HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Aeromonas salmonicidaの自発凝集性に及ぼす分離培養温度の影響
Author(s)	茂木(戸田), 省三; 野村, 哲一; 吉水, 守
Citation	魚病研究, 30(1), 67-68 https://doi.org/10.3147/jsfp.30.67
Issue Date	1995-03-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53143
Type	journal article
File Information	article75.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

魚病研究 Fish Pathology, 30 (1), 67–68, 1995. 3

Aeromonas salmonicida の自発凝集性に及ぼす分離培養温度の影響

茂木(戸田)省三*1・野村哲一*2
吉水　守*3

(*1山形県内水面水産試験場, *2水産庁・北海道さけ・ますふ化場, *3北海道大学水産学部微生物生物学講座)

(1994年10月17日受付)

Effect of Incubation Temperature for Isolation on Auto-Agglutination of *Aeromonas salmonicida*

Shouzo Toda Moki*1, Tetsuichi Nomura*2 and Mamoru Yoshimizu*3

*1 *Yamagata Prefectural Inland Water Fisheries Experiment Station, Izumi-machi, Yonezawa 992, Japan*
*2 *Hokkaido Salmon Hatchery, Fisheries Agency, Nakanoshima, Toyohira-ku, Sapporo 062, Japan*
*3 *Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minato-machi, Hakodate 042, Japan*

(Received October, 17, 1994)

Aeromonas salmonicida was isolated from diseased yamame (*Oncorhynchus masou*) at 15, 20, and 25°C. Ten colonies were taken from each of ten isolates and were subcultured at the corresponding temperatures. Colonies incubated at 15 and 20°C showed strong auto-agglutination but 40% of colonies incubated at 25°C didn't clearly show auto-agglutination. It was also observed that strains isolated from diseased iwana (*Salvelinus leucomaenis*) at 20°C and subcultured at 25°C showed weak or no agglutination. These observations strongly suggested that *A. salmonicida* should be isolated and subcultured at 15°C or 20°C in order to retain their auto-agglutinability.

Key words: *Aeromonas salmonicida* auto-agglutination, furunculosis, incubation temperature, trout

せっそう病の原因菌 *Aeromonas salmonicida* は分離当初強い自発凝集性を示すことが古くから知られており[1], 自発凝集性と菌体表面蛋白質のA-layer及び病原性との関連についても検討がなされている[2]。前報[3]において, 山形県下のせっそう病魚から分離した *A. salmonicida* は, 分離当初から自発凝集性が認められないか弱い株が多く, これらの株は自発凝集性の強い株が有するA-layer蛋白が存在しないことを報告した。

現在, 一般には *A. salmonicida* の分離培養は20～25°Cで行われており, 山形県内水面水産試験場においても1989年から1991年まで, 本菌の分離培養を25°Cで行っていた。この間, 明らかにせっそう病の症状を呈していた病魚(イワナ *Salvelinus leucomaenis*, ヤマメ *Oncorhynchus masou*, カワマス *S. fontinalis*, ニジマス *O. mykiss*)から分離した *A. salmonicida* 56株の中で, 自発凝集性陽性を示した株はわずか8株にすぎなかった。しかし, 分離培養温度を20°Cとした1992年及び1993年に分離した47株は, 分離魚種, 魚体重, 地域に関係なく全て明瞭な自発凝集性を示した。

A. salmonicida の毒力及び自発凝集性の発現に培養温度が影響を及ぼすことが報告されていること (Ishiguro *et al.*[2]) から, 本報では, 上記分離培養温度の変化が *A. salmonicida* の自発凝集性の発現に影響を及ぼしたのか否かを確認するため実験を行ったのでその結果を報告する。

材料および方法

実験1: 1993年6月にヤマメせっそう病魚10尾(平均体重65g)の腎臓を個体別に1白金耳量トリプトソーヤ寒天培地(以下TSA, 日水製薬)に塗抹し, 15, 20, 25°Cの3温度で培養した。出現したコロニーの中から培養温度ごとに1尾につき1株計30株を選出し, 前報[3]と同様, グラム陰性短桿菌, 非運動性, チトクローム・オキシダーゼ陽性, 褐色色素産生, 抗 *A. salmonicida* 血清による凝集性を確認して *A. salmonicida* と同定した。このようにして得られた *A. salmonicida* 30株を分離時と同じ温度でTSA平板に播き, 1株につき10個のコロニーを選び, 総計300個のコロニーを得て, その自発凝集性を載せガラス凝集反応(スライド凝集反応)により判定した。

実験2: 1993年9月にイワナせっそう病魚5尾(平均体重42g)の腎臓を個体別にTSA平板に塗抹後, 20°Cで培養した。実験1と同様1尾から1株を選び, *A. salmonicida* であることを確認後, 得られた *A. salmonicida* 5株をTSA平板に播き, 1株につき10個のコロニーを選び計50個のコロニーを得た。1コロニーにつき2本のブレインハートインヒュージョンブロス(以下BHIブロス, 日水製薬)に接種して, 一方を20°C, もう一方を25°Cの2温度で継代培養した。このようにして得られた50本ずつ計100本のBHIブロスについて, ブロスの濁度から自発凝集性を判定した。すなわち, 菌の増殖を確認後, 滅菌スポイトで一度攪拌して室温に1日放置し, ブ

ロス全体が明瞭に澄んでいるものを自発凝集性（＋），やや濁りがあり判定困難なものを（±），懸濁したままのものを（－）とした。

結果および考察

実験 1：Table 1 にスライド凝集反応の結果を示した。15°C 及び 20°C で分離し，同温度で継代培養した場合は，それぞれ供試 10 株から得た 100 コロニー全てに明瞭な自発凝集性が観察された。しかし，25°C で分離し同温度で継代培養した場合は，100 コロニーのうち陽性と判断されたものは 60 個，陰性と判定されたコロニーは 2 個であり，残りの 38 コロニーは自発凝集性が明瞭ではなく，判定が困難であった。しかし，凝集の強弱の程度は多様で，本法では明確な判別は困難であった。

Table 1. Slide auto-agglutination using 100 colonies from 10 strains of *A. salmonicida* isolated from diseased yamame (*Oncorhynchus masou*) and subcultured at 15, 20 and 25°C.

Temperature °C Isolation→Subculture	Number of colonies showing auto-agglutination			
	＋	±	－	Total
15→15	100	0	0	100
20→20	100	0	0	100
25→25	60	38	2	100

Table 2. Auto-agglutination in BHI broth using 50 colonies from 5 strains of *A. salmonicida* isolated from diseased iwana (*Salvelinus leucomaenis*) at 20°C and subcultured at 20 or 25°C

Temperature °C Isolation→Subculture	Number of test tubes showing auto-agglutination*			
	＋	±	－	Total
20→20	49	0	1	50
20→25	3	12	35	50

* Determinated by turbidity of broth.

実験 2：スライド凝集反応による判定では，自発凝集性の程度を明確に区別することが困難であったことから，イワナ病魚から分離した *A. salmonicida* 5 株を対象に，BHI ブロスの濁度による判定を行った結果を Table 2 に示した。20°C で分離し 20°C で継代培養して得たコロニーを接種したブロスでは，50 本のうち陰性と判定されたものは 1 本にすぎなかったが，25°C で継代したものは 50 本のうち 35 本が陰性となり，その他に判定困難なものが 12 本出現した。

ブロスの濁度による判定においても凝集の強弱の程度は多様であったが，スライド凝集反応による判定に比較して，自発凝集性陽性と自発凝集性の弱い検体の区別は容易であった。また実験 2 では病魚からの分離培養温度を 20°C だけとし，継代培養温度を 20°C と 25°C の 2 温度としたが，20°C で分離した *A. salmonicida* を 25°C で継代した場合に自発凝集性が陰性あるいは弱い検体の出現が多くなる傾向が認められた。

Ishiguro *et al.*[2] は 22°C を越える温度で *A. salmonicida* を培養すると A-layer 消失株を選択することになると報告しており，本試験の結果はそれを支持するものであった。これらのことから，山形県において 1989 年から 1991 年に分離した *A. salmonicida* に自発凝集性陰性株が高い頻度で出現した理由は，分離培養を 25°C で行ったことに起因していたと考えられる。現在，多くの研究機関で *A. salmonicida* は 20～25°C で培養されている。今回の結果から，病魚から *A. salmonicida* を分離する場合，培養温度を 20°C あるいはそれ以下とし，同じ温度で継代培養する必要のあることが示された。

文　献

1) Udey, L. R. and J. L. Fryer (1978): *Mar. Fish. Rev.*, **40**, 12–17. 2) Ishiguro, E. E., W. W. Kay, T. Ainsworth, J. B. Chamberlain, R. A. Austen, J. T. Buckley and T. J. Trust (1981): *J. Bacteriol.*, **148**, 333–340. 3) Nomura, T., M. Yoshimizu, S. Moki and Y. Ezura (1994): *Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery*, No. 48, 23–29.