

**Fig. 31.** Micrographs of burst and discharge of protoplasm after dipping the infected nori thalli into fresh water for 15 min. A, B, RS-5LY isolate; C, D, KS-4Y isolate. Scales=10 $\mu$ m.

しい原形質吐出が観察された (Fig. 31-C, D)。NS-5Y, NS-11Y, KS-1W, KS-25W の各菌株でも原形質吐出が観察されたものの、その程度は軽かった。このように同一ノリ葉体から分離した数種類の菌株で病原性が認められた。7 日後に各実験ノリ葉体から細菌の再分離を行った。その結果、同培地上に接種菌と同一の形態、色調を示すコロニーが出現し、接種菌と同一の細菌を再分離することができた。また、各接種菌株の再分離数は、KS-4Y 株では10<sup>6</sup>個/g、そのほかはいずれも10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> 個/gであった。

## 2) 培養水温条件の違いによる発症

DY-1219 4Y 株接種後の発症試験の結果は、Table 6 に示すとおりである。5 $^{\circ}$ Cにおける細菌の付着は1, 2, 4, 5 日後に、原形質吐出は2, 4, 5 日後にノリ葉体のところどころに観察された。10 $^{\circ}$ Cでは細菌は Fig. 32-A, B に示すように1 日後に全面で濃密に付着しているのが観察された。2 日後には少なくなったが、5 日後まで観察された。原形質吐出は2 日後には散見され (Fig. 32-C, D), 3 日後には縁辺部を中心に全面で観察され、その後も継続してみられた。15 $^{\circ}$ Cでは1, 3 日後にみら

**Table 6.** Pathogenicity of the isolate DY-1219 4Y against nori thalli

Days after inoculation	Temperature ( $^{\circ}$ C)					
	DY-1219 4Y			Control		
	5	10	15	5	10	15
1	-*1(+)*2	-(++)	+(-)	-(-)	-(-)	-(-)
2	+(+)	+(++)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
3	-(-)	++(++)	+(-)	-(-)	-(-)	-(-)
4	+(+)	++(+)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
5	+(+)	++(+)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)

\*1 Percentage (%) of burst and discharge ratio of protoplasm after dipping into fresh water for 15 min. -, none; +, > 5%; ++, 6-30%.

\*2 Bacterial number on the edge of thalli by observed optics microscopy. -, none; +, small; ++, many.

れたが、原形質吐出は観察されなかった。いずれの実験区でも原形質吐出以外の症状はみられなかった。原形質吐出の症状は顕微鏡的には細胞同士つながって吐出する場合と、数細胞ずつ所々で原形質吐出する場合があった。

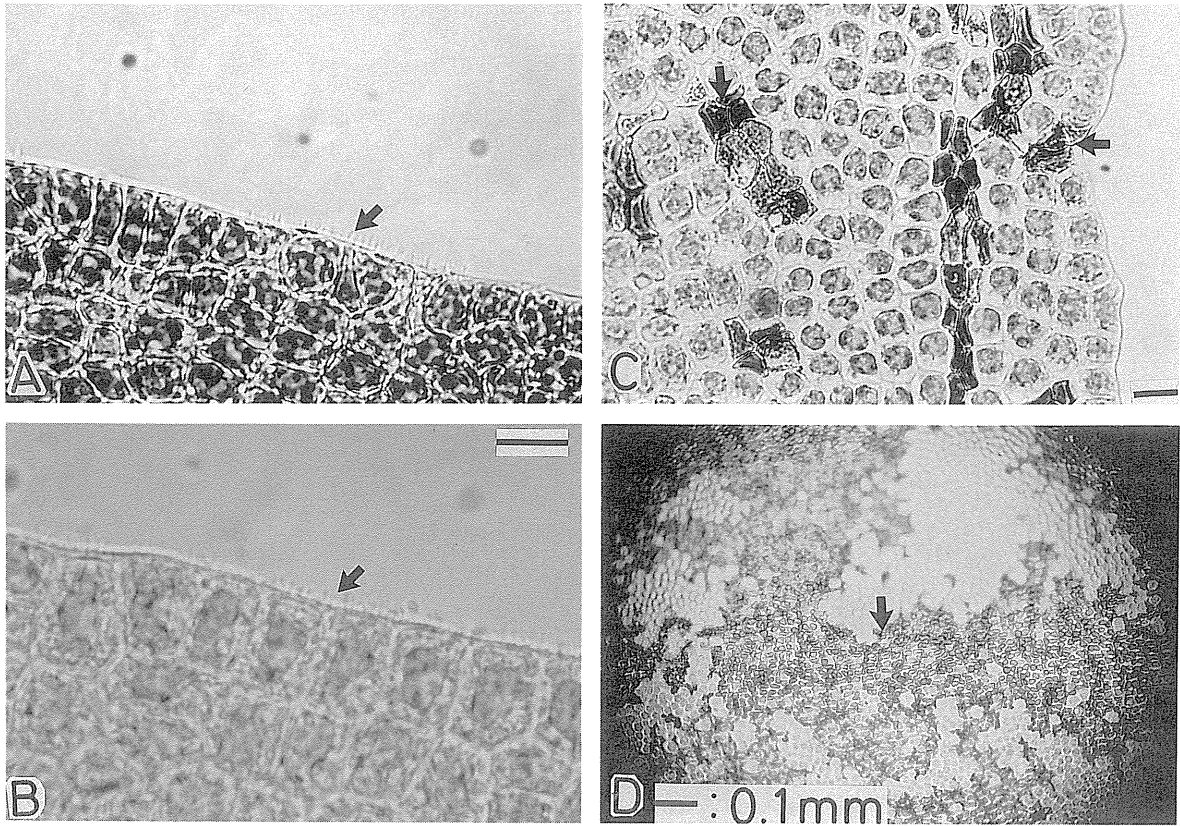


Fig. 32. Micrographs of adherent bacteria (A, B, arrows) and burst and discharge of protoplasm after dipping the infected nori thalli into fresh water for 15 min (C, D, arrows). Scales=10 $\mu$ m.

発症したノリ葉体に付着していた黄色菌数を10 $^{\circ}$ C実験区の3日後に調べたところ、 $3.3 \times 10^7$ 個/gであった。この細菌を分離し再度発症試験を行った結果、同じく原形質吐出が観察された。

RS-5LY株接種後の発症試験の結果は、Table 7に示すとおりである。14 $^{\circ}$ Cでは接種したのち5日後に原形質吐出がみられ、Fig. 33に示すように細菌の付着も観察された。20 $^{\circ}$ Cでは原形質吐出は観察されたものの、14 $^{\circ}$ Cに比べて程度が軽く細菌の付着も観察されなかった。14 $^{\circ}$ Cでは細菌数は、 $3.8 \times 10^7$ 個/g、20 $^{\circ}$ Cでは $3.3 \times 10^8$ 個/gが計数された。これらの結果から培養水温による発症の程度に差がみられることが明らかとなった。この細菌を分離し再度発症試験を行った結果、同じく原形質吐出が観察された。

### 3) 供試ノリ葉体の違いによる発症

供試ノリ葉体の前歴によって、発症の程度が異なるかどうかを検討するために、RS-5LY株を用いて試験した。その結果は、Table 8に示すとおりである。-20 $^{\circ}$ Cで冷凍保存していたノリ葉体では、6、9日後には原形質吐出の程度が、-30 $^{\circ}$ Cで冷凍保存していたノリ葉体より

Table 7. Pathogenicity of the isolate RS-5LY against nori thalli

Days after inoculation	Temperature ( $^{\circ}$ C)			
	RS-5LY		Control	
	14	20	14	20
2	-*1(-)*2	-(-)	-(-)	-(-)
3	-(+)	-(-)	-(-)	-(-)
5	++(-)	+(-)	-(-)	-(-)
9	+++(+)	+(-)	-(-)	-(-)

\*1 Percentage (%) of burst and discharge ratio of protoplasm after dipping into freshwater for 15 min. -, none; +, > 5%; ++, 6-30%.

\*2 Bacterial number on the edge of thalli by observed optics microscopy. -, none; +, small.

も著しかった。

## 考 察

月館 (1973), Tsukidate (1977), Shiba and Taga (1980) も述べているように、ノリ葉体には多種の細菌

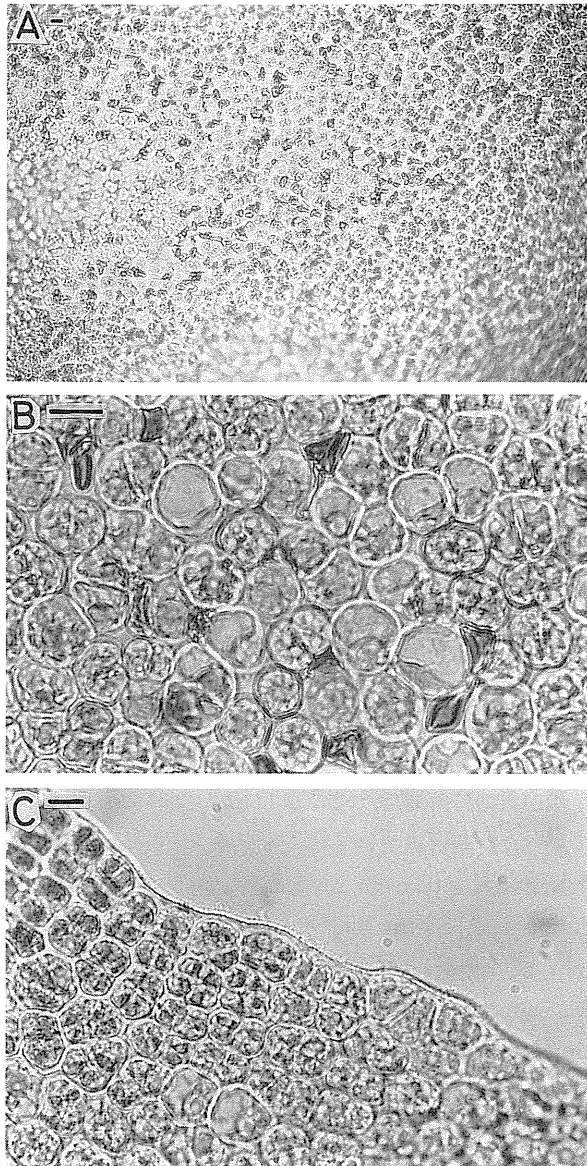


Fig. 33. Micrographs of burst and discharge of protoplasm after dipping the infected nori thalli into fresh water for 15 min (A, B), adherent bacteria (C). Scales=10 $\mu$ m.

が付着しており、単一種の純粋培養状態のコロニーとして分離されることは少ないと考えられる。ところが、1990年度に発生した本病ノリ葉体からは、優占したコロニーとして分離されており、被害が著しいときのノリ葉体には、特定の細菌が優占するものと考えられる。

1985、1990年度に佐賀県有明海、1991年度に佐賀県有明海と唐津湾でみられた本病ノリ葉体から細菌を分離し、発症試験を行った。その結果、供試した DY-1219 4Y, RS-5LY, NS-5Y, NS-11Y, NS-17Y, KS-1W, KS-4Y, KS-25W 株の 8 菌株では、発症の程度に差はある

Table 8. Pathogenicity of the isolate RS-5LY against nori thalli frozen at different temperature

Days after inoculation	Frozen storage temperature (°C)			
	RS-5LY		Control	
	-20	-30	-20	-30
3	#*1(+)*2	#(+)	-(-)	-(-)
6	#+(+)	\$(+)	-(-)	-(-)
9	+++(+)	##\$(+)	-(-)	-(-)

\*1 Percentage (%) of burst and discharge ratio of protoplasm after dipping into fresh water for 15 min. -, none; +, > 5%; ++, 5-10%; +++, 10-20%; #, Hypertrophy of vacuole; \$, unusual cells (dead cell, unusual division).

\*2 Bacterial number on the edge of thalli by observed optics microscopy. -, none; +, small.

ものの、養殖場でみられる原形質吐出症状をひき起こし、また、それぞれ接種した細菌が再分離できた。

今回の発症試験によって、同一ノリ葉体から分離した数種の細菌が病原性をもつこと、藤田・楠 (1986) が *Flavobacterium* 属の菌株をノリ葉体に接種して本病でみられる原形質吐出の症状の発症を確認していることから、本病を発症させる細菌は数種あり、それぞれ病原力も異なるものと考えられる。

ノリ葉体の緑斑病を起こす細菌は、ポルフィラン分解酵素を分泌し、細胞壁の一部を破壊し葉体を崩壊するため、ポルフィランなど細胞壁構成成分を直接分解すると考えられている (藤田, 1973)。ところが、本病の場合、実際の養殖場でみられる本病ノリ葉体や発症試験で原形質吐出症状を起こしたノリ葉体は、通常の海水中では、液胞肥大は観察されるものの、正常ノリ葉体と比べて表面の形状になんらの相違も認められていない。したがって、本病の病原細菌は、緑斑病の病原細菌のように細胞壁分解酵素は分泌していないか、あるいは少ないと考えられる。また、発症試験で観察された症状はいずれも原形質吐出であることから、細菌によって起きる症状としては、第2章で分類した PP, CN 型に該当すると考えられる。この2つの型となる原因は、穴を開けるといった物理的な要因で起きているものではないと考えられたことから、細菌が産生する物質が関与していることが推察される。

水温を変えて行った発症試験においては、1985年度に分離した DY-1219 4Y 株を用いた試験の結果、同年度の発生危険期の平均水温10.9°Cに近い10°Cにおいて、最も病原性が強かった。また、1990年度に分離した RS-5LY

株を用いた試験の結果、同年度の発生危険期の平均水温 14.4°Cに近い14°Cにおいて病原性が強かった。このように、水温条件としてはノリ葉体の生育適温とされる温度よりも(右田・川村, 1981), やや低い条件で室内の発症が著しく, 養殖場でみられるような細菌の付着も観察された。

いっぽう, 前歴の異なるノリ葉体を用いた発症試験においては, -20°Cで冷凍保存されたノリ葉体に接種した実験区で, 発症が著しかった。この結果は-20°Cで冷凍保存されたノリ葉体が, -30°Cで冷凍保存されたノリ葉体よりも生理状態が悪いと考えられていることから(佐賀県有明水産試験場, 1992), 生理状態が悪いノリ葉体で発症が著しくなることを示唆している。以上の実験結果から, 前に述べた環境要因が誘因となっているのではないかと考えられる。

## 第2節 病原細菌の分類に関する研究

本章第1節において, 本病ノリ葉体から分離した菌株がノリ葉体に対して病原性があるかどうかを発症試験を行って調べたところ, 8菌株で病原性があることが明らかとなった。

そこで, 本節では病原性を示した分離菌株について各種の性状を調べ, 分類に関する検討を行った。

### 材料および方法

#### 1. 形態学的, 生物学および生理学的性状

##### 1) 形態学的性状

病原菌株の各種の性状検査は, ZoBell 2216 E 培地およびそのブイオン培地を, 基本とし, 20°C, 24~48時間培養した新鮮培養菌を用い, 常法にしたがい20°Cで行った。大きさと細胞の形態は, 光学顕微鏡と SEM で常法のとおり観察した。グラム染色は劉の方法, Hucker の変法で判定した。鞭毛染色は西沢・菅原の方法, 運動性は SIM 培地による運動性試験, 0.2%寒天, ZoBell 2216 E 培地で判定した。

##### 2) 生物学および生理学的性状

培地の生育に関する検査では, マッコンキー寒天, TSI 寒天, BHI 寒天は栄研化学製を用いた。市販の培地はいずれも食塩濃度が2.0%になるように調整した。発育と塩分濃度の関係は, 0.0~5.0% (W/V) の食塩を加えた ZoBell 2216 E ブイオン培地に, 培養菌の一定量を接種し, 発育の有無と程度を観察して検査した。発育と pH の

関係は, pH を4.25~9.04になるように調整した ZoBell 2216 E ブイオン培地に培養菌の一定量を接種し, 発育の有無と程度を観察して検査した。発育と水温の関係は, ZoBell 2216 E ブイオン培地に培養菌の一定量を接種し, 5~37°Cにおける発育の有無と程度を観察して検査した(坂崎, 1982a, b; 医科学研究所学会編, 1984)。

## 2. 生化学的性状および蛋白質分解性状

### 1) 生化学的性状

病原菌株の各種性状検査は, ZoBell 2216 E 培地およびそのブイオン培地を基本とし, 20°C, 24~48時間培養した新鮮培養菌を用い, 常法にしたがい20°Cで行った。生化学的性状検査のうちチトクローム・オキシダーゼ試験, DNA 分解試験, ONPG 試験は日水製薬製を用いた。市販の培地はいずれも食塩濃度が2.0%になるように調整した。OF 試験は試験培地に MOF 培地を作製して用いた。炭水化物の分解試験は, 糖加アンモニウム培地を基礎培地として行った。(坂崎, 1982a, b; 医科学研究所学会編, 1984)。

### 2) 蛋白質分解性状

蛋白質の分解能は, Shotts *et al.* (1984) の方法によって調べた。基質については, ゼラチン (Gelatin, Difco 製), カゼイン (Casein, Merck 製), エラスチン (Elastin congo red, Sigma 製), ヘモグロビン (Bactohemoglobin, Difco 製), アルブミン (Bovine serum fraction V, Sigma 製), フィブリノーゲン (Bovine serum fraction I, Sigma 製), コラーゲン (Type I, Sigma 製) を用いた。なお, 菌株の同定は医学細菌同定の手びき第2版(1974), Bergey's Manual 9版(1984)を用いて行った。

## 結 果

### 1. 形態学的, 生物学および生理学的性状

#### 1) 形態学的性状

病原菌株の形態および生物学の性状は, Table 9 に示すとおりである。RS-5LY, NS-5Y, NS-11Y, NS-17Y, KS-1W, KS-25W 株はいずれも桿菌で, DY-1219 4Y, KS-4Y 株は桿菌または球菌であった。とくに, DY-1219 4Y はブイオンで培養すると, Fig. 34 に示すように0.5×5-6.0μm (Fig. 34-A) であるが, これを斜面で培養すると, 0.5×0.5-1.0μm (Fig. 34-B) の大きさへ変化する多形態性が観察された。

DY-1219 4Y, RS-5LY, NS-5Y, NS-11Y 株は, グラム染色は陰性, 非運動性であった。コロニーは正円形,



周縁円滑でやや隆起し、黄色あるいは橙色で、湿潤性の光沢を呈した。KS-4Y株は、性状は前者と同じであるが、黄色あるいは白色のコロニーを形成した。NS-17Y株は、グラム染色は陰性、非運動性であったが、コロニーは不規則状、周縁ざざざ状で隆起し、黄色で、湿潤性の光沢を呈した。KS-1W, KS-25W株は、グラム染色は陰性、運動性であった。コロニーは正円形、周縁円滑でやや隆起し、白色で、湿潤性の光沢を呈した。

## 2) 生物学および生理学的性状

病原菌株の寒天培地上の生育は、Table 10 に示すとおり

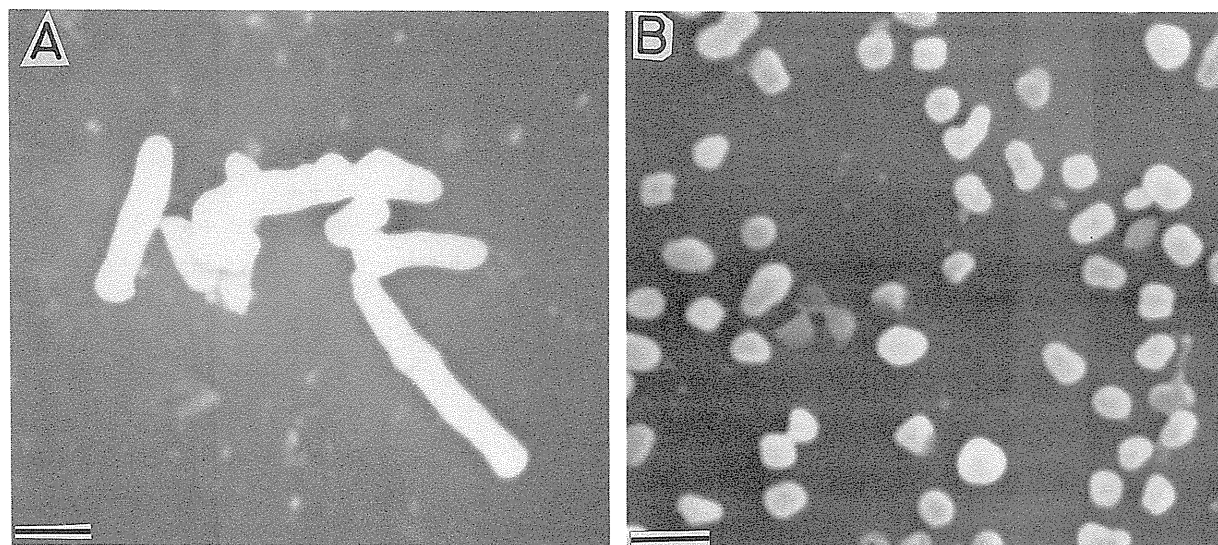
りである。RS-5LY, NS-4Y, NS-11Y, NS-17Y株は、ZoBell 2216 E 寒天培地, TSI 寒天培地に発育したが、マッコンキー寒天培地, BHI 寒天培地に発育しなかった。DY-1219 4Y, KS-1W, KS-4Y, KS-25W株は、ZoBell 2216 E 寒天培地, TSI 寒天培地, BHI 寒天培地に発育したが、マッコンキー寒天培地に発育しなかった。

食塩濃度, pH の発育性および培養温度が及ぼす影響については、Table 11 に示すとおりである。食塩濃度について、DY-1219 4Y, KS-4Y 株では0.0~5.0%の全て

**Table 9.** Morphological characteristics of the isolates

Character	Isolates							
	DY-1219 4Y	RS- 5LY	NS- 5Y	NS- 11Y	NS- 17Y	KS- 1W	KS- 4Y	KS- 25W
Cell form	R	R	R	R	R	R	R, C	R
Cell size ( $\mu\text{m}$ )	0.5-1.0 × 0.5-6.0	0.8-1.0 × 1.0-10.0	0.4-0.6 × 1.0-10.0	0.4-0.6 × 1.0-7.0	0.2-0.5 × 2.0-15.0	0.6-0.8 × 1.0-4.0	0.8-1.0 × 0.8-4.0	0.8-1.0 × 1.0-2.5
Gram stain	-	-	-	-	-	-	-	-
Flagellum	-	-	-	-	-	+	-	+
Motility	-	-	-	-	-	+	-	+
Color of cell mass	Y	LY	Y	Y	Y	W	Y, W	W

C, cocci ; LY, light yellow ; R, rod ; W, white ; Y, yellow.



**Fig. 34.** Scanning electron micrographs of DY-1219 4Y isolate. Bacteria were cultivated at 18°C in ZoBell 2216 E broth (A) and ZoBell 2216 E agar (B). Scales=10 $\mu\text{m}$ .

の濃度で発育した。RS-5LY, NS-5Y, NS-11Y, KS-1W, KS-25W 株では, 0.5~5.0%で発育した。NS-17Y 株では2.0, 3.0%で発育した。

発育 pH 域については, RS-5LY 株では pH 5.19~9.04で発育した。この株以外は, いずれも pH 6.00~9.04で発育した。

培養温度については, DY-1219 4Y, KS-1W, KS

-4Y, KS-25W 株では 5~37°Cの温度範囲で発育した。RS-5LY, NS-5Y, NS-11Y 株では 5~30°Cで発育した。NS-17Y 株では10~30°Cで発育した。

## 2. 生化学的性状および蛋白質分解性状

### 1) 生化学的性状

病原菌株の生化学的性状は, Table 12 に示すとおりである。DY-1219 4Y は, カタラーゼ, チトクローム, DNA

**Table 10.** Cultural characteristics of the isolates

Character	Isolates							
	DY-1219 4Y	RS- 5LY	NS- 5Y	NS- 11Y	NS- 17Y	KS- 1W	KS- 4Y	KS- 25W
Growth on:								
ZoBell 2216 E agar	+	+	+	+	+	+	+	+
MacConkey agar	-	-	-	-	-	-	-	-
TSI agar	+	+	+	+	+	+	+	+
BHI agar	+	-	-	-	-	+	+	+

**Table 11.** Effects of NaCl concentration, pH and temperature on the growth of the isolates

Character	Isolates							
	DY-1219 4Y	RS- 5LY	NS- 5Y	NS- 11Y	NS- 17Y	KS- 1W	KS- 4Y	KS- 25W
NaCl concentration (%) 18°C pH7.6								
0.0	+	-	-	-	-	-	+	-
0.5	++	W	W	+	-	+	+	W
1.0	++	++	+	+	-	+	+	+
2.0	++	++	+	+	+	++	++	++
3.0	++	+	+	+	+	++	++	++
4.0	++	+	+	+	-	++	+	++
5.0	+	+	+	++	-	++	+	++
pH 18°C								
4.25	-	-	-	-	-	-	-	-
5.19	-	W	-	-	-	-	-	-
6.00	+	++	++	++	+	++	++	++
7.40	++	++	++	++	+++	+++	++	++
8.31	++	++	++	++	+++	+++	++	++
9.04	++	+	++	++	+++	++	++	++
Temperature (°C) pH7.6								
5	+	+	+	+	-	++	+	+
10	++	++	++	++	+	++	++	++
15	++	++	++	++	++	+++	++	++
20	++	++	++	++	+++	+++	++	+++
25	++	++	++	++	+++	+++	++	+++
30	++	++	+	+	++	+++	++	++
37	+	-	-	-	-	++	+	+

+++ , pellicle produced on the surface of broth medium ; ++ , cells sedimentated in the broth medium ; + , positive growth ; W , poor growth ; - , no growth.

分解,ゼラチン分解,Tween 80分解,でんぷん分解,硝酸還元エスクリン分解は陽性,インドールと硫化水素産生,MR試験,VP反応,ウレアーゼ,チロシン分解,リジン・アルギニン・オルニチンの脱炭酸と $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生性,0/129感受性は陰性であった。ブドウ糖を酸化的に分解した。C源としての有機酸の利用性では,クエン酸塩,マロン酸塩を利用しなかった。RS-5LY株は,カタラーゼ,オキシターゼは陽性で,ブドウ糖を分解しなかった。インドール,MR試験,VP反応,ウレアーゼ,DNA分解,リジン・アルギニン・オルニチン脱炭酸性,チロシン分解,Tween 80分解,でんぷん分解,エスクリン分解,硫化水素産生,0/129感受性は陰性であった。硝酸還元,ゼラチン液化性, $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生性は陽性であった。C源としての有機酸の利用性では,クエン酸塩,マロン酸塩を利用しなかった。NS-5Y,NS-11Y,NS-17Y株は,RS-5LY株によく似た性状であった。ただ,NS-5Y,NS-11Y株はエスクリン分解と $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生性,0/129感受性,NS-17Y株は,オキシターゼ,DNA分解,チロシン分解, $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生性,0/129感受性でRS-5LY株の性状と異なっていた。KS-1W株は,カタラーゼ陽性,オキシターゼ陽性で,ブドウ糖を発酵した。インドール,MR試験,

VP反応,ウレアーゼ,リジン・アルギニン・オルニチン脱炭酸性,硫化水素産生能,0/129感受性は陰性であった。DNA分解,チロシン分解,硝酸還元,ゼラチン液化性,Tween 80分解,でんぷん分解,エスクリン分解, $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生性は陽性であった。C源としての有機酸の利用性では,クエン酸塩,マロン酸塩を利用しなかった。KS-25W株ではカタラーゼ,チロシン分解,エスクリン分解,硫化水素産生能でKS-1W株の性状と異なっていた。KS-4Y株は,ブドウ糖を酸化的に分解し,DNA分解,Tween 80分解,でんぷん分解が陽性という点を除いて,RS-5LY株と同じであった。KS-4Y株の性状は,DY-1219 4Y株と比較すると,エスクリン分解, $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生性で異なるほかは,同一であった。

病原菌株の各種炭水化物から酸産生性は,Table 13に示すとおりである。DY-1219 4Y株は,キシロース,グルコース,フラクトース,ラフィノースは酸産生性,アラビノース,スクロース,セロビオース,ラクトース,マニトールは非産生性であった。RS-5LY株は,キシロースからのみ,酸を産生し,そのほかの糖からは酸を発生しなかった。NS-17Y株はすべての糖から酸を産生した。NS-5Y,NS-11Y株では,マルトースを分解し酸を産生

Table 12. Biochemical characteristics of the isolates

Character	Isolates							
	DY-1219 4Y	RS- 5LY	NS- 5Y	NS- 11Y	NS- 17Y	KS- 1W	KS- 4Y	KS- 25W
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	-
Cytochrome oxidase	+	+	+	+	-	+	+	+
O-F test in MOF medium	O	-	-	-	-	F	O	F
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-
MR test	-	-	-	-	-	-	-	-
VP reaction	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-
DNase	+	-	-	-	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-
Tyrosine clearing	-	-	-	-	W	+	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilization of organic acid;								
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-
Malonate	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80 hydrolysis	+	-	-	-	-	+	+	+
Starch hydrolysis	+	-	-	-	-	+	+	+
Esculin hydrolysis	+	-	+	+	-	+	-	-
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-	-	-	-	W
$\beta$ -Galactosidase	-	+	-	-	-	+	+	+
O/129 sensivity	-	-	+	+	+	-	-	-

F, fermentative; O, oxidative; W, weakly positive.





その結果、発症が著しかった DY-1219 4Y, RS-5LY, KS-4Y 株では、共通している性状が多く、これらの菌株が有する性状が発症と深い関係があると考えられた。とくに、蛋白質分解性については、いずれの菌株も多くの蛋白質基質を分解していた。ノリ葉体の細胞壁には、蛋白質があることが知られており (Mukai *et al.*, 1981)、本病の発症に蛋白質分解酵素が関与しているのではないかと考えられる。

性状検査の結果から、病原菌株の形態学的、生物学的ならびに生化学的性状を、医学細菌同定の手びき(1974)および Bergey's Manual 9 版 (1984) の記載と比較した。Flavobacterium 属に該当すると考えられた菌の主要な性状を Bergey's Manual 9 版 (1984) に記載されている Flavobacterium 属の性状と比較すると、Table 15 に示すとおりである。これによると Flavobacterium 属はグラム陰性、好氣的、色素産生、カタラーゼ、オキシターゼは陽性、カゼインとゼラチン分解である。しかし、無鞭毛 Flavobacterium 属は、Cytophaga 属と Flexibacterium 属の多くと混同される。最近の Flavobacterium 属の分類はスウオーミングを示す Cytophaga 属と異なる非運動性とされている (Bernardet, 1989)。これらの特徴から、この研究の結果は、両株が Bergey's Manual 9 版 (1984) に記載されている Flavobacterium 属に同定される *F. aquatile*, *F. breve*, *F. balustinum*, *F. meningosepticum*, *F. odoratum*, *F. multivorum*, *F. spiritivorum* の 7 種とは好気性と炭水

化物からの酸の産生から異なっている。ほかに新しい種として *F. branchiphila* が近年、淡水魚のえら病の原因種として報告されている (Waka bayashi *et al.*)。今回の DY-1219 4Y 株は、生化学的性状は現在、報告されている Flavobacterium 属のうち *F. aquatile* に似ている。しかし、炭水化物からの酸の産生の点で多くの違う性状がある。この株は本病の病原細菌の 1 種で Flavobacterium 属の新種であると考えられる。

KS-4Y 株は DY-1219 4Y 株の性状と比較すると、エスクリン分解、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生性、糖からの酸の産生性で一部異なるほか同一であり、近似の種と考えられる。

Bergey's Manual 9 版 (1984) に記載されている Vibrio 属とノリ葉体に緑斑病様の障害を起こさせた Vibrio 属 (藤田ら, 1972) の主要な性状を比較すると、Table 16 に示すとおりである。これによると、Vibrio 属はグラム陰性、桿菌、運動性、オキシターゼは陽性、糖を発酵的に分解するとされている。分離菌の KS-1W, KS-25W 株が、*Vibrio cholerae*, *V. metschnikovii*, *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. parahaemolyticus*, *V. alinolyticus*, *V. natriegenes*, *V. vulnificus*, *V. nereis*, *V. fluvialis* I, *V. fluvialis* II, *V. splendidus* I, *V. splendidus* II, *V. pelagius* I, *V. pelagius* II, *V. nigriputchritudo*, *V. anguillarum* I, *V. anguillarum* II, *V. fischeri*, *V. logei*, *V. proteolyticus*, *V. gazogenes*, *V. marinus*, *V. costicola* の 24 種と同じ性

**Table 15.** Comparison of characteristics to differentiate isolates from reported species of genus *Flavobacterium*

Character	Isolates						<i>Flavobacterium</i>							
	DY-1219 4Y	RS- 5LY	NS- 5Y	NS- 11Y	NS- 17Y	KS- 4Y	1	2	3	4	5	6	7	8
Acid produced from ;														
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Xylose	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
Glucose	+	-	-	-	-	+	+	d	+	d	-	+	+	+
Fructose	+	-	-	-	-	+	-	-	+	d	-	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	+	+	-	-	d	-	+	+	-
Sucrose	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Cellobiose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Maltose	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Raffinose	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Salicin	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
Mannitol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	d	-	-	+	-
Ethanol	-	-	-	-	-	+	-	-	+	d	-	-	+	
MacConkey agar	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
Casein (milk)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Esculin hydrolysis	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	+	+	d	+	-	-	-
Starch hydrolysis	+	-	-	-	-	+	NG	-	-	-	-	-	-	+
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	+	+	+	
$\beta$ -Galactosidase	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-

d, 11-98% of the strains are positive; NG, no growth. 1, *F. aquatile*; 2, *F. breve*; 3, *F. balustinum*; 4, *F. meningosepticum*; 5, *F. odoratum*; 6, *F. multivorum*; 7, *F. spiritivorum*; 8, *F. branchiphila*.

Table 16. Comparison of characteristics to differentiate isolates from reported species of *Vibrio*

Character	Isolates																												
	KS- IW	KS- 25W	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
Cell form	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Gram stain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flagellum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmentation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl concentration (%) 18°C pH 7.6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temperature (°C)																													
3.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cytochrome oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O-F test	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilization of organic acid:																													
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid produced from:																													
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ethanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

F, fermentative; R, rod; W, white; 1, *V. cholerae*; 2, *V. metschnikovii*; 3, *V. harveyi*; 4, *V. campbellii*; 5, *V. parahaemolyticus*; 6, *V. alinolyticus*; 7, *V. natriogenes*; 8, *V. vulnificus*; 9, *V. nereis*; 10, *V. fluvialis* I; 11, *V. fluvialis* II; 12, *V. splendidus* I; 13, *V. splendidus* II; 14, *V. pelagius* I; 15, *V. pelagius* II; 16, *V. nigriripulchritudo*; 17, *V. anguillarum* I; 18, *V. anguillarum* II; 19, *V. fischeri*; 20, *V. logei*; 21, *V. proteolyticus*; 22, *V. gazogenes*; 23, *V. marinus*; 24, *V. costicola*; 25, *V. sp.* (Fujita et al., 1972); 26, *Benecke* sp. (Tsukidate, 1977).

状であったのは、桿菌、グラム陰性、鞭毛、運動性、3.0% NaCl・20°Cでの生育、糖を発酵する、グルコース、フラクトース、マルトースからの酸の産生性であった。それぞれ異なった性状を示したのは、色素産生性、食塩濃度・水温条件での生育、オキシターゼ、VP 反応、リジン・オルニチン脱炭酸性、硝酸還元、C 源としての有機酸の利用性ではクエン酸塩、ゼラチン液化性、エスクリン加水分解、β-ガラクトシダーゼ産生性、キシロース、ラクトース、スクロース、セロビオース、サリシン、マニトール、エタノールからの酸の産生性であった。また、緑斑病様を起こした *Vibrio* 属と同じ性状を示したのは、非色素産性、NaCl 要求性、オキシターゼ陽性、糖を発酵する、VP 反応、アルギニン脱炭酸、ゼラチン液化性、寒天加水分解性、キシロース、グルコース、スクロース、マニトールからの酸の産生性であった。いっぽう、異なった性状は MR 試験だけであった。

以上のことから、それぞれの菌株の分類学上の位置としては、Table 17 に示すとおりで、*Flavobacterium* 属あるいは *Vibrio* 属として同定するのが妥当であると考えられる。ただ、ここでは遺伝子レベルでの分類学的検討は行っていないので、いずれも属までの分類に止めた。今後、本病の病原細菌に関する詳細な研究が必要であると考えられる。

### 第3節 病原細菌の産生物質に関する研究

本章第1節において、分離菌のノリ葉体に対する病原性を発症試験を行って調べたところ、8菌株において病原性があることが明らかとなり、本病の発病には病原細菌の産生物質が関与していることが推測された。

そこで、本節では第1節における発症試験で病原性が強かった菌株が、ブイヨンで培養したのちのろ液でも病原性を示すかどうかを確認し、ろ液に含まれている産生物質がどのような性状であるかを調べた。そして、病原菌株から産生物質を抽出して、どのような物質であるかを検討した。

## 材料および方法

### 1. 病原細菌の培養ろ液による発症試験

**供試菌株** 実験には第1節の発症試験において原形質吐出の症状が著しかった RS-5LY 株、*Flavobacterium* sp.を供した。

**細菌培養ろ液の調整** 細菌は新鮮菌を斜面で20°C、2日間の培養を行った。実験の培養液は、ノリ抽出液を基本海水として ZoBell 2216 E 培地とゼラチン0.5%加培地とし、pH7.7になるように調整して高圧蒸気滅菌したものである。ノリ抽出液は乾製品ノリ0.8%を含んだ26%海水を3時間煮沸して、これをガーゼでろ過したのち、蒸発した量だけ加えたものを×12,000g、30分間の高速遠心でノリの残渣を除去した。この培養液50mlに10<sup>9</sup>個の菌体を接種し、22°Cの恒温室で培養振とう器（大洋科学工業製、Recipro shaker R-Imini）を用いて、100回/分の条件で5日間の振とう培養を行った。振とう終了後、ただちに、細菌数を前述の方法で測定した。細菌培養液は×12,000g、30分間の高速遠心を行い、上澄み液を0.25μmの滅菌フィルターでろ過して実験に供した。

**発症試験** 実験は18°Cの恒温条件で行った。実験に供試したノリ葉体は、実験に使用するまで-30°Cで冷凍保存していたものである。発症の判定は、培養ろ液に一定時間浸漬したのち、観察を行うとともに、淡水に10分間浸漬して原形質吐出の程度で表した。

### 2. 産生物質の性状

培養ろ液に含まれている産生物質が、どのような性状のものであるかを発症試験で同じ症状があらわれるかどうかを指標にして検討した。実験には1.の実験で作製した培養ろ液を、分画分量12,000, 5,000, 1,000のセルロースチューブでそれぞれ5時間、26.0%海水で透析したのちの内液、100°Cで10分間加熱したろ液、120°Cで15分間高圧蒸気滅菌したろ液、モルカット（Adovantec製、L. G. C, 分画分子量5,000）でゲルろ過し溶出してきたろ液および凍結乾燥したろ液を供した。発症試験は

Table 17. Genus suggested for the isolates

	Isolates							
	DY-1219 4Y	RS- 5LY	NS- 5Y	NS- 11Y	NS- 17Y	KS- 1W	KS- 4Y	KS- 25W
Suggested genus	F	F	F	F	F	V	F	V

F, *Flavobacterium* sp.; V, *Vibrio* sp..