

本邦で分離された *Aeromonas salmonicida* — ウィルレント・ファージの特性

日 高 富 男・河 口 貴 史

Properties of Some *Aeromonas salmonicida*—Virulent Phages Isolated in Japan

Tomio HIDAKA*¹ and Takafumi KAWAGUCHI*²

Abstract

Virulent bacteriophages specific for *Aeromonas salmonicida* were isolated from water samples, collected from fish farms, rivers, lakes and marshes in Japan. The isolated phages differed greatly in the fine structure of the virion, plaque morphology, spectrum of lytic action, stability and one-step growth characteristics. At the same time, They had identical serological properties. Based on the phage properties, they were classified in five groups, Group I phages consisted of an elongated hexagonal head and a tail of complex structure with a contractile sheath. The phages of groups II, IV and V had a head with a hexagonal outline and tail with a contractile sheath. Group III phages exhibited a hexagonal head with a unique short tail. In the five groups, The phages belonging to group III formed the largest clear plaque, were unstable to heating at 50°C for 30 min. and adding chloroform, and showed the shortest of latent period. They had a peculiar property in others of the groups.

Phage typing with presentative phage of each group may provide a rapid and sensitive means of differentiating *A. salmonicida* strains.

サケ科魚類のせつそう病の原因菌である *Aeromonas salmonicida* 菌に感染するバクテリオファージについては、1930年代に最初の報文^{1,2)}を見るが、当時このファージについての情報は少なく、これ以後しばらくは報文がほとんどなかった。PATERSON ら³⁾はカナダ、オンタリオ州南部のマスふ化場や蓄養池などの水、泥から当該ファージを分離し、それらを形態的に2型、血清学的に3型に分けて諸性状を報告している。また、POPPOFF⁴⁻⁶⁾は諸外国から収集した *A. salmonicida* 104株を宿主菌としてファージを検索し、35株の *A. salmonicida* —ファージを分離した。そして、それら分離ファージは形態的には3型に血清学的には10型に分けられ、それらの宿主域には差異が見られ、代表ファージ8株に対する供試 *A. salmonicida* の感受性パターンの違いによって、供試菌を14の溶菌型に分けうることなどを報告し

*¹ 鹿児島大学水産学部微生物学研究室 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Kagoshima University, 50-20 Shimoarata 4 Chome, Kagoshima, 890 Japan)

*² 現住所：広島市西保健所 (Present Address : Hiroshima City Health Center, 7-6 Kannon-cho, Nish-Ku, Hiroshima, 733 Japan)

ている。さらに *A. salmonicida* ファージ型別の可能性とそのファージ型を *A. salmonicida* 菌の疫学的調査に利用しうることに言及した。

一方、*A. salmonicida* はコロニー形態として“smooth”，“rough”と“intermediate” (G-phase) の3様を現わし⁷⁻⁹⁾、しかもコロニー形態の違いによって病原菌力に差異が見られる^{10,11)}。また、3様のコロニー形態をもたらすそれぞれの細菌細胞は、それらの細胞壁に含まれる lipopolysaccharide (LPS) が量的、質的に異なっている^{10,12)}ことや、それら LPS はファージの感染能に大きく影響するなどの知見が得られている。このような宿主菌の微細な生理化学的性状が解明されていくことと相まって、ファージが宿主細胞に吸着感染する機構に関わる相互作用が分子レベルで検討されつつある。

その後 RODGERS ら¹⁵⁾は、前記の PATERSON ら³⁾や POPOFF⁴⁻⁶⁾の研究をさらに進展させ、各国から収集した93株の *A. salmonicida* 菌を18株のファージ・セットに対する感受性パターンによって27のファージ型に分けた。そして、供試 *A. salmonicida* のうちイギリスで分離された57株は3つのファージ型に集中されており、残りの菌株はその他のファージ型に1～数株ずつ分散所属し、その中で北欧諸国での分離菌株やオランダでの分離菌株がそれぞれまとまって類似ファージ型に所属している、概括的にみて供試 *A. salmonicida* のファージ型はきわだった地理的な分布であることを報告している。また同一菌株であってもコロニー形態の変化によってファージ型が変動する現象や、コロニー形態と病原性、LPS 含量、ファージ感受性などの相互関係についても述べている。

著者らは1970年代から我国各地で分離された *A. salmonicida* を収集して、それらに対して特異的に感染するファージを各地の試水から分離してきた。それら宿主-ファージ系は分離の時期や場所によって明らかな変遷が見られた。本報では、分離された *A. salmonicida* -ファージのうち、まずヴィルレント・ファージ株の性状について報告する。

実験材料および方法

供試菌株 本研究に供試した *Aeromonas salmonicida* の菌株は、北海道大学水産学部微生物学講座の木村喬久教授のところで収集されていた63株、第一製薬株式会社の井上進一氏のところで収集されていた56株、および「せっそう病研究会」の原武史氏の御世話により東京都、北海道と新潟、長野、埼玉、山梨、岐阜、滋賀、群馬、高知の各県の水産試験場で分離されていた96株、さらに標準菌株 ATCC-14174, NCMB-632, NCMB-833, NCMB-834, NCMB-1102, NCMB-1103, NCMB-2020の7株を加えて、総菌株数222株であった。これら菌株の分離源はサケ、ヒメマス、マスノスケ、ヤマメ、アマゴ、ニジマス、ブラウントラウト、イワナ、カワマスなど広範囲のサケ科魚類のせっそう病患部から分離されたものであった。

ファージ分離試料 前項の供試菌株を宿主菌とするファージの検索、分離試料は、鹿児島県下の2つのニジマス養魚池と4つの湖沼と4つの河川および前項で掲げた各都道県水産試験場の23のサケ科魚類養魚池それぞれから採取した水であった。

使用培地 供試菌の培養、保存やファージの分離、増強、保存に使用した培地は肉汁培地 (Nutrient Broth, NB)、肉汁寒天培地 (Nutrient Agar, NA)、軟肉汁寒天培地 (Soft Nut-

rient Broth, sNA), であった。NB の組成は, Proteose peptone No. 3 (Difco) 10 g, Bact beef extract (Difco) 3 g, NaCl 5 g を純水 1 l に溶解したものであり, pH は 7.2~7.4 に調整した。NA, sNA は NB に粉末寒天をそれぞれ 1.3%, 0.5% 濃度に加えて溶解し作成した。

ファージの検出と分離 ファージの検出は SPENCER¹⁶⁾の集殖法に準じて行った。所定数一系の 500 ml 容振盪フラスコにそれぞれ 150 ml の NB を入れ, これらそれぞれに各 A. salmonicida 菌株の NB 1 晩培養物 5 ml ずつを 20 株分ずつまとめて接種し 2~3 時間振盪培養した。次いでそれら培養物に供試水 200 ml ずつを加え, 振盪しながら 2~3 時間培養した後, 引き続き 1 晩静置培養してファージを集殖した。培養物は 4,500 G で 30 分間遠沈し, 上澄をミリポアー (HA, 0.45 μm) でろ過した。ろ液は相応する供試菌の新鮮培養液を接種した二重寒天平板上にスポットし, 十分しみこませて 1 晩培養した。培養後スポット部分に溶菌像出現の有無を観察して接種菌に対し感染能を持つファージの存否を検定した。この操作における培養温度は 28°C であった。このファージ検出試験において溶菌像がみられたものについては, その溶菌部分の一部を白金耳にてとり, 標示菌の新鮮培養物に接種し 28°C で 1 晩培養して増強した。次いでその培養物は遠沈後ミリポアー (HA, 0.45 μm) でろ過し, 無菌のファージ増強液とした。このファージ液について, ADAMS¹⁷⁾の二重寒天平板法に準じて溶菌斑形成を試みた。この方法で形成された単離溶菌斑をとり, 前述と同様にして再度増強する。このように「単一溶菌斑よりの増強……溶菌斑形成」の過程を数回繰り返しファージの単離と鑑別を行った。このようにして単一溶菌斑から増強作成されたファージ増強液の力価は 10^{8-9} pfu/ml であった。このファージ液は 5~8°C で保存した。

ファージ定量法 試料ファージ液中のファージの定量は, ADAMS の記載に準じ二重寒天平板法による溶菌斑形成単位 (plaque forming units, pfu) として滴定した。すなわち予め NB で適宜 10^8 希釈を行ったファージ液に感受性菌新鮮培養物 (10^8 cells/ml) を等量混じり, 28°C に 5~10 分間放置して宿主細胞にファージ粒子を吸着させる。その吸着液 0.2 ml を予め溶解し 45°C に保温した sNA 3 ml に注加し手早く混和した後, そのすべてを NA 平板 (基層平板) 上に流込み重層する。重層寒天の固化するをまって 28°C にて 1 晩培養した, この方法で二重寒天平板上に形成された溶菌斑を計数し pfu/ml を算出した。

ファージの一段増殖実験法 標示菌を NB で 1 晩培養したものを 0.5 ml を 4.5 ml の NB に移植しさらに 2~3 時間培養した。その新鮮培養物 (10^8 cells/ml) 0.5 ml とファージ液 (10^6 pfu/ml) 0.5 ml とを NB 4 ml 中に加え混和し吸着管として 28°C で 20 分間培養した。その間にファージ粒子は宿主細胞に吸着される。20 分後その吸着管を NB で 1/100 に希釈してファージの吸着を停止した後, それを増殖管として引き続いて培養した。増殖管からは所定時間毎に試料の一部を取り出し適宜希釈してファージ数を滴定し, 放出ファージ数を算出した。別にファージ粒子の宿主細胞への吸着率を算出するため吸着 20 分後の吸着管における全ファージ数と未吸着ファージ数とを滴定した。すなわち吸着管を 1/100 に希釈した直後, その一部をとり感染中心体数を滴定して全ファージ数とし, また他の一部について, その中の未吸着ファージを分かつためにミリポアー (HA, 0.45 μm) を通し, そのろ過液について遊離ファージ数を滴定した。こうして得られた吸着 20 分後の全ファージ数と遊離ファージ数との差を吸着ファージ数とし, それの全ファージ数に対する百分率を吸着率とした。

ファージ濃縮法 ファージの濃縮法にはいろいろあるが本報では分別遠沈濃縮法を用いた。すなわち常法で増強調整されたファージ液を低温高速遠沈 (0℃, 37,000 G, 90分間) し、分別したファージ粒子のペレットを少量の液に再懸濁した。懸濁のための液は懸濁液の用途に応じて選択した。電顕標本作成に使う場合は1%酢酸アンモニウム水溶液に、免疫原として使う場合には生理食塩水に懸濁した。この方法でファージ濃度を100倍位に濃縮できた。

電子顕微鏡観察 ファージ濃厚懸濁液 (1%酢酸アンモニウム水溶液に対し 10^{10-11} pfu/ml) を試料とし、リンタングステン酸による陰染色標本を作成した。すなわちファージ濃厚液を2%リンタングステン酸水溶液 (KOHでpH 7.2に調整) と等量混和し、それをコロジオン膜でおおって炭素蒸着したシートメッシュ上に滴下し、30~60秒後残余の試料液をろ紙で適度に吸い取り乾燥させる。これを電子顕微鏡試料とし、日本電子製電子顕微鏡, JEM 100B型に挿入し、電顕実拡大60,000倍で観察した。

抗ファージ血清の作成 免疫原は実験動物ウサギに接種した。供試ウサギは生後7ヶ月の雄で体重2.2kg位のものであった。これらの下腹部皮下に、免疫原として滅菌生理食塩水に懸濁した濃縮ファージ液約3 mlを接種した。注射は3~4日間隔で、11~12回行った。免疫が相当に進んだと思われる時期に全採血を行った。全採血は最後の免疫接種日から10~22日の間に行い、ウサギ耳翼静脈よりできるだけ多く採血した。

採血した血液は大形遠沈管に採り、斜面にして室温に放置し凝血させ、血清と血餅に分離した。4時間ほどで血餅は収縮するが、この際スパーテルで血餅を切っておくと血清の収量は上がる。冷蔵庫 (5℃) で1晩保持した後、分離した血清をさらに3000 rpm, 20分遠心分離し、上清を抗ファージ血清として試験管に分注した。この血清を56℃, 30分間加熱して非働化した。血清は非働化を行うだけに止め、防腐剤は加えずに使用した。

抗血清による中和試験 抗ファージ血清にファージを加えて抗原抗体反応を行い、反応後の生残ファージ数を測定し、抗ファージ血清のファージ中和率及び抗体価を算出した。

中和試験は37℃で予温した抗ファージ血清0.9 mlにファージ液 (10^8 pfu/ml) を0.1 ml加え混合した後、37℃で所定時間反応させた。反応後、液の0.1 mlを氷冷 NB 9.9 mlに加えてすばやく攪はんし、中和反応を停止させた。この液について生残ファージ数を測定した。対照試験は中和反応系の中の抗ファージ血清に代えて NB を加え、同様に行った。測定結果を以下の計算式に挿入して中和率 (%) と中和反応速度恒数 (K) を算出した。

$$\text{中和率 (\%)} = (P_0 - P_t) 100 / P_0$$

$$K = 2.3 \times D / t \cdot \log \cdot P_0 / P_t$$

但し、 P_0 は最初のファージ数、 P_t は t 分後のファージ数を、 D は使用血清の希釈倍数を表す。また K の式はファージの中和率が90%から99%の範囲にある場合のみあてはまる。

実験結果

1. 分離ファージの来源

A. *salmonicida* —ファージが分離された試水は、サケ科魚類の棲息あるいは養殖とは気候的に縁がうすい鹿児島県下の河川水が多かった。それらは湖沼水よりも河川水、しかも上流

溪谷の流水から多く分離された。各県から送付をうけた23の養魚池水のファージが分離されたのは4つの試水であった。

2. 宿主域

ファージの分離のため供試した *A. salmonicida* の大部分はそれぞれいくつかのファージの宿主菌としてそれらの分離をもたらした。全体として多数のヴィルレント・ファージと少数のテンプレート・ファージが分離されたが、本報ではヴィルレント・ファージについて述べる。それらは溶菌斑形態や宿主菌の溶菌パターンなどから見て類似するものが多く、6株の代表ファージに整理された。それらは Table 1 に示されるように菌種内の宿主域が広く、特に As. 55 ϕ は供試菌の大部分に感染した。

Table 1. Host range of representative phage in test strains of *Aeromonas salmonicida*.

Phages	As. 32 ϕ	As. 43 ϕ	As. 55 ϕ	As. 71 ϕ	As. 57 ϕ	As. 73 ϕ
Lytic rate (%)	86	91	92	79	43	10

3. 溶菌斑形態

分離ファージの二重寒天平板法による溶菌斑は Fig. 1 に見られるような形態を現わした。As. 32 ϕ は直径0.5~1.0mmの小さい透明な溶菌斑を形成した。As. 43 ϕ は直径が3.0~4.0mmの透明な溶菌斑であった。As. 55 ϕ は一般に直径2.0~2.5mmの透明な溶菌斑を形成した。As. 57 ϕ 、As. 73 ϕ は混濁した溶菌斑を形成し、前者は直径1.0~1.5mmで後者は直径1.5~2.0mmの溶菌斑であった。また As. 71 ϕ の溶菌斑形態は、直径6~8mmの大きく透明なもので、他のものとは明らかに異なっていた。

4. 粒子構造

分離ファージの粒子構造の電子顕微鏡写真を Fig. 2 に示した。

As. 32 ϕ は外観やや偏長な六角形の大きい頭部 (85×140 nm) と収縮性尾鞘を持つ尾部 (5×120 nm) からなり、尾部の末端には基盤様構造や尾部糸などが見られた。As. 43 ϕ と As. 55 ϕ の粒子構造は類似しており、それらは共に外観六角形の頭部 (径70 nm) と収縮性尾鞘を持つ尾部 (10×140 nm) からなり、尾部の末端には数個のスパイク様構造をつけていた。As. 71 ϕ は外観六角形の正多面体の頭部 (径60 nm) に小さい尾部が観察されるのみの単純な構造であり、他のものとは明らかに違っていた。As. 57 ϕ は外観六角形の正多面体の頭部 (径65 nm) と収縮性尾鞘を持つ尾部 (5×130 nm) からなり、As. 73 ϕ は外観六角形の正多面体の頭部 (径75 nm) と収縮性尾鞘を持つ頭部 (15×130 nm) からなり、基本的には同じ構造であるが頭部の大きさが少し異なっていた。

次いでこれら分離ファージの核酸を BRADLEY^{18,19)} のアクリジンオレンジ核酸染色法によって同定したところ、これらファージの核酸は、すべて二本鎖の DNA であることがわかった。

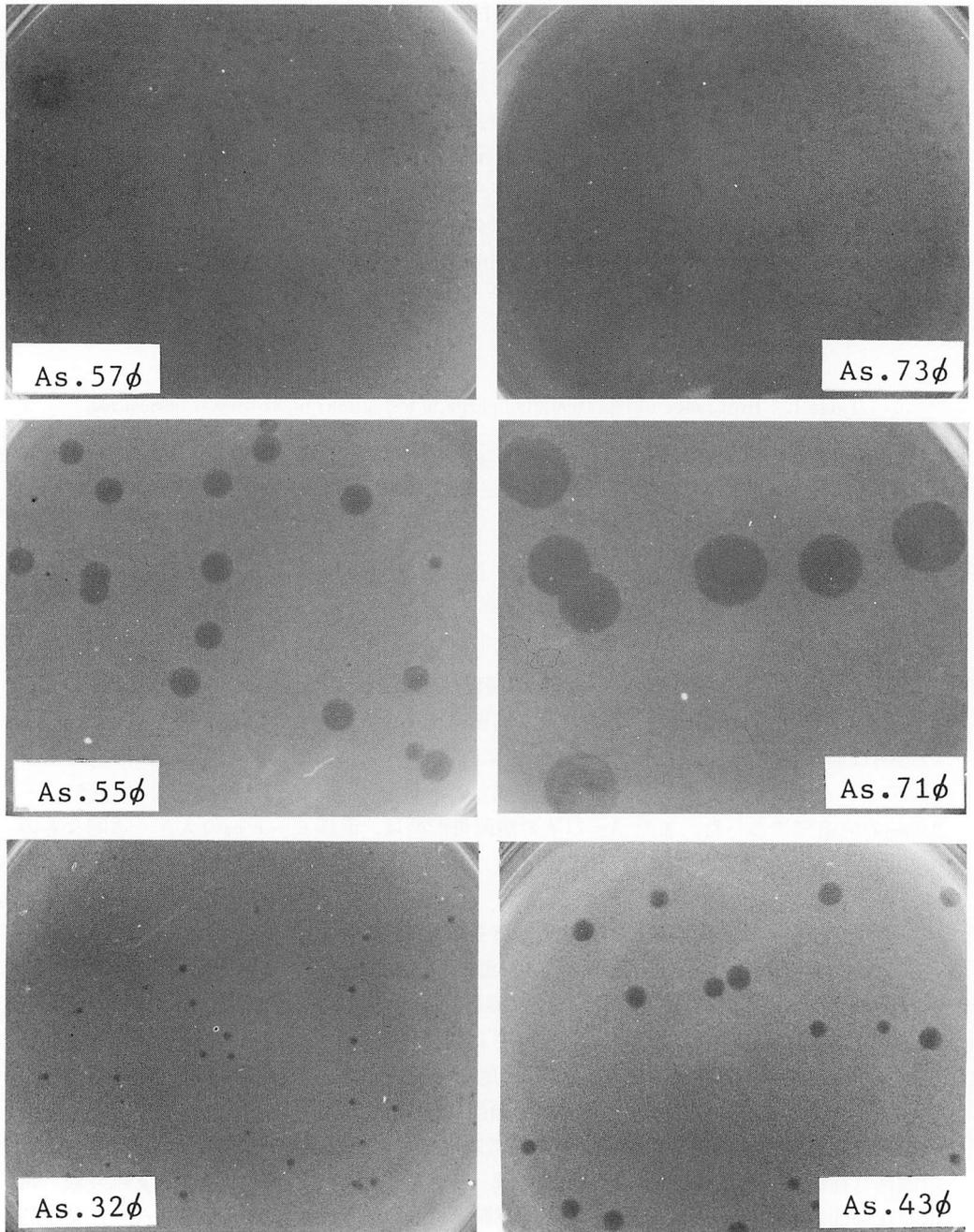


Fig. 1. Plaque morphology of *Aeromonas salmonicida*-phages. Bar=10 mm

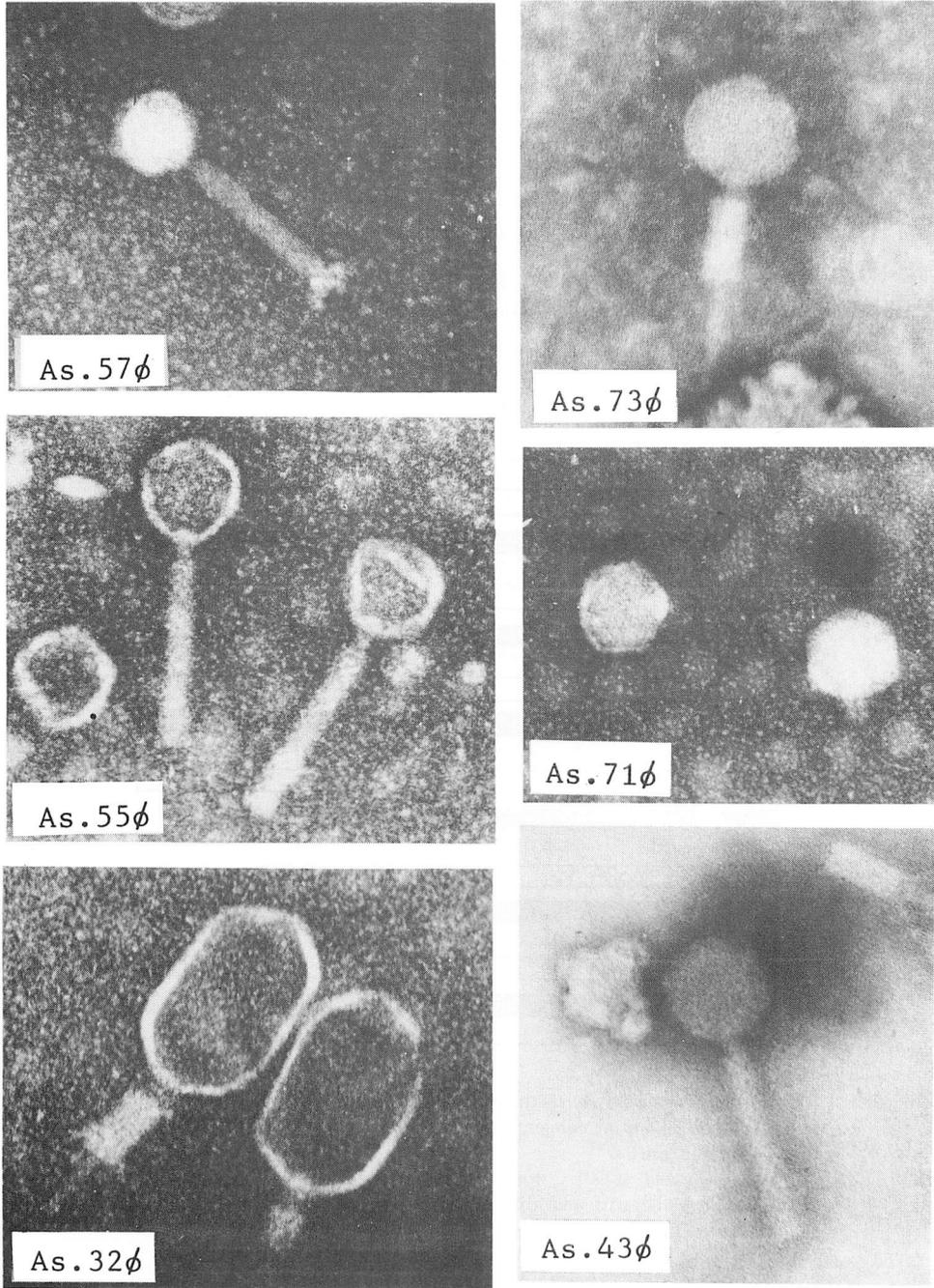


Fig. 2. Electron micrographs of *Aeromonas salmonicida*-phage particles negatively stained with PTA. Bar=100 nm. ; Magnification, $\times 200,000$

5. 安定性

分離ファージについて、クロロホルム処理および50℃、30分間加熱処理して生残ファージを計数し、それら条件下での安定性を比較検討した。その結果を Fig. 3 に示した。Fig. 3 に示されるように、これらファージのなかにはこの条件の加熱によってある程度の失活が見られるものがあった。すなわち As. 32φ と As. 57φ は生残ファージ数が5%に、As. 71φ は50%に減少し、他のものに比してやや熱に対して不安定であった。クロロホルム処理においては As. 71φ が15%程度に減少しているが、他のファージは全く減少せずクロロホルム処理に対して耐性であった。両処理に対する耐性度合から As. 43φ と As. 55φ は類似性を示した。また As. 57φ と As. 73φ は前の溶菌斑形態では同じグループに入れたが、耐性度合が違うので区別した方がいいと思われる。

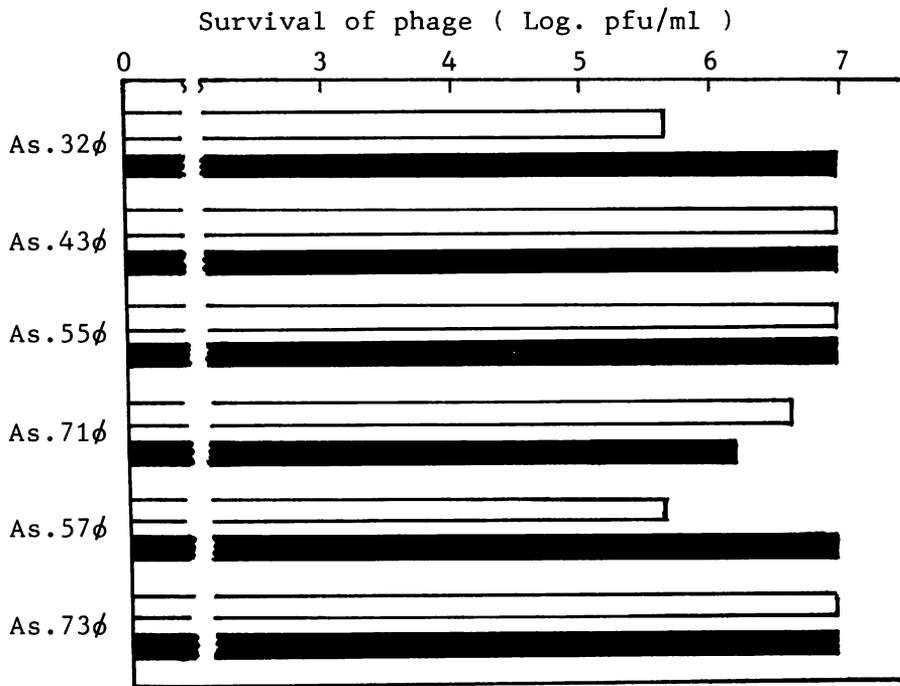


Fig. 3. Stability of *Aeromonas salmonicida* phages heated 50° C for 30 min, and treated with chloroform. The initial concentration of the phage suspensions in nutrient broth is a titer of 10 pfu/ml.

□ heated at 50° C for 30 min.
 ■ treated with chloroform

6. 一段増殖曲線

分離ファージが宿主細胞内でどのような増強過程をたどるかを知るための一段増殖実験の結果を一段増殖曲線として表わし Fig. 4 に示した。また各ファージの一段増殖曲線にみられる潜伏期、上昇期、平均放出量を Table 2 に表示した。

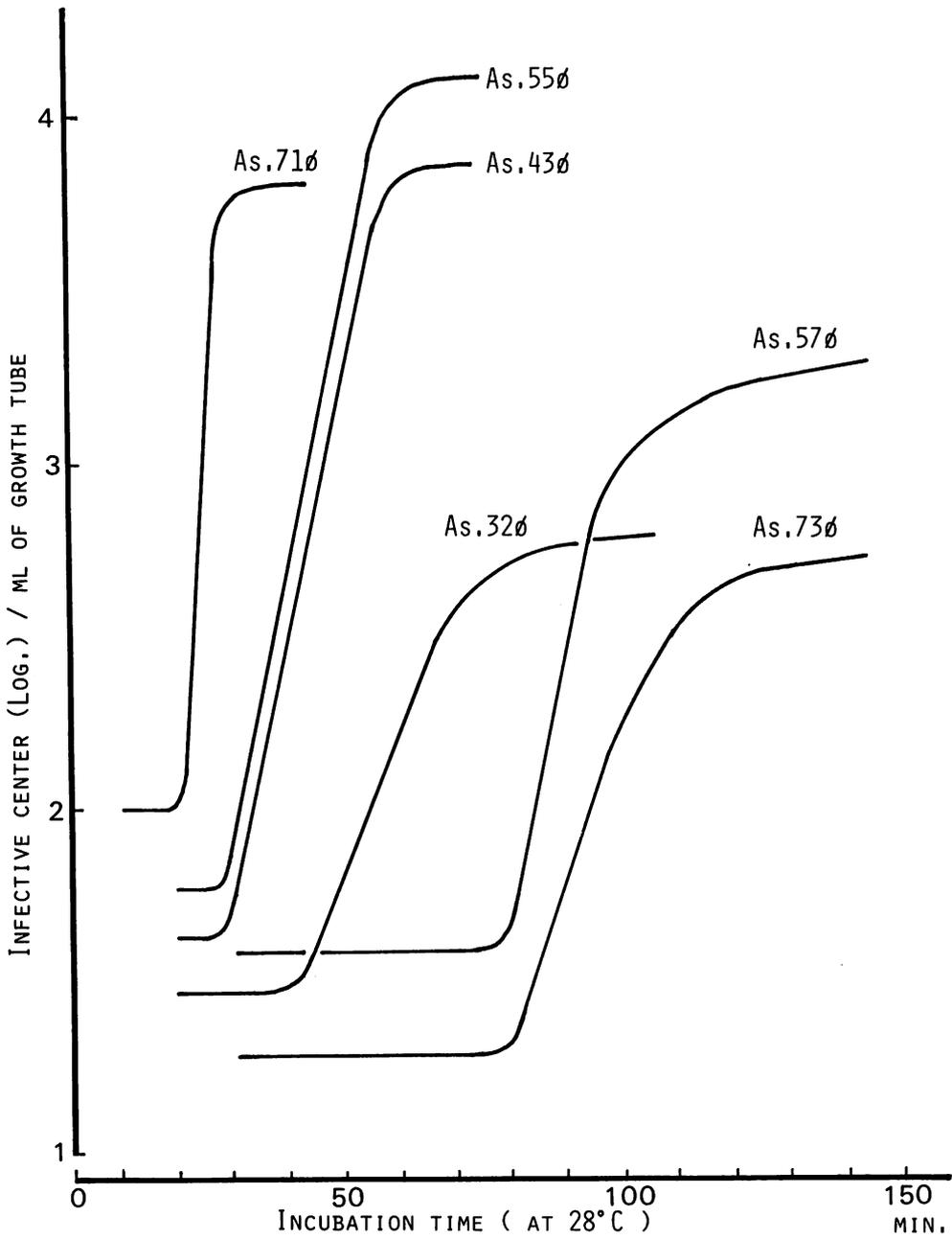


Fig. 4. One-step growth curves of *Aeromonas salmonicida*-phages.

Table 2. One-step growth characteristics of *Aeromonas salmonicida*-phages

Phage	Latent period (min.)	Rise period (min.)	Average burstsize
As. 32 ϕ	40	35	20
As. 43 ϕ	30	25	170
As. 55 ϕ	30	25	200
As. 71 ϕ	22	6	60
As. 57 ϕ	80	40	48
As. 73 ϕ	80	40	25

それらに示されるように、As. 32 ϕ は潜伏期40分、上昇期35分で、平均放出量が20と小さかった。As. 43 ϕ と As. 55 ϕ は共に潜伏期30分、上昇期25分で平均放出量がそれぞれ170と200と大きかった。As. 71 ϕ は潜伏期22分、上昇期6分、平均放出量60であり、他に比較して一段増殖のサイクルは速いが平均放出量はそれほど大きくなかった。As. 57 ϕ と As. 73 ϕ は潜伏期80分、上昇期40分と共に長く平均放出量が25~48と小さく増強しにくいものであった。

7. 血清学的群別

各分離ファージを免疫原として抗ファージ血清を作成した。まずそれら抗ファージ血清の抗原ファージに対する中和率 (%) と中和速度恒数 (K) を測定し、その結果を Table 3 に示した。表中に見られるように As. 32 ϕ 、As. 43 ϕ 、As. 55 ϕ 、As. 71 ϕ それぞれの抗血清の K 値は、いずれも高く、抗血清中に含まれる抗体の濃度と活性が高いことを示した。一方 As. 57 ϕ と As. 73 ϕ の抗血清の K 値は低かった。

Table 3. K value of neutralization with antiserum to homologous phage

Antiserum	Neutralization condition			Neutralization rate (%)	K value *
	Serum dilution	Temp. (°C)	Time (min.)		
As. 32 ϕ -S	1/750	37	20	96	123
As. 43 ϕ -S	1/500	37	10	98	206
As. 55 ϕ -S	1/500	37	15	95	102
As. 71 ϕ -S	1/250	37	5	93	129
As. 57 ϕ -S	1/50	37	15	99	12
As. 73 ϕ -S	1/250	37	20	93	34

$$* K=2.3D/t \times \log P_0/P_t$$

次いで、Table 3 で示された血清希釈率と反応温度、時間の条件を用いて各ファージと各抗ファージ血清相互の交叉中和滴定実験を行った。その結果を Table 4 に示した。この実験は供試ファージ6株の血清学的類縁性を調べたものである。Table 4 より、As. 43 ϕ とその抗血清および As. 55 ϕ とその抗血清相互の中和率は互いに高く類似した値を示していた。

Table 4. Rates of neutralization of *Aeromonas salmonicida*-phages by antisera

Antisera Phages	% of neutralization with antiserum to phage					
	As. 32 ϕ -S	As. 43 ϕ -S	As. 55 ϕ -S	As. 71 ϕ -S	As. 57 ϕ -S	As. 73 ϕ -S
As. 32 ϕ	96	0	0	0	0	0
As. 43 ϕ	0	98	94	0	0	0
As. 55 ϕ	0	98	95	0	0	0
As. 71 ϕ	0	0	0	96	0	0
As. 57 ϕ	0	0	0	0	98	72
As. 73 ϕ	0	0	0	0	73	93
Sero type	I	II	II	III	IV	V

また、As. 57 ϕ とその抗血清および As. 73 ϕ とその抗血清相互の中和率にあつては、相同系での中和率が93~98%であるのに対し異型系では72~73%とやや低い値を示して何らかの差異を示した。その他のファージ-抗ファージ血清ではそれぞれ相同系の反応においてのみ中和がみられ、血清学的にはそれぞれ異なる型であることがわかった。以上の結果、血清学的性状から As. 43 ϕ と As. 55 ϕ は1つの群、As. 57 ϕ と As. 73 ϕ とは少しの違いであるがそれぞれ1つずつの群とし、As. 32 ϕ と As. 71 ϕ はそれぞれが単独の1つずつの群を形成しており、供試ファージ6株は5群に分けられた。そして、それらは As. 32 ϕ をI型、As. 43 ϕ 、As. 55 ϕ をII型、As. 71 ϕ をIII型、As. 57 ϕ をIV型および As. 73 ϕ をV型と符号した。

考 察

本研究で分離し代表として選んで供試した *A. salmonicida* -ファージ6株はすべてウイルスレント・ファージであり、遺伝物質として二本鎖DNAをもつものであった。それらのファージ粒子構造は、As. 71 ϕ が頭部に短かな尾部をもつ構造であったが、他のファージは頭部と収縮性尾鞘をつけた長い尾部とからなり、大腸菌-T偶数系ファージの構造に類するものであった。As. 71 ϕ の粒子構造は他のものに比べて特徴的で、この形のは PATERSONら³⁾の記載には見られない。この As. 71 ϕ は粒子構造ばかりでなく、溶菌斑形態が透明で大きく (Fig. 1)、ファージ液の除菌処理として用いるクロロホルム処理や加熱処理に対して不安定で (Fig. 3)、一段増殖曲線の潜伏期、上昇期が短く、(Fig. 4, Table 2)、血清型が単独である (Table 4) ことなど、あらゆる性状で他のものと異なり特徴的であった。

供試ファージの溶菌斑形態についてみれば、As. 32 ϕ 、As. 43 ϕ 、As. 55 ϕ 、As. 71 ϕ は透明な溶菌斑を、As. 57 ϕ 、As. 73 ϕ は混濁した溶菌斑を形成し、それらの間に明らかな違いが見られた。透明なものの相互間には大きさに差異があつたが混濁なもの2株のそれは区別し難い。供試ファージの安定性は As. 71 ϕ が不安定であることは前記した。その他のファージはクロロホルム処理には耐えたが、加熱処理にはやや不安定なものがあり、その傾向はファージ粒子の頭部が大きい As. 32 ϕ や As. 57 ϕ にみられた。日高・藤村²⁰⁾、HIDAKA²¹⁾ は海洋性バクテリオファージの粒子構造とクロロホルム耐性および熱耐性との関係を報告してい

る。つまりその粒子構造において収縮性の尾鞘をつけた尾部を持つフェージの方がそうでないフェージに比して両処理に対する耐性度合が強いとしているが、ここでもその傾向が認められた。

次に一段増殖曲線の性格から、透明な溶菌斑を形成するフェージは一般に放出量が大きく、混濁した溶菌斑を形成するものは放出量が小さい傾向にある。ただし As. 71 ϕ は放出量がそれほど大きくないにもかかわらず非常に大きな透明溶菌斑を形成した。

フェージ粒子の大きさはそれ自身が培地中を拡散する度合を左右するので、一般に粒子が小さいフェージ程大きい溶菌斑を形成する傾向にあるといわれているが、ここでも透明な溶菌斑を形成するものにおいては顕著にその傾向が現れている。しかし混濁した溶菌斑を形成するものではいちがいに言えない。これは溶菌斑の大きさを決定するのが単にそれ自身の粒子の大きさばかりでなく、そのフェージの放出量とも関係するためであろう。ちなみに放出量の大きい As. 43 ϕ と As. 55 ϕ が大きい溶菌斑を形成している。また一段増殖曲線と溶菌斑形状との間の関連性が潜伏期にもみられる。すなわち混濁な溶菌斑を形成するものは透明なそれらよりも潜伏期が長く平均放出量が小さいことから、それら自身増強しにくいことを意味する。As. 71 ϕ が大きい溶菌斑を形成することは、その一段増殖サイクルの潜伏期、上昇期の短かさが重要な要因をなすと考えられる。

これらの性状検査の範囲内において、供試フェージのうち As. 43 ϕ と As. 55 ϕ は溶菌斑形態がやや異なるが他の性状は類似しており、同じ群と見なしうる。一方、As. 57 ϕ と As. 73 ϕ 溶菌斑形態は似ているが、安定性などに違いがあり、両者は区別されるべきであろう。従って、As. 32 ϕ 、As. 55 ϕ 、As. 71 ϕ 、As. 57 ϕ 、As. 73 ϕ のそれぞれによって代表される5群に区別しうることがわかった。そのことは Table 4 に示した血清学的な型別とよく同調していて、総合的に見て確かな群別である。供試フェージは多数の分離フェージから代表株として精選されたものであり、*A. salmonicida* のフェージ型別のためのフェージ・セットの一部として有効に利用しうるものであると考える。

要 約

サケ科の魚類のせつそう病の原因菌である *Aeromonas salmonicida* に感染性をもつウイルス・フェージが本邦各地の養魚池、河川、湖沼の試水から分離され、その代表フェージ6株について特性を明らかにした。フェージ粒子構造、溶菌斑形態、宿主域、安定性、一段増殖曲線、血清学的性状などの知見により供試フェージを5群に区別した。各群フェージの特性は概略次の通りであった。

I 群のフェージ： やや偏長な六角形の大きい頭部と収縮性尾鞘をつけた尾部からなる粒子構造を構成し；小さくて透明な溶菌斑を形成し；加熱処理に対しやや不安定であり、一段増殖の潜伏期が長く、平均放出量が小さい；そして、血清型 I である。II 群のフェージ： 外観正六角形の頭部と収縮性尾鞘をつけた尾部からなる；径 3～4 mm の透明な溶菌斑；安定であり；平均放出量大大きく；そして血清型 II である。III 群のフェージ： 外観正六角形の頭部と小さな痕跡の尾部からなる；径 6～8 mm の大きく透明な溶菌斑；不安定であり；平均放出量はそれほど大きくないが潜伏期は短く；そして血清型 III である。この群は他に比して多

くの性状で特徴的であった。Ⅳ群のファージ： 外観正六角形のやや大きい頭部と収縮性尾鞘をつけた尾部からなる；小さな混濁した溶菌斑；やや不安定であり；潜伏期長く，平均放出量小さい；そして血清型Ⅳである。Ⅴ群のファージ： 外観正六角形の頭部と収縮性尾鞘をつけた尾部からなる；小さく混濁した溶菌斑；安定であり；潜伏期長く，平均放出量小さい；そして血清型Ⅴである。Ⅳ群とⅤ群との性状の違いは安定性，血清型にみられるがその差異は小さい。

これら各群の代表ファージは A. salmonicida ファージ型別のためのファージ・セットの一部として有効に利用しうるものであると考える。

謝 辞

本研究の供試菌 *Aeromonas salmonicida* 菌株の収集に際して御高配を賜った北海道大学水産学部微生物学講座の木村喬久教授，第一製薬株式会社の井上進一氏，「せっそう病研究会」の原武史氏らに対して深甚なる謝意を表します。また電子顕微鏡写真の撮影に多大の援助をいただいた本学医学部の上原二郎技官に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) TODD, C. (1933) : The presence of a bacteriophage for *B. salmonicida* in river waters. *Nature*, **131**, 360.
- 2) CHRISTISON, M. H., I. MACKENZIE, and T. J. MACKIE (1938) : *Bacillus salmonicida* bacteriophage : with particular reference to its occurrence in water and the question of its application in controlling *B. salmonicida* infection. *Fish. Scot. Salmon Fish. V. H. M. Stationery Office, Edinburgh.*, 18p.
- 3) PATERSON, W. D., R. J. DOUGLAS, I. GRINYER, and L. A. MCDERMOTT (1969) : Isolation and preliminary characterization of some *Aeromonas salmonicida* bacteriophages. *J. Fish. Res. Bd. Canada.*, **26**, 629-632.
- 4) POPOFF, M. and J. F. VIEU (1970) : Bacteriophage et lysotypie de *Aeromonas salmonicida*. *C. R. Acad. Sci.*, **270**, 2219-2222.
- 5) POPOFF, M. (1971a) : Studies on *Aeromonas salmonicida*. II. Characterization and typing of bacteriophage that act on *Aeromonas salmonicida*. *Ann. Rech. Veter.*, **2**, 33-45.
- 6) POPOFF, M. (1971b) : The value of a specific bacteriophage as a test in the identification of *Aeromonas salmonicida*. *Ann. Rech. Veter.*, **2**, 137-139.
- 7) DUFF, D. C. B. (1937) : Dissociation of *Bacillus salmonicida* with special reference to the appearance of a G form of culture. *J. Bacteriol.*, **34**, 49-66.
- 8) DUFF, D. C. B. (1939) : Some serological relationships of the S, R and G phases of *Bacillus salmonicida*. *J. Bacteriol.*, **38**, 91-100.
- 9) MCCARTHY, D. H. and C. T. RAWLE, (1975) : The rapid serological diagnosis of fish furunculosis caused by 'smooth' and 'rough' strains of *Aeromonas salmonicida*. *J. Gen. Microbiol.*, **86**, 185-187.
- 10) ANDERSON, D. P. (1972) : Virulence and persistence of rough and smooth forms of *Aeromonas salmonicida* inoculated into Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Bd. Canada.*, **29**, 204-206.

- 11) MCCARTHY, D. H. (1978) : Some ecological aspects of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. In "Aquatic Microbiology", pp. 299-324. Edited by F. A. SKINNER and J. M. SHEWAN. Academic Press, London.
- 12) ANDERSON, D. P. (1973) : Investigations of the lipopolysaccharide fractions from *Aeromonas salmonicida* smooth and rough forms. In Symposium on the Major Communicable Fish Diseases in Europe and their Control, pp. 175-179. Food and Agriculture Organization of the United Nations., Rome.
- 13) LINDBERG, A. A. (1973) : Bacteriophage receptors. *Ann. Rev. Microbiol.*, **27**, 205-241.
- 14) FUJIO, V., H. YAMADA, and S. MIZUSHIMA (1981) : Role of lipopolysaccharide in the receptor function for bacteriophage Tu1b in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **148**, 712-715.
- 15) RODGERS, C. J., J. H. PRINGLE, D. H. MCCARTHY, and B. AUSTIN (1981) : Quantitative and qualitative studies of *Aeromonas salmonicida* bacteriophage. *J. Gen. Microbiol.*, **125**, 335-345.
- 16) SPENCER, R. (1963) : Bacterial viruses in the sea. in "Symposium on Marine Microbiology" (C. H. OPPENHEIMER, ed.), 350-365, Charles. C. Thomas, Springfield, Illinois.
- 17) ADAMS, M. H. (1959) : "Bacteriophages". Interscience Publishers Inc., New York.
- 18) BRADLEY, D. E. (1966) : The fluorescent staining of bacteriophage nucleic acids. *J. Gen. Microbiol.*, **44**, 383-391.
- 19) HIDAKA, T. and K. ICHIDA (1976) : Properties of marine RNA-containing bacteriophage. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, **25**, 77-89.
- 20) 日高富男・藤村 剛 (1971) : 海洋バクテリオファージの熱およびクロロホルム耐性. 鹿大・水・紀要, **20**, 155-158.
- 21) HIDAKA, T. (1972) : On the stability of marine bacteriophages. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **38**, 517-523.