	Group I					Group II				Group III. *Proteus*	Group IV. *Yersinia*
	Escherichia	*Edwardsiella*	*Citrobacter*	*Salmonella*	*Shigella*	*Klebsiella*	*Enterobacter*	*Hafnia*	*Serratia*		
Catalase	+	+	+	+	D[a]	+	+	+	+	+	+
Oxidase	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
β-Galactosidase	+	−	+	D	d	+	+	+	+	−	+
Gas from glucose at 37 C	+	+	+	+	−	d	+	+	d	D	−
KCN (growth on)	−	−	+	D	−	+	+	+	+	+	−
Mucate (acid)	+	−	+	D	−	d	d	−	−		
Nitrate reduced	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G + C, moles %	50–51			50–53		52–56	52–59	52–57	53–59	39–42 (one species = 50)	45–47
Carbohydrates (acid from)											
Adonitol	−	−	−	−	−	d	+	−	d	D	D
Arabinose	+	−	+	+		+	+	+	−	−	+
Dulcitol	d	−	d	D	d	d	−	−	−	−	−
Esculin	d	−	d	−			D	−	−	d	D
Inositol	−	−	−	d	−	+	D	−	d	D	−
Lactose	+ or ×	−	+ or ×	D	D	D	+	−	−	−	−
Maltose	+	+	+	+		+	+	+	+	D	+
Mannitol	+	−	+	+	D	+	+	+	+	D	+
Salicin	d	−	d	−	−	+	+	−	+	d	D
Sorbitol	+	−	+	+		+	+	−		−	D
Sucrose	d	−	d	−	D	+	+	− or ×	+	D	D
Trehalose	+	−	+	+		+	+	+	+	d	+
Xylose	d	−	+	+	D	+	+	+	d	D	D
Related C sources											
Citrate	−	−	+	+	−	d	+	+	+		−
Gluconate		−		−	−	+	+	+	+		
Malonate	−	−	d	D	−	D	+		−		−
d-Tartrate	d	−	+	D		d	−	−			D
M.R.	+	+	+	+	+	D	−	−	−	+	+
V.P.	−	−	−	−	−	D	+	+	D	d	−
Protein reactions											
Arginine	d	−	d	+	−	−	D	−	−	−	−
Gelatin hydrolysis	−	−	−	D	−	(d)	(+)	−	+	D	−
H_2S from TSI	−	+	D	+	−	−	−	−	−	D	D
Indole	+	+	D	−	D	d	−	−	−	D	D
Lysine decarboxylated	+	+	−	+	−	d	D	+	+	d	−
Ornithine	d	+	d	+	d	−	+	+	+	D	D
Urea hydrolyzed	−	−	(+)	−	−	d	(d)	−	−	D	D
Glutamic acid	−	−	−	−	−	−				+	
Phenylalanine	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−

[a] D = different reactions given by different species of a genus; d = different reactions given by different strains of a species or serotype; × = late and irregularly positive (mutative).

Table 79. Characteristics of the genus Enterobacter and the genus Hafnia

	isolates (27 strains)	Bergey's Manual 8 ed.	
	Entero-bacteriaceae	Entero-bacter	Haf-nia
Catalase	+	+	+
Oxidase	-	-	-
β-Galactosidase	+	+	+
Gas from glucose at 37 °C	+	+	+
KCN (growth)	+ (26/27)	+	+
Mucate (acid)		d	-
Nitrate reduced	+	+	+
G+C, moles %	50 - 51	52 - 59	52 - 57
Carbohydrates (acid from)			
Adonitol		+	-
Arabinose	+ (26/27)	+	+
Dulcitol	-	-	-
Esculin	- (24/27)	d	-
Inositol	- (26/27)	d	-
Lactose	- (25/27)	+	-
Maltose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Salicin		+	-
Sorbitol	- (25/27)	+	-
Sucrose	- (26/27)	+	-
Trehalose		+	+
Xylose	+	+	+
Related C sources			
Citrate	+	+	+
Gluconate		+	+
Malonate	+ (26/27)	+	
d-Tartrate		-	-
M.R.	- (25/27)	-	-
V.P.	+ (25/27)	+	+
Protein reactions			
Arginine	-	d	-
Gelatin hydrolysis	-	(+)	-
H_2S from TSI		-	-
Indole	- (26/27)	-	-
Lysin decarboxylated	+	d	+
Ornithine	+ (26/27)	+	+
Urea hydrolyzed	-	(d)	-
Phenylalanine	-	-	-

cf. d: different reaction, ( ) : weak positive

Table 81, Table 83 および Table 84 に示すとおりである。

Table 80 に示す genus Vibrio に属す 5 species (V. cholerae, V. parahaemolyticus, V. anguillarum, V. fischeri および V. costicola) と本供試菌 21 株の対比において、若干の差異、すなわち Table 81 にみられるようにカゼインの水解性およびリジン脱炭酸酵素において違いが認められるが、その他の主要性状において Vibrio fischeri に一致し、本供試菌 21 株は V. fischeri と同定して差支えないものと考えられる。

次に Table 82 に示す genus Aeromonas に属す 3 species (A. hydrophila, A. punctata および A. salmonicida)・8 subspecies と本供試菌 26 株を対比すると、Table 83 にみられるように、37℃における発育能が異るが、その他においては Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila の性状にほぼ一致し、本供試菌株を A. hydrophila と同定して矛盾はないものと考えられる。

なお上記の genus Hafnia 27 株は Table 79 に示

Table 80. Characteristics of the species of genus Vibrio (by Bergey's Manual, 8 ed.[91])

	Vibrio cholerae	*Vibrio para-haemolyticus*	*Vibrio anguillarum*	*Vibrio fischeri*	*Vibrio costicola*
Flagella					
1 polar	+[a]	+	+	d	+
lophotrichous	−	−	−	d	−
Indole	+	+	+	−	−
Methyl red	d	d	d	+	−
Voges-Proskauer	d	d	d	−	d
Citrate utilization	d	+	−	−	−
O/129 sensitivity	+	(+)	+	+	d
Novobiocin sensitivity	+	(+)	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	d
Casein hydrolysis	+	+	+	+	−
Tween 80 hydrolysis	+	+	d	+	d
Lecithinase (egg yolk)	+	+			d
Hydrogen sulfide	−	−	−	−	−
Acid from arabinose	−	d	−	−	−
Acid from mannose	d	+	+	+	+
Acid from sucrose	+	d	+	d	+
Acid from mannitol	+	+	+	d	d
Acid from inositol	−	−	−	−	−
Acid from salicin	−	−	−	d	−
Hydrolysis of starch	+	+	+	d	−
Growth without added NaCl	+	−	+	−	−
Growth in 7.0% NaCl	d	+	d	+	+
Growth in 10.0% NaCl	−	d	−	−	+
Growth at 5 C	−	−	+	+	+
Growth at 37 C	+	+	d	−	d
Growth at 42 C	d		−	−	−
Møller's media:					
Arginine-alkaline reaction	−	−	+	−	+
Lysine decarboxylase	+	+	−	+	−
Ornithine decarboxylase	+	+	−	−	−
Hemolysis: horse blood agar	d	d	d	−	−
Luminescence	−[b]	−	−	d	−
Pathogenicity	+	+	+	−	−
DNA base ratio–moles % G + C	45–49	42–45	44–45	40–46	50

[a] + positive; − negative; (+) weak positive; d more than 10% of strains positive or negative.
[b] *Vibrio cholerae* biotype *albensis* is luminous, but only one strain is known and has been examined.

Table 81. Characteristics of the species of Vibrio fischeri

	isolates (21 strains) Vibrio	Bergey's Manual 8 ed. Vibrio fischeri
Flagella		
1 polar	+	d
lophotrichous	-	d
Indol	-	-
Methyl red	+	+
Voges-Proskauer	- (15/21)	-
Citrate utilization	-	-
O/129 sensitivity	+	+
Novobiocin sensitivity		+
Gelatin liquefaction	+ (14/21)	+
Casein hydrolysis	-	+
Tween 80 hydrolysis		+
Hydrogen sulfide	- (14/21)	-
Acid from arabinose		-
Acid from mannose	+ (18/21)	+
Acid from sucrose	-	d
Acid from mannitol	-	d
Acid from inositol		-
Acid from salicin		d
Hydrolysis of starch	- (20/21)	d
Growth without added NaCl	-	-
Growth in 7.0 % NaCl	+ (18/21)	+
Growth in 10.0 % NaCl	-	-
Growth at 5 °C	+	+
Growth at 37 °C	-	-
Growth at 42 °C	-	-
Møller's media		
Arginine-alkaline reaction		-
Lysin decarboxylase	- (14/21)	+
Ornithin decarboxylase	-	-
Hemolysis : horse blood agar	-	-
Luminescence	- (19/21)	d
Pathogenicity		-
DNA base ratio-moles % G+C	42 - 43	40 - 46

cf. d : more than 10% of strains positive or negative

Table 82. Characteristics differentiating the species, subspecies and biotypes of genus Aeromonas (by Bergey's Manual, 8 ed.[91])

	1. *A. hydrophila* subsp.			2. *A. punctata* subsp.		3. *A. salmonicida* subsp.		
	hydrophila	*anaerogenes*	*proteolytica*	*punctata*	*caviae*	*salmonicida*	*achromogenes*	*masoucida*
Growth in nutrient broth at 37 C (water bath)	+[a]	+	+	+	+	−	−	−
Brown pigment (water-soluble) on trypticase soy agar	−	−	−	−	−	+	−[b]	−[b]
Ammonium ion and glucose as sole source of nitrogen and carbon	+[c]	+[c]	+	+	+[c]	−	−	−
Amino acids as sole source of carbon								
L-Arginine	+	+	+	+	+	−	−	−
L-Asparagine	+	+	+	+	+	−	−	−
L-Histidine	+	+	+	+	+	−	−	−
L-Glutamic acid	+	+[c]	+	+	+	−	−	−
L-Serine	+[c]	d	+	+	+	−	−	−
L-Alanine	d	d	+	d	+	−	−	−
Growth in nutrient broth containing 7.5% NaCl	−	−	+	−	−	−	−	−
Butanediol dehydrogenase	+	+	+	−	−	+	+	+
Production of:								
Gas from glycerol	+	−	−	−	−	+	−	+
Gas from glucose	+	−	−	+	−	+	−	+
Indole in tryptone broth containing 0.1% tryptophan	+[c]	+[c]	+	+	+	−	+	+
Hydrogen sulfide from 2.5% peptone water	+	+	−	+	+	−	−[b]	+
KCN broth (Møller technique)	+	+	+	+	+	−	−	−
Lysine decarboxylase reaction (Møller technique)	−	−	+	−	−	−	−	+
	biotypes							
	1	2						
Voges-Proskauer reaction	+ −	+ −	+	−	−	−	−	+
Gluconate oxidase test	+ −	+ −		−	−	−	−	+
Breakdown of								
Galactose	+	+	−	+	+	+	+	+
Sucrose	d	+	−	d	+	−	+	+
Mannitol	+	+	+	d	+	+	−	+
Arabinose	d	+	−	d	+	+	−	+
Esculin	d	d	−	d	+	+	−	+

[a] + = positive; − = negative; d = some strains positive, some negative.
[b] May be a delayed positive reaction.
[c] Aberrant strains occur.

Table 83. Characteristics of the species of Aeromonas hydrophila subspecies hydrophila

	isolates (26 strains) Aeromonas	Bergey's Manual 8 ed. Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila
Growth in nutrient broth at 37 °C (water bath)	- (24/26)	+
Brown pigment (water-soluble) on trypticase soy agar	-	-
Ammonium ion and glucose as sole source of nitrogen and carbon	+	+*
Ammino acids as sole source of carbon		
L-Arginine	+ (18/26)	+
L-Asparagine		+
L-Histidine		+
L-Glutamic acid		+
L-Serine		+*
L-Alanine		d
Growth in nutrient broth containing 7.5 % NaCl	-	-
Butanediol dehydrogenase		+
Production of :		
Gas from glycerol	+ (23/26)	+
Gas from glucose	+	+
Indole in tryptone broth containing 0.1 % tryptophan	+ (23/26)	+*
Hydrogen sulfide from 2.5 % pepton water	+	+
KCN broth (Møller technique)	+	+
Lysine decarboxylase reaction (Møller technique)	-	-
		biotypes 1 2
Voges-Proskauer reaction	+ (15/26)	+ -
Gluconate oxidase test		+ -
Breakdown of		
Galactose	+	+
Sucrose	d (14/26)	d
Mannitol	+	+
Arabinose	-	d
Esculin	- (17/26)	d

cf. d : some strains positive, some negative
* : aberrant strains occur

した性状から Hafnia alvei と同定されるべきものと考えられるが、SAKAZAKI(1961)[118]は本菌種を Enterobacter hafnia と、また Ewing(1963)[119]は Enterobacter aerogenes subsp. hafnia とするよう提案している。そこで本供試菌の性状を Enterobacter が抱含する 2 species (E. cloaceae および E. aerogenes) と対比させると Table 84 に示すごとくであり、両種とは若干の差異が認められるので、本供試菌株は Hafnia alvei (Enterobacter sp.)と同定しておくこととした。さらに宇賀神の報告にみられるように、V. fischeri , A. hydrophila および H. alvei に同定されたこれらの各菌種は何れもそれぞれの種内において各菌株間の性状が極めて均質的であった。

考　　察

以上は前章までの微生物生態学的観察により認められたサケ科魚類の腸内細菌、すなわ

Table 84. Differentiation between Enterobacter cloacae and E. aerogenes

	isolates	Enterobacter	
	Enterobacter (27 strains)	1 cloacae	2 aerogenes
Gas produced from			
Glycerol	+	-	+
Inositol	-	-	d
Adonitol		d	+
Malonate as C source	+ (26/27)	d	+
Gelatin liquefaction	-	+*	+**
Esculin hydrolysis	-	-	+
Lysine decarboxylase	+	-	+
Arginine dihydrolase	-	+	-

cf. * : slow liquefaction, ** : very slow liquefaction

ち淡水生息魚ではAeromonas, Enterobacteriaceae および Pseudomonas、また海水生息魚ではVibrio が腸管内で優勢となる機構を知る手がかりを得るために、またAISO et al. (1968)[29] SERA and ISHIDA (1972a,b)[39,40]、SERA et al. (1972)[41] および著者(1976b)[62] が推察したような腸内細菌選択能が魚類に存在するか否かを確かめる目的で、前章までに供試した種々の試料から分離した多数の菌株より抽出した菌株について、まず冷水性・広塩魚類のサケ科魚類の生息環境に関連して日高およびHIDAKA and SAKAIの方法[85~87]による型別および発育温度域の検討を行い、次いで消化管内の環境に関連して低pH抵抗性、胆汁抵抗性および嫌気条件下での発育能を検討し、さらに腸内細菌叢を構成する代表的菌群について種の同定を行った結果である。まず広塩魚のサケ科魚類の腸内細菌叢におよぼす淡水・海水の両生息環境水の影響を観察するために行った日高およびHIDAKA and SAKAIの方法[85~87]による発育に対する海水中の主要無

機塩要求性に基づく型別において、淡水中に生息する時期に腸内細菌叢の主体を成す Aeromonas および Enterobacteriaceae はすべて陸型，海水中に生息する時期に腸内細菌叢の主体を成す Vibrio はすべて好塩型あるいは海洋型，また淡水中より漸次海水中に移行させた実験における供試魚および海洋より母川に遡上中の魚の腸内容物に由来する分離菌株では陸型および好塩型の両者が混在し（Table 70），サケ科魚類の腸内細菌叢は生息環境の変化に応じ淡水生息時にその主体を成した陸型の Aeromonas および Enterobacteriaceae は降海期に好塩型あるいは海洋型の Vibrio に置き換わり，海洋から河川へ遡上するにつれ，再び陸型の Aeromonas あるいは Pseudomonas，Enterobacteriaceae が出現するパターンが観察された。

次にサケ科魚類が冷水域に生息する魚種であることに関連し、腸内容物由来株についてその発育温度域の観察を行ったが、水温が上昇する夏季から秋季にかけその分布が比較的

高率となるEnterobacteriaceaeを除き、他の大部分の菌株は37℃において発育が不能であり、特に外洋生息魚由来株ではそのほとんどがいわゆる低温細菌（Psychrophile）であった。また生息環境水、飼育用餌料および海産プランクトン由来株においてもEnterobacteriaceaeおよびMicrococcusを除く大部分の菌株は37℃で発育せず、これらの菌叢を構成する菌株は低温下の生息環境で十分発育し得ることが観察された（Table 72 および Table 73）。

魚類の消化管内のpHに関しては、主として海産魚類について、また淡水魚としてはコイについて報告がなされているが[120,121]、淡水産有胃魚に関する報告は寡聞にして少ない。そこで森支場における飼育魚について、給餌1.5～2時間後の胃および腸内容物のpHを測定した結果、胃内容物のpHは2.0～5.0，腸内容物は6.8～8.0の範囲内で測定された。一方溯上魚の胆汁のpHは平均7.4と測定され（Table 74）、胃で酸性となった消化物が幽門垂へ移って次第

に中性化し、さらに腸内においてアルカリ性になって消化吸収が行われる様子が推察された。すなわちこの経過は温血動物のそれと大差ないものと考えられる。なお海水生息時のサケ科魚類についての観察は行わなかったが、尾崎 (1972 a.b)[120,121] の総説にみられる多くの海産魚類における報告例やスズキの消化管内のキチン分解細菌の分布に関する奥谷ら (1964)[36] の報告例から推察し、海水生息時における消化管内のpHもほぼ同様の傾向を示すものと考えられる。

腸内細菌叢を構成する細菌群は、上記のような胃内の酸性環境および胆汁に対する耐性を有することが考えられるので、分離試料別の分離株について低pHおよび胆汁に対する抵抗性を瀬良・木俣 (1972)[32] の方法に準拠して測定したが、腸内容物由来の Enterobacteriaceae, Aeromonas および Vibrio は低pHおよび胆汁の双方に抵抗性を示し、その他の試料に由来する同一菌群に比較して強い抵抗性を示した。さ

らに生息環境水および餌料生物由来の Entero--bacteriaceae および Aeromonas においても同様の傾向を示したが、Vibrio については腸内容物由来株と生息環境水および餌料生物由来株との間に、これらの抵抗性において統計上かなりの差が認められ (Table 75)、後者における低pHおよび胆汁に抵抗性を示す Vibrio が腸管内に入り、そこで増殖することが推察され、この結果は AISO et al. (1968)[29] SERA and ISHIDA (1972a,b)[39,40], SERA et al. (1972)[41] および著者 (1976b)[42] の報告を支持するもので、これらは腸内細菌叢形成に関与する魚体側の菌種選択能における一因子であることが推察された。

またサケ科魚類の腸管は形態学的にその構造が温血動物に較べ比較的単純であるが、腸管内は体表・鰓などと異り嫌気的な環境と考えられることから、分離試料別の分離菌株について、嫌気的条件下での発育能を観察した結果、腸内容物由来の Aeromonas, Enterobacteriaceae および Vibrio は他の genus に較べ、嫌気的条

件下での発育の可能な菌株が高率であり（Table 76）、このことも腸管内における微生物生態学上、腸内細菌叢形成に関与する一因子になり得ることが推察された。

さらにサケ科魚類の腸内細菌叢を構成する代表的な3菌群、すなわち Aeromonas, Entero-bacteriaceae および Vibrio から抽出した若干の菌株について Bergey's Manual, 8ed. (1974)[91] に準拠して同定を試みた結果，供試した Aeromonas 26株はすべて A. hydrophila，Vibrio の全21株は V. fischeri また Enterobacteriaceae の全27株は Hafnia alvei (Enterobacter sp.) に同定され、先に宇賀神 (1974)[112] が同一の供試菌株について、SCHUBERT (1967)[113]，COWAN and STEEL (1965)[114]，BASCOMB et al. (1971)[115] ならびに HENDRIE et al. (1971)[116] らの方法を参照して分類・同定した結果と同様の結果に帰着し、Bergey's Manual, 7ed. (1957)[65] で同定が出来なかったこれらの供試菌株は、改版された同書 8ed. (1974)[91] によって完全に同定し得られた。また宇賀神 (1974)[112] が指摘し

たように、各供試菌群内の菌株の性状はきわめて均質的であり、この結果はサケ科魚類における腸内細菌叢形成において、魚体側における菌種選択能の存在を示唆するものと考えられる。

小　　括

前章までの微生物生態学的観察により認められたサケ科魚類の腸内細菌が腸管内で優勢となる手がかりを得るために、前章までに供試した種々の試料から分離した多数の菌株より抽出した菌株について、まず冷水性・広塩魚類のサケ科魚類の生息環境に関連して日高らの方法[85-87]による型別を行い、また発育温度域を検討し、次いで消化管内の環境に関連して低pH抵抗性、胆汁抵抗性および嫌気条件下での発育能を観察し、さらに腸内細菌叢を構成する代表的菌群について種の同定を行って次のごとき結果を得た。

1. サケ科魚類の腸内細菌叢は、生息環境水の影響をうけ、淡水生息時は日高らのいわゆる陸(T)型の Aeromonas および Enterobacteriaceae，海水生息時は好塩(H)型あるいは海洋(M)型の Vibrio により構成され、これらはサケ科魚類の生活史上の生息環境にしたがって交互に変化することが観察された。

2. サケ科魚類の腸内細菌の性状において、魚体側の菌種選択能に関連し、次の4傾向が観察される。

(1). 低温下での増殖が可能。

(2). 胃酸の低pHに対し抵抗性を示す。

(3). 胆汁に対し抵抗性を示す。

(4). 腸管内の嫌気的条件下で増殖が可能。

3. サケ科魚類の腸内細菌叢を構成する代表的なる菌群、すなわち Aeromonas，Enterobacteriaceae Vibrio より抽出した分離菌株は、すべてそれぞれ Aeromonas hydrophila，Hafnia alvei (Entero-bacter sp.) および Vibrio fischeri に同定された。すなわち各菌群中の菌株の性状はきわめ

て均質的であり、サケ科魚類における腸内細菌叢形成において魚体側の菌種選択能の存在が示唆された。

総合考察

本稿第1章から第6章まではサケ科魚類の生活史を通して腸内細菌叢を、生息環境水、人工餌料あるいは餌料生物の細菌叢との関連から微生物生態学的に観察した結果であり、また第7章は、第6章までに供試した種々の試料から分離した菌株について、腸内菌叢形成に関連する魚体側の菌種選択能に関して検討し、さらに菌種選択能の存在を確認する意味から主要な腸内細菌叢についてBergey's Manual, 8ed. (1974)[91]に準拠して種(species)の同定を行ったものであるが、以上の結果を総合的に考察すると以下述べるとおりである。

第1章で観察した淡水および海水飼育魚の腸内容物中の生菌数はかなり個体差が認められたが、いずれにおいても10^3～10^8/gの範囲内で測定され、淡水飼育魚では淡水培地また海水飼育魚の場合は海水培地においてそれぞれ高い生菌数が測定され、飼育環境水の相違が

腸内細菌の生態に影響を与えることが推察された。またそれらの腸内細菌叢は、それぞれの飼育環境水において菌叢の主体をなすgenus Achromobacter, Flavobacterium / Cytophaga, Pseudomonasなどとは明らかに異り、淡水飼育魚では陸(T)型のgenus Aeromonasおよびfamily Enterobacteriaceae, 海水飼育魚では好塩(H)型もしくは海洋(M)型のgenus Vibrioがそれぞれ腸内細菌叢の主体をなし、淡水魚と海水魚の腸内菌叢に明確な相違のあることが観察された。

この結果はgenus Aeromonas, Enterobacter, Pseudomonas, Bacillus, Acinetobacterなどを淡水魚の腸内菌叢の主要構成員と考えるMATTHEIS (1966 a.b.c.d)[54~56,22]、錘・郭 (1973)[57] TRUST (1974, 1975)[58.59]の報告を肯定する結果であり、一方海産魚についてはVibrioをその優勢種であると考えるLISTON (1957)[25], OKUTANI (1966)[28], AISO et al. (1968)[29] SHIMIDU and HASUO (1968)[30], 奥積・堀江 (1969)[31], 瀬良・木俣 (1972)[32]の見解や生息環境の菌叢に比較して腸内からはVibrioがより高率に検

出されるとするCOLWELL (1962)[26], SHRIVASTAVA and FLOODGATE (1966)[27], NEWMAN et al. (1972)[35]などの報告と一致する結果である。

そこで淡水飼育魚と海水飼育魚の腸内菌叢の相違が如何なる理由に基くものであるかを知る目的で、第2章においては飼育水中の海水割合を人為的に漸次高めつつ供試魚を淡水環境から海水環境へ移行させる実験において、供試魚を給餌群と非給餌群に分け、海水への移行過程中における腸内生菌数とその菌叢の変遷を観察し、併せて淡水中で終始餌止め飼育した供試魚を対照に、餌止め飼育の腸内生菌数とその菌叢に及ぼす影響を観察した。その結果、給餌群における腸内生菌数は海水への移行実験期間中を通じほぼ一定に経過し、またその腸内細菌叢は実験開始時において主体を成していた陸型のAeromonasが海水割合の増加と共に漸次陸型もしくは好塩型のPseudomonasに置き換わり、遂には好塩型のVibrioがその主体を占めるに至る経過が実験

的に観察された。このことは第1章における淡水飼育魚と海水飼育魚の腸内菌叢の相違、すなわち淡水飼育魚では陸型のAeromonasおよびEnterobacteriaceae，海水飼育魚では好塩型もしくは海洋型のVibrioがその主体を成すことを観察した所見を実験的に証明し得たものと考えられる。

また第1章および第2章における供試魚の給餌群は、森支場、忍路湾飼育場および栽培漁業センターの3ヵ所でそれぞれ異る餌料で飼育されたにもかかわらず、それらの腸内菌叢は飼育用水や餌料にみられる菌叢とは異る淡水飼育魚および海水飼育魚のそれぞれに特異的な菌叢が認められた。さらに腸内容物、飼育環境水および餌料から分離されたそれぞれの代表株について低pH(5.5)抵抗性、胆汁(2%)抵抗性および嫌気条件下での発育能を検討した結果、腸内容物由来株は菌種による差異はなく低pHおよび胆汁に対し抵抗性を示し、また嫌気条件下でも良好に発育するものが他に

較べ明かに高率であり、AISO et al. (1968)[29]，瀬良・木俣 (1972)[32]，SERA and ISHIDA (1972 a·b)[39.40] SERA et al. (1972)[41] の報告にみられるごとく魚体側の腸内菌叢に対する菌種選択能の存在が推察された。

一方非給餌群における腸内生菌数は淡水、海水飼育の如何にかかわらず、漸減する傾向が認められ、その菌叢は前者では Aeromonas、後者では Vibrio がそれぞれの主体を成し、これらは少くとも本実験実施期間の約10日間は腸管内に維持されることが確認された。このことは摂餌物を容れていない腸管あるいは絶食後の腸内からは細菌が検出されないと報告しているGILLEPSIE (1898)[11]、OBST (1919)[12]、HUNTER (1920)[13]，BLAKE (1935)[14]、MARGOLIS (1953)[16] 反町・江草 (1971)[21] らの見解とは若干異り、魚体が極度に衰弱しない限り可成り長期間にわたり腸内細菌の検出が可能であると考えられる。なお広塩性魚のサケ科魚類は生息環境水の浸透圧変化に対応する手段として、海水

環境に移行する際のいわゆる“水飲み現象”なる行為が知られている[88~90]。このことに関連して海水への移行実験過程における非給餌群および海水飼育魚における非給餌群の腸内生菌数は、飼育用水の菌数に比較して、きわめて少なかったことから、海水飼育魚の腸内生菌数は海水よりむしろ摂餌による影響が大きいものと推察された。

以上はいずれも人為的に限られた条件下で飼育されたサケ科魚類についての観察結果であるが、自然環境に生息するサケ科魚類においても、飼育魚で観察された結果と同様の所見が得られるか否かを確めるために、第3章では、まず河川および湖沼で捕獲したサケ科魚類を対象に、その腸内生菌数と菌叢について観察を行った。その結果、自然環境生息魚の腸内容物における生菌数は、飼育魚同様に10^2~10^8/gの範囲内でかなりの個体差が認められたが、季節的には一般に水温の上昇し始める早春から夏季にかけて多く、水温の低下す

る晩秋から冬季にかけて少くなる傾向が観察された。特に厳冬期では魚の生活活動が低下し、摂餌も不活発となることが考えられるが、この時期には腸内生菌数は著しく減少し、前述したように腸内生菌数は魚の摂餌活動と関連することが推察された。

またそれらの腸内菌叢は生息環境水あるいは餌料生物（プランクトン）における菌叢、すなわち Flavobacterium / Cytophaga, および Pseudomonas のほか、Aeromonas, Enterobacteriaceae Achromobacter などにより構成される菌叢と異り全般的に Aeromonas および Enterobacteriaceae の占める割合が高く、季節的には春季から夏季にかけて Aeromonas, 秋季には Enterobacteriaceae の占める割合が上昇し、冬季は腸内生菌数の減少とともに Coryneforms, Pseudomonas の検出率が相対的に高くなる傾向が観察された。このような冬季間に観察される結果は、長期間の絶食などによる魚体の活力低下あるいは生理機能の低下などに起因するものと推察される。

しかし周年を通じてみると、第1章および第2章における淡水飼育魚の観察結果と同様にAeromonas の占める割合が高く、Aeromonasは淡水生息魚の腸内菌叢における主要構成員であることが観察された。

次に第4章においては自然環境における海産魚類を対象に、その腸内生菌数と菌叢について観察を行った。なお、夏季の比較的高水温期においてわが国の沿岸海水やプランクトンからはVibrio が高率に検出されることが、清水・相磯 (1962)[92]、金子ら (1969)[80]、SHIMIDU et al. (1971)[98] らによって報告されているが、そのため必然的に沿岸海域での飼育魚や自然生息魚からもVibrio が高率に検出されることが推察されている[80~84, 98]。そこで第4章では外洋に遊泳するサケ科魚類ならびに外洋あるいは沿岸域に生息する数種の底棲魚類を対象に同様の観察を行ったが、その結果第1章における海水中で飼育された供試魚の場合と同様に、外洋のサケ科魚類および数種の底棲魚

類の腸内容物中の生菌数はともにかなり個体差が認められたが、10^2～10^7/gの範囲内で測定され、さらに外洋のサケ科魚類においてその腸内生菌数は腸内容物量に比例する傾向が認められ、前述のごとく腸内生菌数は摂餌活動に関連することが推察された。また腸内菌叢については、ベーリング海ならびに北海道恵山沖のサケ科魚類4種および数種の底棲魚のいずれにおいても、Vibrioは腸内からの分離菌株の61～69%を占め、前述の海水中の飼育魚のみならず、海洋生息魚においてもVibrioはそれらの腸内菌叢の主体を成すことが観察された。

また北海道十勝沖で採集した動物プランクトンからもVibrioが高率に検出され、上記の腸内菌叢に占めるVibrioの比率および腸内生菌数と腸内容物量との相関性から、海洋生息魚の腸内菌叢においてVibrioがその主体を成すことは食物連鎖による結果とも推察されたが、一方ベーリング海における生息環境水お

よび餌料生物からはVibrioはほとんど検出されないにもかかわらず、同海域で漁獲されたサケ科魚類および底棲魚の腸内容物からはVibrioが高率に検出され、みかけ上食物連鎖との相関傾向は認められなかった。すなわち海洋生息魚の腸内菌叢の主体を成すVibrioの来源は、単に食物連鎖のみでは説明し得られず、魚体側の菌種選択能および選択された菌種の腸管内定着性あるいは増殖能などについても検討されねばならないが、この問題については後述する第7章において若干の検討を行った。なおベーリング海で漁獲されたサケ科魚類および底棲魚のいずれにおいても、それらの腸内菌叢を構成するVibrio, Achromobacter, およびAeromonasのそれぞれの約40%が発光性を有した。これらはBergey's Manual, 8ed. (1974)[91]によればgenus Photobacteriumに分類されるべきもので、海産魚の腸内からは発光性細菌が高率に検出されることを指摘しているLISTON (1954)[95], SPENCER (1961)[96], SHEWAN (1970)[97], らの報告

に一致し、またベーリング海で採集した動物プランクトン試料では Vibrio の検出率はきわめて低率であったが、十勝沖の試料からは高率に検出され、わが国沿岸海域においては高水温期に Vibrio が高率に分布するという清水・相磯 (1962)[92]，金子ら (1969)[80] SHIMIDU et al. (1971)[98] らの報告と一致する結果であった。

次に、本研究の対象魚，すなわちサケ科魚類はその習性上産卵期に海洋から母川へ遡上するが、この時期の生活環境水は第2章において人為的に供試魚を淡水環境から海水環境へ移行させた実験とは逆に、海水環境から淡水環境への移行である。したがって遡上魚の腸内細菌叢が第2章の結果と逆の方向に推移するかどうかは興味ある問題である。第5章においては遡上中に捕獲され淡水池で約3ヵ月間蓄養中の遡上カラフトマスおよび産卵のため遡上中のサケ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を対象に、それらの腸内生菌数とその菌叢の観察を

行った。

遡上魚の腸内生菌数はかなり個体差がみられたが、第1章における飼育魚および第3章および第4章の自然環境生息魚の観察結果とほぼ同様に10^2～10^8/gの範囲内で測定され、産卵遡上期あるいは接岸期のサケの消化管内は無菌的状態にあると報告しているHUNTER (1920)[13]およびBLAKE (1935)[14]の観察とは明らかに異り、特に蓄養中のカラフトマスでは淡水中で約3ヵ月間給餌されずに蓄養されていたにもかかわらず腸内生菌数はかなり多く、この所見はマス類においてその腸内生菌数は絶食によりかなり減少したが、4.5ヵ月の絶食後においてもなお腸内から細菌が検出されたとするMATTHEIS (1966d)[22]の見解を支持する結果であった。これに対し終始淡水池で飼育された成熟期のサクラマスにおいては一般に生菌数は少く、約1ヵ月間の餌止め飼育の影響が推察された。

また腸内菌叢については、遡上魚では好塩

型の Vibrio と Pseudomonas および陸型の Pseudomonas と Aeromonas，一方淡水池で飼育された成熟期のサクラマスでは陸型の Aeromonas および酵母がそれぞれの菌叢の主体を成すことが観察された。

供試した蓄養中の湖上カラフトマスおよび湖上中のサケは、いずれも同一の河川（ユーラップ川）を湖上中に捕獲されたもので、生息環境水が海水から淡水へ変わる過程の魚であるが、第2章において人為的に淡水環境から海水環境に移行させた実験において観察された環境水と腸内菌叢の関係は逆の方向でよく一致し、腸内菌叢は生息環境に応じ変化すると推察した第2章における実験的観察結果を自然環境の生息魚において実証したものと考えられる。

以上これまでのサケ科魚類の生活史にそって観察した腸内菌叢の微生物生態学的研究における知見をまとめると、サケ科魚類の腸内菌叢は淡水生息時は陸型の Aeromonas および

Enterobacteriaceae あるいは Pseudomonas，海水生息時は Vibrio がそれぞれその主体を成し、この腸内菌叢でみられるパターンは宿主魚が河川から海洋へ、また海洋から河川へ移動する場合、その生息環境に応じ漸次変化することを示すものと考える。

そこでこのような腸内菌叢が孵化後の稚魚成長過程における如何なる時期にどのようにして形成されるかを知る目的で、第6章においてはサクラマスおよびサケを対象に、それらの胚胎期から稚魚期に至る過程中の卵表面，孵化稚魚の体表・腸ノウ内容物・消化管，浮上稚魚および春稚魚の腸内容物などについて、飼育用水および餌料を含めた微生物生態学的観察を行った。

まず胚胎期の卵表面からは卵重量g当り 10^4 ～ 10^6 の範囲内で発眼期をピークとする生菌数が測定されたが、孵化直後における稚魚の腸ノウ内容物から細菌は検出されず、一方体表からは体重g当り 10^2 ～ 10^3 の生菌数が測定され

た。それらの菌叢については、卵表面では飼育環境水の菌叢とは異り、特にFlavobacteriumが高率に検出され、BELL et al.(1971)[109]の報告に一致する結果を示したが、稚魚の体表は飼育環境水の菌叢に類似することが観察された。

次に孵化稚魚から春稚魚に至る期間において、孵化稚魚の消化管の生菌数は10^3/g以下であったが、浮上稚魚および春稚魚の腸内容物からは10^3～10^7/gの範囲内で生菌数が測定された。また菌叢については、腑ノウを持つ時期の孵化稚魚の腸内容物ではPseudomonas, Coryneforms, Flavobacteriumなどがその菌叢の主体を成し、この時期においては未だ摂餌により取り込まれる飼育用水および餌料の菌叢の影響が認められたが、腑ノウ吸収後の浮上稚魚に至るとその影響も徐々に消え、Aeromonasの占める割合が増加してくることが観察された。この時期には消化管が発達し、各種の消化腺も機能化することが知られているが[111]、この時期に腸管特有の微生物環境が形成され、

その環境に適応したものが正常菌叢として定着するものと考えられる。

第7章においては、このような腸内菌叢形成に関連する魚体側の菌種選択能について若干の検討を試みたが、以上の各供試魚の腸内容物に由来する分離菌株は、生息環境水および餌料由来の分離菌株に較べ、低pHおよび胆汁に対する抵抗性が高く、また嫌気条件下で発育するものが高率であった。さらに腸内菌叢の主要構成員のAeromonas Enterobacteriaceaeおよびvibrioに分類された各菌群から抽出した分離菌株における分類学的検討において、各菌群内の均質性はきわめて高く、genus Aeromonasに属する菌株はすべてAeromonas hydrophila subspecies hydrophila, family Entero--bacteriaceaeに属す菌株はHafnia alvei (Enterobacter sp.), genus Vibrioに属す菌株はVibrio fischeriときわめて限られたspeciesに同定され、魚類消化管内における菌種選択能の存在が推察された。

結　　論

本研究で得られた知見を総括して結論すれば次のとおりである。

1. 健康状態にあるサケ科魚類の腸内細菌叢は、孵化稚魚の臍ノウが吸収され、消化管が機能化する浮上稚魚あるいは春稚魚の時期において、生活環境の菌叢とは異る菌叢、すなわちgenus Aeromonasおよびfamily Enterobacteriaceaeあるいはgenus Pseudomonasを主体とする菌叢によって形成され、これらの菌群は本魚種が淡水域に生活する間を通じ優勢種として経過する。

2. その後の降海過程において、これらの陸型の菌群は、徐々に好塩型あるいは海洋型のgenus Vibrioにより置き換り、海洋生活時においてはVibrioが腸内細菌叢の最優勢種として終始する。

3. このようなものが産卵期に母川へ遡上する時期に至ると、腸内細菌叢の主体は再び陸

型の genus Aeromonas などに徐々に置き換わる。すなわち生活環境の変化に伴い、腸内細菌叢の構成が変換することが知られた。

4. 以上のように淡水生息期および海洋生息期においてそれぞれ特異的腸内細菌叢の観察されたことは、魚体側における菌種選択能によることが実験的に示唆された。

謝　　辞

稿を終るに当り、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜わり、また厳密なる御校閲をいただいた北海道大学水産学部坂井稔教授，秋場稔教授、水村喬久助教授ならびに信濃晴雄助教授に深甚なる謝意を表するとともに、本研究遂行にあたり貴重なる試料、施設の提供ならびに種々の御便宜、御援助を頂いた北海道大学練習船おしょろ丸船長藤井武治教授ならびに乗組員各位，北海道立水産孵化場（魚病科長）栗倉輝彦博士，同森支場前場長米田嘉夫氏，現場長内山正昭氏をはじめ、阿刀田光紹氏ならびに同場各位，北海道立栽培漁業センター前場長結城了伍博士および場員各位，室水産株式会社寺田稔氏，北海道さけ・ますふ化場小林哲夫博士，同千歳支場　支笏湖事業場長安田貞男氏、同渡島支場前場長麓竜司氏はじめ同場各位に衷心より感謝申し上げる。

また本研究遂行上適切な御助言と種々御指

導を頂いた北海道大学水産学部微生物学講座絵面良男博士および田島研一教官に心から感謝申し上げる。

文　　献

1. 坂崎利一　1964：健康動物における細菌叢　獣医微生物学　上巻（平戸勝七編）養賢堂　東京，pp. 62～72.

2. 上野一恵　1968：正常菌叢　嫌気性菌と嫌気性菌症（小酒井望・鈴木祥一郎編）医学書院　東京　pp. 272～297.

3. 佐々木正五　1970：常在菌叢の生物学的意義　日本細菌学雑誌　25，79～94.

4. 光岡知足　1974：腸内菌叢と宿主　モダンメディア　20，94～111.

5. Reed, G.B. and C. M. Spence　1929：The intestinal and slime flora of the haddock. Contr. Can. Biol. Fish., 4, 259～264.

6. Stewart, M.M.　1932：The bacterial flora of the slime and intestinal contents of the haddock. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 18,

35 ~ 50.

7. GIBBONS, N.E. 1934a : The slime and intestinal flora of some marine fishes. Contr. Can. Biol. Fish., 8, 257 ~ 290.

8. DYER, F. E. 1947 : The microorganism from Atlantic cod. J. Fish. Res. Bd. Can., 7, 128 ~ 136.

9. HARRISON, F. C. 1929 : The discoloration of halibut. Can. J. Res., 1, 214 ~ 239.

10. GIBBONS, N. E. 1934b : Lactose fermenting bacteria from the intestinal contents of marine fish. Contr. Can. Biol. Fish., 8, 291 ~ 304.

11. GILLEPSIE, A. L. 1898 : Fishery Board for Scotland, 23. (Quoted by OBST [12])

12. OBST, M.M. 1919 : A bacteriologic study of sardines. J. Infect. Dis., 24, 158 ~ 169.

13. HUNTER, A. C. 1920 : Bacterial decomposition

of salmon. J. Bacteriol., 5, 353 ~ 361.

14. Blake, I. 1935 : Some observations on the bacterial flora of the alimentary tract of certain salmonidae. Final Rep. Furuncul. Comm. App. B.H.M. Stationary Office Edinburgh, 60 ~ 67.

15. Margolis, L. 1952 : Aerobic bacteria in the intestines and slime of the pike in lake Monroe, Quebec. Rev. Can. Biol., 11, 20 ~ 48.

16. Margolis, L. 1953 : The effect of fasting on the bacterial flora of the intestine of fish. J. Fish. Res. Bd. Can., 10, 62 ~ 63.

17. Shewan, J.M., G. Hobbs and W. Hodgkiss 1960a: A determinative scheme for the identification of certain genera of gram-negative bacteria, with special reference to the Pseudomonaceae. J. appl. Bact., 23, 379 ~ 390.

18. Shewan, J.M., G. Hobbs and W. Hodgkiss 1960b:

The Pseudomonas and Achromobacter group of bacteria in the spoilage of marine white fish. ibid., 23, 463 ~ 468.

19. SHEWAN, J.M. 1961 : The microbiology of sea water fish. in "Fish as Food" (ed. by G.I. BORGSTON), Academic Press, New York, pp. 487 ~ 560.

20. 清水 潮 1975 : 海産魚類およびプランクトンの微生物叢 微生物の生態(2)-相互作用をめぐって (微生物生態研究会編) 東大出版会 東京 pp. 71 ~ 86.

21. 反町 稔・江草周三 1971 : 養殖ウナギの腸内好気性細菌について 魚病研究 6, 1 ~ 7.

22. MATTHEIS, Th. 1966d : Ökologie der Bakterien im Darm von Süßwassernutzfischen - IV. Familie Corynebacteriaceae, Gattung Bacillus. Zeit. für Fish., 12, N.F. 581 ~ 600.

23. SHEWAN, J.M. 1938 : The strict anaerobes in the

slime and intestines of the haddock. J. Bacteriol., 35, 397 ~ 407.

24. Liston, J. 1956 : Qualitative variation in the bacterial flora of flatfish. J. gen. Microbiol., 15, 305 ~ 314.

25. Liston, J. 1957 : The occurence and distribution of bacterial types of flatfish. ibid., 16, 205 ~ 216.

26. Colwell, R. R. 1962 : The bacterial flora of Puget Sound fish. J. appl. Bact., 25, 147 ~ 158.

27. Shrivastava, K. P. and G. D. Floodgate 1966 : Studies on the intestinal microflora of the dab. J. Mar. biol. Ass. India, 8, 1 ~ 7.

28. Okutani, K. 1966 : Studies of chitinolytic systems in the digestive tracts of Lateolabrax Japonics. Bull. Misaki Mar. Biol. Inst. Kyoto Univ., 10, 1 ~ 47.

29. Aiso, K., U. Shimidu and K. Hasuo 1968 : Microflora in the digestive tract of inshore

fish in Japan. J. gen. Microbiol., 52, 361 ~ 364.

30. SHIMIDU, U. and K. HASUO 1968 : Salt dependency of the bacterial flora of marine fish. ibid., 52, 347 ~ 354.

31. 奥積昌世・堀江 進 1969 : 海産魚腸管内の細菌叢について 日水誌 35, 93 ~ 100.

32. 瀬良 洋・木俣正夫 1972 : 海産魚類消化管の細菌叢 - I マダイ、チダイの細菌叢におよぼす餌料成分の影響 同誌 38, 50 ~ 55.

33. GEORGALA, D.L. 1958 : The bacterial flora of the skin of North Sea cod. J. gen. Microbiol., 18, 84 ~ 91.

34. RAE, B.B. 1965 : Growth and food in the lemon sole. Fishing News, Ltd. London

35. NEWMAN, J.T., B.J. COSENZA and J.D. BUCK 1972 : Aerobic microflora of the bluefish intestine. J. Fish. Res. Bd. Can., 29, 333 ~ 336.

36. 奥谷康一・早崎幸夫・木俣正夫 1964：水産動物の消化管に存在するキチン分解細菌に関する研究－Ⅰ スズキ消化管内のキチン分解細菌数について 日水誌 30, 926～929.

37. 奥谷康一・来田秀雄 1968a：水産動物の消化管に存在するキチン分解細菌に関する研究－Ⅱ Vibrio gerrisの有機酸生成作用について 同誌 34, 88～92.

38. OKUTANI, K. and H. KITADA 1968b : Studies on chitin-decomposing bacteria present in the digestive tract of aquatic animals - Ⅲ. Formation of organic acids. ibid., 34, 1141～1146.

39. SERA, H. and Y. ISHIDA 1972a : Bacterial flora in the digestive tracts of marine fish - Ⅱ. Changes of bacterial flora with time lapse after ingestion of diet. ibid., 38, 633～637.

40. SERA, H. and Y. ISHIDA 1972 b : Bacterial flora in the digestive tracts of marine fish - Ⅲ. Classification of isolated bacteria. ibid., 38, 853 ~ 858.

41. SERA, H., Y. ISHIDA and H. KADOTA 1972 : Bacterial flora in the digestive tracts of marine fish - Ⅳ. Effect of H^+ concentration and gastric juices on the indigenous bacteria. ibid., 38, 859 ~ 863.

42. GELDRICH, E.E. and N.A. CLARKE 1966 : Bacterial pollution indicators in the intestinal tract of freshwater fish. Appl. Microbiol., 14, 429 ~ 437.

43. 小野精美・西塚肥喜・横道輝久子・古谷美律枝・柏倉孝子 1973 : 水生昆虫の携行細菌について 日本公衛誌 20, 257 ~ 261.

44. STRASDINE, G.A. and U. DUBETZ 1974 : Coliform flora of migrating sockeye

salmon. J. Fish. Res. Bd. Can., 31, 1559 ~ 1560.

45. 谷川英一・中村誠一 1938：植物性養魚人工餌料試験 第2報 食性による魚類消化管内菌叢に就いて 水産試験調査試料 第5号 32 ~ 59.

46. 柏田研一・手島新一 1966a：魚類の腸内細菌によるビタミンB群の消長 -I. コイの腸内細菌によるニコチン酸・パントテン酸およびビタミンB_{12}の消長 日水誌 32, 961 ~ 966.

47. 柏田研一・手島新一 1966b：魚類の腸内細菌によるビタミンB群の消長 -II. コイの腸内細菌によるチアミンおよびリボフラビンの消長 鹿大水紀要 15, 1 ~ 7.

48. 手島新一・柏田研一 1967：魚類の腸内細菌によるビタミンB群の消長 -III. ビタミンB_{12}合成菌の分離とその性状 日水誌 33, 979 ~ 983.

49. 手島新一・柏田研一　1969：魚類の腸内細菌によるビタミンB群の消長-Ⅳ. コイの腸内細菌によるニコチン酸の生産　鹿大水紀要　18, 87 ~ 91.

50. KASHIWADA, K., S. TESHIMA, and A. KANAZAWA　1970：Studies on the production of B vitamins by intestinal bacteria of fish - Ⅴ. Evidence of the production of vitamine B_{12} by microorganisms in the intestinal canal of carp.　Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 36, 421 ~ 424.

51. 富山哲夫・大庭信良　1967：金魚のビオチン要求について　同誌　33, 448 ~ 452.

52. 橋本芳郎　1953：コイに対する B_{12} 及び抗菌性物質の効果　同誌　19, 899 ~ 903.

53. JANKOV, G. Y.　1968：Recherches sur la microflore intestinale des carpes atteintes d'hydropisie infectieuse.

Bull. Off. int. Epiz., 69, 1057 ~ 1072.

54. MATTHEIS, Th. 1966 a : Ökologie der Bakterien im Darm von Süßwassernutzfischen - I. Familie Pseudomonadaceae, Gattung Pseudomonas. Zeit. für Fish. N.F., 12, 507 ~ 535.

55. MATTHEIS, Th. 1966 b : Ökologie der Bakterien im Darm von Süßwassernutzfischen - II. Familie Pseudomonadaceae, Gattung Aeromonas, Familie Achromobacteraceae, Gattung Achromobacter, Flavobacterium. ibid., 12, 537 ~ 559.

56. MATTHEIS, Th. 1966 c : Ökologie der Bakterien im Darm von Süßwassernutzfischen - III. Familie Enterobacteriaceae, Gattung Escherichia, Aerobacter, Paracolobactrum, Proteus. ibid., 12, 561 ~ 580.

57. 鍾 虎雲・郭 光雄 1973 : 魚體常有細菌之研究-I 存在於外觀健康之鰻魚之鰓腸血液及內臟之細菌 臺灣

水産學會刊　第二卷　第二期　20 ~ 25.

58. TRUST, T. J. 1974 : The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. Can. J. Microbiol., 20, 1219 ~ 1228.

59. TRUST, T. J. 1975 : Facultative anaerobic bacteria in the digestive tract of chum salmon maintained in fresh water under difined culture condition. Appl. Microbiol., 29, 663 ~ 668.

60. YOSHIMIZU, M. and T. KIMURA 1976 : Study on the intestinal microflora of salmonids. Fish Path., 10, 243 ~ 259.

61. 吉水　守・木村喬久・坂井　稔　1976a : サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究-I　飼育魚の腸内細菌数と細菌叢　日水誌　42, 91 ~ 99.

62. 吉水　守・木村喬久・坂井　稔　1976b : サケ科魚類の腸内細菌叢に関する

研究-Ⅱ　人為的海水移行および飼止め飼育の腸内細菌叢におよぼす影響　同誌　42，863 ～ 873．

63．吉水　守・木村喬久・坂井　稔　1976d：サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究-Ⅳ　河川および湖沼棲息魚の腸内細菌叢　同誌　42，1281 ～ 1290．

64．吉水　守・木村喬久・坂井　稔　1976e：サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究-Ⅴ　溯河魚の腸内細菌叢　同誌　42，1291 ～ 1298．

65．Breed, R. S., E. G. D. Murray, N. R. Smith, and Ninety-four Contributors　1957：Bergey's manual of determinative bacteriology. 7 ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore 1094 P.

66．Bornside, G. H. and I. Cohn　1965：The normal microbial flora. Comparative bacterial flora of animals and man. Ame. J.

Digestive Dis., 10, 844 ~ 852.

67. SMITH, W. 1965 : Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. J. Path. Bact., 89, 95 ~ 122.

68. DUBOS, R. 1966 : The microbiota of the gastrointestinal tract. Gastroenterology, 51, 868 ~ 874.

69. 瀬良 洋・石田祐三郎 1975 : 魚類消化管内のミクロフローラ形成について、微生物の生態(2)-相互作用をめぐって(微生物生態研究会編) 東大出版会 東京 pp. 53 ~ 70.

70. 尾崎久雄 1972 : 腸内細菌 魚類生理学講座 第4巻 消化の生理[下] 緑書房 東京 pp. 296 ~ 306.

71. 青木 宙・渡辺 力 1973 : ウナギの養殖池および腸管より分離された薬剤耐性菌の研究 同水誌 39, 121 ~ 130.

72. 青木　宙・江草周三・渡辺　力　1972：水産養殖における薬剤耐性とR因子　日本細菌学会誌　27，762～767．

73. AOKI, T. and S. EGUSA　1971：Drug sensitivity of *Aeromonas liquefaciens* isolated from fresh water fish．　Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 37，176～185．

74. ZOBELL, C. E.　1941：Apparatus for collecting water samples from different depth for bacteriological analysis．　J. Marine Res., 4，173～188．

75. 中村　浩　1957：海洋微生物　微生物ハンドブック（微生物ハンドブック編集委員会編）技報堂　東京　pp. 610～623．

76. 谷川英一・坂井　稔　1960：水産微生物学　恒星社厚生閣　東京　814 p.

77. HUGH, R. and E. LEIFSON　1953：The taxonomic significans of fermentative versus oxidative

metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. J. Bacteliol., 66, 24 ~ 26.

78. LEIFSON, E. 1963 : Determination of carbohydrate metabolism of marine bacteria. ibid., 85, 1183 ~ 1184.

79. KOVACS, N. 1956 : Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidase reaction. Nature, 29, 703.

80. 金子精一・長南茂樹・武原文三郎・小金井正一 1969 : 鮮魚の微生物叢に関する衛生学的研究-I 東京湾内水の微生物叢 日獣会誌 22, 15 ~ 20.

81. 金子精一 1970 : 鮮魚の微生物叢に関する衛生学的研究-II マアジの鮮度低下にともなう微生物叢の推移 同誌 23, 380 ~ 385.

82. 金子精一 1971a : 活魚の微生物学的研究 New Food Industry, 13(4), 28 ~ 33.

83. 金子精一 1971b : 鮮魚の微生物学的研

究(1)　同誌　13(6), 83 ~ 86.

84. 金子精一　1971c：鮮魚の微生物学的研究(2)　同誌　13(7), 76 ~ 80.

85. 日高富男　1964：海洋細菌に関する研究 -I　無機塩要求について陸棲細菌との比較　鹿大水紀要　12, 135 ~ 152.

86. HIDAKA, T.　1965：Studies on the marine bacteria - II　On the specificity of mineral requirements of marine bacteria. ibid., 14, 127 ~ 180.

87. HIDAKA, T. and M. SAKAI　1968：Comparative observation of the inorganic salt requirements of the marine and terrestrial bacteria. Bull. Misaki Marine Biol. Inst. Kyoto Univ., 12, 125 ~ 149.

88. 内田清一郎　1970：浸透圧　魚類生理(川本信之編)　恒星社厚生閣　東京　pp. 302 ~ 333.

89. 益子帰来也　1970：塩類代謝　魚類生理

(川本信之編) 恒星社厚生閣 東京 pp. 334 ~ 347.

90. 内田清一郎 1973：浸透圧調節 脊椎動物 海洋動物生理 (内田清一郎編) 東大出版会 東京 pp. 125 ~ 142.

91. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons 1974 : Bergey's manual of determinative bacteriology. 8 ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1246 p.

92. 清水 潮・相磯和嘉 1962：千葉県鴨川沿岸の海水細菌 日水誌 28, 1133 ~ 1141.

93. Oppenheimer, C.H. and C.E. ZoBell 1952 : The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. J. Marine Res., 11, 10 ~ 18.

94. Seki, H. 1969 : Marine microorganisms associated with the food of young salmon. Appl. Microbiol., 17, 252 ~ 255.

95. LISTON, J. 1954 : A group of luminous and non-luminous bacteria from the intestine of flatfish. J. gen. Microbiol., 12, i.

96. SPENCER, R. 1961 : The occurrence of luminous bacteria in the intestinal tract of marine fish. J. appl. Bact., 24, x.

97. SHEWAN, J. M. 1970 : The identification of luminous bacteria. J. gen. Microbiol., 64, 151 ~ 169.

98. SHIMIDU, U., K ASHINO, and E. KANEKO 1971 : Bacterial flora of phyto- and zoo-plankton in the inshore water of Japan. Can. J. Microbiol., 17, 1157 ~ 1160.

99. 吉水 守・木村喬久・坂井 稔 1976c : サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究-III 海洋棲息魚の腸内細菌叢 日水誌 42, 875 ~ 884.

100. MITSUOKA, T. und K. HAYAKAWA 1972 : Die Faekalflora bei Menschen. I. Die Zusammensetzung der Faekalflora der verschiedenen

Altesgruppen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. A, 223, 333 ~ 342.

101. 光岡知足 1974：腸内菌叢の研究における最近の進歩とくに嫌気性菌を中心として 日本細菌学会誌 29, 773 ~ 788.

102. SMITH, H.W. and W.E. CRABB 1961: The fecal bacterial flora of animals and man. Its development in the young. J. Path. Bact., 82, 53 ~ 66.

103. WILBUR, R.D., D.V. CATRON, L.Y. QUINN, V.C. SPEER, and V.W. HAYS 1960: Intestinal flora of the pig as influenced by diet and age. J. Nutr., 71, 168 ~ 175.

104. 和田和夫・片岡弘毅・光岡和足・新坂敏晴・尾形 学 1965：豚の消化管内細菌叢に関する研究-I 健康豚の直腸便について 日獣誌 27, 215 ~ 220.

105. 波岡茂郎・村田昌芳・長田 久・西沢武

彦・黒岡良治　1965：母乳による初生豚の腸内細菌ならびに従来の人工乳および低蛋白人工乳が腸内菌叢に与える影響について　日獣誌　27, 221 ~ 231.

106. HUHTANEN, C. N., and J. M. PENSACK　1965：The development of the intestinal flora of the young chick.　Poult. Sci., 44, 825 ~ 830.

107. OCHI, Y., T. MITSUOKA, und T. SEGA　1964：Die Entwicklung der Darmflora von Küken bis zum Huhn.　Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 193, 80 ~ 95.

108 松本治康・馬場栄一郎・石川尚明・甫立八州　1976：犬の消化管内細菌叢に関する研究-II　出生後の子犬の糞便内細菌叢について　日獣誌　38, 485 ~ 494.

109. BELL, G. R., G. E. HOSKINS and W. HODGKISS　1971：Aspects of the characterization, identification,

and ecology of the bacterial flora associated with the surface of stream incubating Pacific salmon eggs. J. Fish. Res. Bd. Can. 28, 1511 ~ 1525.

110. HENDRIE, M. S., T. G. MITCHEL, and J.M. SHEWAN 1968 : The identification of yellow pigmented rods. in "Identification methods for microbiologists. Part B" (ed. by B.M. GIBBS and D.A. SHAPTON), Academic Press, London New York, pp. 67 ~ 78.

111. 田中 克 1975：稚魚の消化系(1)消化器管 稚魚の摂餌と発育（日本水産学会編）恒星社厚生閣 東京 pp. 7 ~ 23.

112 宇賀神光夫 1974：養殖サクラマスおよびマスノスケの腸内容物から分離された主なる細菌の分類について 修士論文 北海道大学 169 p.

113 SCHUBERT, R.H.W. 1967 : The taxonomy and nomenclature of the genus Aeromonas

KLUYVER and VAN NIEL 1936. Intern. J. Syst. Bacteriol., 17. 23 ~ 37.

114. 坂崎利一・島崎保家訳 1967 : Manual for the identification of medical bacteria. (S.COWAN & K.STEEL ; 医学細菌同定の手びき) 納谷書店 東京 290 p.

115. BASCOMB, S., S.P. LAPAGE, W.R. WILLCOX, and M.A. CURTIS 1971 : Numerical classification of the tribe Klebsielleae. J. gen. Microbiol., 66, 279 ~ 295.

116. HENDRIE, M.S., W. HODGKISS, and J.M. SHEWAN 1971 : Proposal that Vibrio marinus (RUSSELL 1891) FORD 1927 be amalgamated, with Vibrio fischeri (BEIJERINCK 1889) LEHMANN and NEUMANN 1896. Intern. J. Syst. Bacteriol., 21, 217 ~ 221.

117. BREWER. J.M. and D.L. ALLGEIER 1966 : Safe self-contained carbon dioxide-hydrogen anaerobic system. Appl. Microbiol., 14, 985 ~ 988.

118. SAKAZAKI. R. 1961 : Studies on the Hafnia group of Enterobacteriaceae. Jap. J. Med. Sci. Biol., 14, 223 ~ 241.

119. EWING, W.H. 1963 : An outline of nomenclature for the family Enterobacteriaceae. Intern. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon., 13, 95 ~ 110.

120. 尾崎久雄 1972a: 胃液の pH 魚類生理学講座 第3巻 消化の生理〔上〕 緑書房 東京 pp. 59 ~ 63.

121 尾崎久雄 1972b: 腸内の pH, 魚類生理学講座 第4巻 消化の生理〔下〕 緑書房 東京 pp. 280 ~ 283.