

シシャモ *Spirinchus lanceolatus* からの *Aeromonas salmonicida* の初分離 (短報)

伊藤慎悟¹, 岡田のぞみ², 長谷川竜也²

¹北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場, ²北海道立総合研究機構栽培水産試験場

First isolation of *Aeromonas salmonicida* from Shishamo *Spirinchus lanceolatus*

SHINGO ITO¹, NOZOMI OKADA² and RYUYA HASEGAWA²

¹ Salmon and Freshwater Fisheries Institute, Hokkaido Research Organization, *Eniwa, Hokkaido 061-1433*

² Mariculture Fisheries institute, Hokkaido Research Organization, *Muroran, Hokkaido 051-0013, Japan*

In 2022, mortality from wobbly swimming and skinniness occurred in Shishamo. Many bacilli were observed in Safranin-stained kidney smears. Kidneys of five fishes were cultured on Trypto-casein Soy Agar containing 1% sodium chloride and incubated at 15°C for 1 week. Many single colonies producing brown pigments were observed in four out of the five fish. The isolated bacteria were agglutinated with anti-*Aeromonas salmonicida* (As) rabbit serum, and the partial sequence of the 16SrDNA region (1,422 bases) matched 100% with As. The biochemical analysis also identified the organism as an atypical As. This is the first report of As isolation from Shishamo.

キーワード: *Aeromonas salmonicida*, shishamo, *Spirinchus lanceolatus*, シシャモ, 非定型, 分離

シシャモは北海道の太平洋沿岸の水深120 mより浅いところに分布する日本固有種である (森, 2003)。2013年にシシャモの孵化仔魚を成魚まで飼育することに成功し (石田, 2016), その後大型種苗の量産技術開発が進められている (北海道, 2022)。

*Aeromonas salmonicida*は19世紀末の欧州でブラウントラウトから初めて症例報告がされ, それ以来サケ科魚類を養殖しているほとんどの国から報告されている (山本, 2008)。近年では催熟中のウナギでも報告されている (寺島ら, 2021)。また, 海産魚ではムシガレイ (中津川, 1994) やヒラメ (飯田ら, 1997) など多数の海産魚類で報告されている。

2022年に道内の研究施設でシシャモの死亡が発生し, 同じ水槽で飼育されていた遊泳異常魚の腎臓から菌を分離培養したところ, *A. salmonicida*と同定された。本報では分離菌株の塗抹標本像, 16SrDNA遺伝子の遺伝的性状, 抗*A. salmonicida*血清による凝集の有無, 生化学的性状を報告する。

試料及び方法

2022年7月に栽培水試のシシャモで日間死亡率約5%の死亡があった水槽に飼育されていたシシャモのうち, ふらふら遊泳等の異常遊泳する個体を5尾 (平均全長90.0 mm (標準偏差11.5), 平均体重4.4 g (標準偏差1.8)) 採取し, 細菌分離までクラッシュアイスによる冷蔵で当日中に輸送した。実験室到着後, 外観症状を観察し, 全長・体重を測定した。腎臓をスライドガラスに塗抹し, 風乾後, 火炎固定し, サフラニン染色し, 光学顕微鏡を用い400倍で検鏡した。また, 腎臓と脳を1%塩化ナトリウム含有トリプチケースソイ寒天培地 (以下, TSA培地) に塗抹し, 15°Cで7日間培養した。

16SrDNA塩基配列解析にはBacterial 16S rDNA PCR Kit (タカラバイオ) を使用した。キットに添付されているマニュアルに従い, PCR法で増幅し, 得られたPCR産物の塩基配列を調べた。シーケンス解析は株式会社ファスマックに委託した。得られた塩基配列はアメリカ国立生物工学情報センターのオンライン (<https://blast.ncbi>

Table 1 Comparison of the biochemical properties of the bacteria isolated in this study with those of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and marine fish isolates.

	<i>A.salomonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC14174* ¹	Marine fish isolates* ²	This study
Gram stain	—	—	—
Mobility	—	—	—
O/F test	F	F	F
Catalase	+	+	+
Cytochrome oxidase	+	+	+
Brown pigment	+	+	+
Lysin decarboxylase	+	+	—
Indole production	—	+	—
Voges-Proskauer reaction	—	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+
Acid from glucose	+	+	+
Acid from mannitol	+	+	+
Acid from sucrose	—	+	+
Growth at 4% NaCl	+	+*	+

*1:Yamada *et al.* (2000)*2:lida *et al.* (1997)

*:Growth until 4.5%NaCl

This table was prepared with reference to Terashima *et al.*(2021)

nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) を利用し, 相同性検索をした。

凝集試験は北海道大学から分与された抗*A.salmonicida* Ar-3株ウサギ血清を用いた。ウサギ血清は0.85%塩化ナトリウム溶液で10倍希釈して菌液と混合し, 凝集の有無を観察した。

生化学的性状の一部については, API20E (ピオメリュー) を用いて調べた。グラム染色性と細菌の形態的特徴についてはグラム染色キット (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いて調べ, 運動性試験とOF試験は絵面・清水 (1990) の簡易同定法によった。チトクローム・オキシダーゼ試験はチトクローム・オキシダーゼ試験用紙「ニッスイ」(日水製薬) を用い, カタラーゼ試験は新鮮培養菌体に3%過酸化水素水を滴下して実施した。塩分耐性は中井ら (1985) の方法で調べた。なお, 16SrDNA領域の部分塩基配列解析, 抗*A.salmonicida*ウサギ血清による凝集試験, および生化学的性状試験には, 3回純粋分離した菌株を用いた。

結果および考察

症状としてはふらふらとした異常遊泳, 痩せ, 下顎出血が見られた。解剖したが, 臓器が小さいため, 異常を

判別することはできなかった。

腎臓のサフラニン染色像を観察したところ, 桿菌が多数観察された。腎臓と脳を1%塩化ナトリウム含有TSA培地で培養したところ, 腎臓では5検体中4検体で, 脳では5検体中3検体で褐色色素を産生するほぼ同一のコロニーが多数観察された。このことから, 腎臓で観察され, 脳と腎臓から分離された桿菌が死亡原因である可能性があった。今回分離された株は褐色色素産生することから, *A.salmonicida*が疑われたが, ヒラメ稚魚から分離された *Vibrio anguillarum*でも褐色色素産生の報告があることから (Sakai *et al.*, 2006), 16SrDNA領域の塩基配列解析, 抗*A.salmonicida*ウサギ血清による凝集試験, 生化学的性状試験を実施した。

解析された16SrDNA領域の部分塩基配列1,422塩基は *A. salmonicida*の塩基配列 (NCBI Accession No. KU359246.1) と100%一致した。また, 抗*A.salmonicida* Ar-3株ウサギ血清による凝集試験は陽性だった。生化学的性状を表1に示した。本分離菌株は非運動性のグラム陰性桿菌であり, OF試験は好気性および通性嫌気性, カタラーゼ試験とチトクローム・オキシダーゼ試験は陽性, 褐色色素を産生した。また, 発育には塩化ナトリウムを要求しなかったが, 塩化ナトリウム濃度が4%までの液体培地まで発育可能であった。

以上の結果から, 今回分離された菌は非定型の

*A.salmonicida*であると考えられた。

シシヤモからの*A.salmonicida*の分離報告は初めてであり、今後感染試験で病原性や毒力を検討していく必要がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、抗*A. salmonicida*ウサギ血清を分与して頂いた北海道大学の笠井久会准教授に謝意を表します。

引用文献

- 絵面良男, 清水潮: “水質・微生物篇”, 日本海洋学会 (編), 沿岸環境調査マニュアルⅡ. 恒星社厚生閣, 東京. 1990; 9-20.
- 北海道. 水産動物の種苗の生産及び放流並びに水産動物の育成に関する基本計画 (第8次栽培漁業基本計画) (令和4年度~令和8年度). 札幌. 2022; 8.
- 飯田貴次, 坂田千夏, 川津浩嗣, 福田穰. 海産魚の非定型*Aeromonas salmonicida*感染症. 魚病研究 1997; 32: 65-66.
- 石田良太郎. 資源管理・海洋環境シリーズ 飼育実験によるシシヤモの生態研究. 北水試だより 2016; 93: 10-15.
- 森泰雄. 14. シシヤモ. 新 北のさかなたち (水島敏夫・鳥澤雅監修, 上田吉幸・前田圭司・嶋田宏・鷹見達也編), 北海道新聞社, 札幌. 2003; P.86-89.
- 中井敏博, 花田博, 室賀清邦. 養殖アユに発生した*Pseudomonas anguilliseptica*感染症. 魚病研究 1985; 20: 481-484.
- 中津川俊夫. ムシガレイから分離された非定型*Aeromonas salmonicida*. 魚病研究 1994; 29: 193-198.
- Sakai, T, Yamada H, Shimizu H, Yuasa K, Kamaishi T, Oseko N, Iida T. Characteristics and pathogenicity of brown pigment-producing *Vibrio anguillarum* isolated from Japanese flounder. *Fish Pathology*, 2006;41:77-79.
- 寺島祥子, 樋口理人, 今泉均, 桐生郁也, 松浦雄太, 高野倫一, 松山知正, 栗田潤, 森広一郎. 親魚養成中に発生したウナギの非定型*Aeromonas salmonicida*感染症. 魚病研究 2021; 56: 26-29.
- Yamada, Y, Kaku Y and Wakabayashi H. Phylogenetic intrarelationships of atypical *Aeromonas salmonicida* isolated in Japan as determined by 16S rDNA sequencing. *Fish Pathology*, 2000; 35(1): 35-40.
- 山本淳. 第4章細菌病 §3. サケ科魚類および淡水魚の細菌病. 改訂魚病学概論 (小川和夫・室賀清邦編). 恒星社厚生閣, 東京. 2008; 60-66.