

氏 名 (本籍)	ふく やま まさ ふみ (徳島県)
学 位 の 種 類	獣医学博士
学 位 記 番 号	乙第250号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	<b>Aeromonas</b> 属の分類学的研究 — 河川土壌・河川水および淡水魚由来運動性 <b>Aeromonas</b> 属の数値分類およびファージ型別について —
論文審査委員	(主査) 教授 尾 形 学 (副査) 教授 田 淵 清 教授 村 田 元 秀

## 論 文 内 容 の 要 旨

*Aeromonas* 属は *Vibrio* 属ときわめて類似した性状を示す細菌で河川、池、湖、沼地の水やその泥土などの自然界に広く分布している淡水性菌である。本菌属に含まれる *A. hydrophila* については、カエルの "red leg" の原因菌として最初に発見されて以来、淡水魚、ハ虫類や両生類に病原性があることで知られていた。なかでも養殖魚に出血性敗血症、鱗赤病や穴あき病などを発病させ養殖業に経済的に大きな被害をもたらしている。

一方、ヒトにおいても本菌は以前から弱病原性を示し、臨床材料（腹膜炎、髄膜炎、肺炎、中耳炎、敗血症など）からしばしば分離され、自発性感染症（日和見感染症）の原因菌として知られている。

ところが、最近、本菌属に含まれる *A. hydrophila* や *A. sobria* が下痢症患者糞便から分離される症例が次第に多く認められ、ヒトの下痢症の起因菌となることが示唆され、わが国では *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae* non-01, *Vibrio fluvialis* などとともに食中毒起因菌として新たに認識されるようになり注目されている。しかし、ヒトの下痢症に関与する *Aeromonas* 属の自然環境下における分布調査や分類学的研究は必ずしも明らかにされていないのが現状である。

そこで、著者は上述のことを踏まえ、本研究では、第一に自然環境下に存在する本菌の分布状況と汚染菌量の調査を行い、現在、本菌の分類に使用されている Popoff (1984) の方法に従って検討した。第二に分離菌株について Adanson らの方法に従って数値分類を応用して数値分類と Popoff らの分類について比較検討した。第三に河川水や土壌からファージの分離を試み分離菌株についてファージ型別を検討した。

### 1. *Aeromonas* 属の分離状況

1982年10月から84年7月の2年間に河川水、湖水の132件、河川土壌の514件および淡水魚の511件で計1157件の検査試料について Genus のレベルで分離状況を検討したところ、河川水や湖水では132件中全例(100.0%)から、河川土壌では514件中304件(59.1%)から、淡水魚では511件中462件(90.4%)から本菌が分離され、自然環境下や淡水魚の腸管や鰓には常在菌として多数分布していることが明らかとなった。

### 2. *Aeromonas* 属の推定菌量

河川水、湖水、河川土壌および淡水魚に分布する *Aeromonas* 属菌について汚染菌量を定量的に検討した

ところ、河川水や湖水では $1.0 \times 10^2 - 2.3 \times 10^4$ 個/1の菌量を示し、平均で $1.3 \times 10^3$ 個/1の菌量を、河川土壌では $1.0 \times 10^1 - 1.4 \times 10^8$ 個/gの菌量を示し、平均で $1.6 \times 10^6$ 個/gの菌量を、淡水魚では $1.0 \times 10^6 - 4.0 \times 10^7$ 個/gの菌量を示し、平均で $1.1 \times 10^6$ 個/gの菌量を示していた。

### 3. *Aeromonas* 属の分類および同定

#### 1) Popoff らによる分類学的検討

河川水や湖水由来120株、河川土壌由来176株および淡水魚由来1056株の計1352株について生物学的性状による分類を行ったところ、河川水や湖水由来の120株中17株(14.2%)が *A. hydrophila* に、33株(27.5%)が *A. sobria* に、35株(29.2%)が *A. caviae* に分類されたが、残り35株(29.2%)は *Aeromonas* spp. に分類された。河川土壌由来では176株中38株(21.6%)が *A. hydrophila* に、23株(13.1%)が *A. sobria* に、41株(23.3%)が *A. caviae* に分類されたが、残り74株(42.0%)は *Aeromonas* spp. に分類された。淡水魚由来では1056株中182株(17.2%)が *A. hydrophila* に、332株(31.4%)が *A. sobria* に、206株(19.5%)が *A. caviae* に分類されたが、残り336株(31.8%)は *Aeromonas* spp. に分類された。以上のごとく、河川水、湖水、河川土壌および淡水魚由来株は Popoff らの方法に準拠して分類した成績では *Aeromonas* spp. が高率に認められ、*Aeromonas* 属についての分類が未解決な点も多数残されていることが確認され、本菌分類については再整理する必要があることが考えられた。

#### 2) 数値分類学的検討

河川水、湖水、河川土壌および淡水魚からの分離菌株が Popoff らの分類で *Aeromonas* spp. に該当する菌株が多数認められた。そこで、Adanson らの方法に従って数値分類法を応用し、河川水由来72株、河川土壌由来82株および淡水魚由来441株の計595株を任意に選び73種類の各種生化学的性状試験成績を利用して検討した。

河川水、湖水及び河川土壌由来は75%の相似度を持ってI群からX群に、淡水魚由来は70%の相似度を持ってI群からIX群にそれぞれ群別された。

供試菌株595株中103株(17.3%)が *A. hydrophila* に、292株(49.1%)が *A. sobria* に、148株(24.8%)が *A. caviae* の各グループの中に該当していた。しかし、残り52株(8.7%)は上記3種のグループに該当しなかった。以上のごとく数値分類を行うことにより Popoff らの分類で *Aeromonas* spp. が42.2%と高率に認められたものが8.7%に減少したことからも理解できる様に現在の分類基準では、本菌の分類が困難であり、*Aeromonas* 属の分類には数値分類や菌体脂肪酸による分類あるいはDNAによる遺伝学的な分類を応用し、菌種レベル、亜種レベルあるいは生物型レベルで再整理を行う必要があろう。

#### 3) ファージの分離とファージ型別

河川水195件と土壌90件の計285件よりファージの分離を試み、105件(36.8%)から溶菌斑をみ出し、それぞれの溶菌斑よりファージの分離にわが国で最初に成功し、*A. hydrophila*、*A. sobria*、*A. caviae* に対しA1-A26型を、*Aeromonas* spp. に対しAM1-AM22のファージ型別を確立した。

48種のファージ型を用い河川水由来71株、河川土壌由来82株および淡水魚由来441株の計594株についてファージ型別を行ったところ、河川水由来11株(15.5%)、河川土壌由来29株(35.4%)および淡水魚由来89株(20.2%)が型別された。

*A. hydrophila*、*A. sobria*、および *A. caviae* に対する26種のファージを用い543株についてファ-

ジ型別（A型）を行ったところ、4型が最も多く7株、続いて12型が6株、18型が3株、1型および22型が2株、8型および13型が各1株が型別されたが、残り68株は混合型に該当した。

*Aeromonas* spp. に対する22種のファージを用い51株についてファージ型別（AM型）を行ったところ、7型に3株、続いて9型と16型に各2株、2型、3型、4型、8型、10型、12型、14型、15型、17型および22型に各1株が型別されたが、残り25株は混合型に該当した。

#### 4. 河川水、湖水、河川土壌および淡水魚における検体別の本菌分類状況

##### 1) Popoff らによる分類学的検討

河川水や湖水48件、河川土壌200件および淡水魚414件の計662件からの分離菌株について検体別に生物学的性状による分類を行ったところ、河川水や湖水由来では48件中15件（31.3%）が *A. hydrophila* に、各21件（43.8%）が *A. sobria* と *Aeromonas* spp. に、22件（45.8%）が *A. caviae* にそれぞれ認められた。河川土壌由来では200件中33件（16.5%）が *A. hydrophila* に、21件（10.5%）が *A. sobria* に、39件（19.5%）が *A. caviae* に、60件（30.0%）が *Aeromonas* spp. にそれぞれ認められた。淡水魚由来では414件中149件（36.0%）が *A. hydrophila* に、204件（49.3%）が *A. sobria* に、159件（38.4%）が *A. caviae* に、210件（50.7%）が *Aeromonas* spp. にそれぞれ認められた。

##### 2) 数値分類学的検討

河川水や湖水24件、河川土壌100件および淡水魚161件からの分離菌株について検体別に生物学的性状による分類を行ったところ、河川水、湖水由来では24件中3件（12.5%）が *A. hydrophila* に、各18件（75.0%）が *A. sobria* と *A. caviae* に、4件（16.7%）が *Aeromonas* spp. にそれぞれ認められた。河川土壌由来では100件中15件（15.0%）が *A. hydrophila* に、25件（25.0%）が *A. sobria* に、20件（20.0%）が *A. caviae* に、13件（13.0%）が *Aeromonas* spp. にそれぞれ認められた。淡水魚由来では161件中59件（36.6%）が *A. hydrophila* に、100件（62.1%）が *A. sobria* に、71件（44.4%）が *A. caviae* に、34件（21.1%）が *Aeromonas* spp. にそれぞれ認められた。

##### 3) ファージ型別状況

48種類のファージ型を用い河川水や湖水24件、河川土壌100件および淡水魚161件の計285件からの分離菌株について検体別に型別を行ったところ、河川水、湖水由来に9件（37.5%）が、河川土壌由来に30件（30.0%）が、淡水魚由来に78件（48.4%）が型別された。

上述の研究成績から河川土壌、河川水、湖水及び淡水魚から本菌が高率に分離され自然環境下や淡水魚に高頻度に分布する菌種であることが明らかになった。また、本菌の分類においてPopoff らの分類では *Aeromonas* spp. が42.2%と高率に認められたが著者が応用した数値分類を用いることにより *Aeromonas* spp. の多くは *A. sobria* や *A. caviae* に移行し、*Aeromonas* spp. は8.7%に減少が認められPopoff らの分類基準では分類が困難であることが示唆され数値分類を応用することにより本菌を再整理することが妥当であることが考えられる成績であった。ファージ型別についてはわが国で最初に分離することに成功し、本菌のファージ型別を確立し本菌の生態学的調査の解析に応用できることが示唆された。また、将来ヒト下痢症由来と自然界由来の溶菌パターンを比較することにより疫学調査にも応用できるものと思われる。

## 論文審査の結果の要旨

今日 *Aeromonas* 属と推定される菌が初めて記載されたのは 1890 年の初めであるが、それが一群の菌として認識され、分類学的に問題とされるようになったのは近年のことである。

本菌属はかつて、*Proteus* 属、*Pseudomonas* 属、あるいは *Vibrio* 属として記載され、あるいは腸内細菌、*Plesiomonas* とその性状が酷似しており混乱をまねいていた。本菌属は河川、池、湖などの水や泥土から分離され、水棲菌として自然界に広く分布していることが知られるようになった。

本菌属のうち、*A. hydrophila* は、カエルの“red leg”の原因菌として最初に発見され、その後、淡水魚、爬虫類や両棲類に病原性があることが知られ、なかでも養殖魚に出血性敗血症、鱗赤病や穴あき病などを発病させ、養殖業に大きな損害を与えている。一方、人においては、腹膜炎、髄膜炎、肺炎、中耳炎、敗血症などの病例からしばしば本菌が分離され、人への病原性が弱いながら起因菌として問題にされるようになった。

また最近、本菌属に含まれる *A. hydrophila* や *A. sobria* が下痢症の起因菌となることが次第に明らかとなり、厚生省は食品衛生上の取り扱いについて、食中毒の起因菌として、これら 2 菌種を、*Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae* non-01, *Vibrio fluvialis* などと共に指定した。

以上のごとく、本菌属の重要性が最近とくに注目されてきたが、わが国における本菌属の自然環境下における分布や分類学的研究はきわめて少なく不明の点が多い。そこで著者は上述のことを踏まえ、本研究では、第一に自然環境下に存在する本菌の分布状況と汚染菌量の調査を行い、分離菌について Popoff ら (1984) の方法による分類を行い検討した。第二に分離菌株について Adanson らの方法に従って数値分類を応用して分類し、これと Popoff らの分類による結果を比較検討した。第三に河川水や土壌からファージの分離を試み分離株についてファージ型別を検討した。その概要を述べれば次の通りである。

### 1. *Aeromonas* 属の分布状況および汚染菌量について

1982 年 10 月から 1984 年 7 月の 2 年間に神奈川県下の河川水、湖水の 132 件、河川土壌の 514 件および淡水魚の 511 件、総計数 1157 件の検査試料について Genus のレベルで分布状況を調査したところ、河川水や湖水では 132 件中全例 (100%) から、河川土壌では 514 件中 304 件 (59.1%) から、淡水魚では 511 件中 462 件 (90.4%) から本菌が分離され、自然環境下や淡水魚の腸管や鰓には常在菌として多数分布していることが明らかとなった。

これらの汚染菌量を定量的に検討したところ、河川水や湖水では  $1.0 \times 10^2 - 2.3 \times 10^4$  個/1 の菌量を示し、平均で  $1.3 \times 10^3$  個/1 の菌量を、河川土壌では  $1.0 \times 10^1 - 1.4 \times 10^8$  個/g の菌量を示し、平均で  $1.6 \times 10^6$  個/g の菌量を、淡水魚では  $1.0 \times 10^6 - 4.0 \times 10^7$  個/g の菌量を示し、平均で  $1.1 \times 10^6$  個/g の菌量を示していた。

### 2. *Aeromonas* 属の分類および同定

#### 1) Popoff らによる分類学的検討

河川水および湖水由来 120 株、河川土壌由来 176 株および淡水魚由来 1056 株の計 1352 株について、Popoff らの分類に従い、生物学的性状によって分類を行ったところ、河川水および湖水由来 120 株中 17 株 (14.2%) が *A. hydrophila* に、33 株 (27.5%) が *A. sobria* に、35 株 (29.2%) が *A. caviae* に同定されたが、残り 35 株 (29.2%) は *Aeromonas* spp. として既知の菌種のいずれにも同定されなかった。河川土壌由来株では 176 株中 38 株 (21.6%) が *A. hydrophila* に、23 株 (13.1%) が *A. sobria* に、41 株 (23.3%) が *A. caviae* に同定され、残り 74 株 (42.0%) は *Aeromonas* spp. として菌種の同定は不能であ

った。淡水魚由来では1056株中182株(17.2%)が *A. hydrophila* に、332株(31.4%)が *A. sobria* に、206株(19.5%)が *A. caviae* に同定されたが、残り336株(31.8%)は *Aeromonas* spp. として菌種の同定はできなかった。以上のごとく、河川水、湖水、河川土壌および淡水魚由来株は、Popoff らの方法に準拠して分類した成績では、菌種の同定が不能なものが高率に認められ、*Aeromonas* 属についての分類は再検討する必要性のあることが明らかにされた。

## 2) 数値分類学的検討

上述した各種由来の分離菌株が Popoff らの分類に準拠して行った成績では、菌種の同定が不能なものが多数認められたので、Adanson らの数値分類法を応用し検討した。検査株は、河川由来72株、河川土壌由来82株および淡水魚由来441株の計595株で、これらについて73種類の各種生化学的性状試験を行い検討した。

河川水、湖水および河川土壌由来株は75%の相似度をもってI群からX群に、淡水魚由来株は70%の相似度をもってI群からIX群にそれぞれ群別された。

供試株595株は103株(17.3%)が *A. hydrophila* に、292株(49.1%)が *A. sobria* に、148株(24.8%)が *A. caviae* の各グループに該当した。しかし、残り52株(8.7%)は上記3種のグループに該当しなかった。

以上の成績から明らかなように、Popoff らの分類では菌種同定不能なものが42.2%と高率に認められたものが、数値分類の方法によって、8.7%に減少したことから、現在の分類基準がさらに検討される必要性のあることを明らかにした。

## 3) ファージの分離とファージ型別

*Aeromonas* 属についてのファージの研究はきわめて少なく、特定の菌種について2,3の報告があるに過ぎない。著者は、河川水195件と土壌90件の計285件よりファージの分離を試み、わが国で初めてその分離に成功し、*A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* に対しA1-A26を、*Aeromonas* spp. に対しAM1-AM22のファージ型別を確立した。

48種のファージ型を用い河川水由来71株、河川土壌由来82株および淡水魚由来441株の計594株についてファージ型別を行ったところ、河川水由来11株(15.5%)、河川土壌由来29株(35.4%)および淡水魚由来89株(20.2%)が型別された。

さらに、*A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* および *Aeromonas* spp. に対し、分離された各種ファージによる型別が行われた。

上述の研究成績から河川土壌、河川水、湖水および淡水魚から本菌が高率に分離され、自然環境下や淡水魚に高頻度に分布し、その汚染菌量が明らかにされた。

また、本菌の分類学的研究においては、現在指標とされている Popoff らの分類においては、自然界より分離される *Aeromonas* 属の菌種の同定には不十分であり、未同定菌が約42%に及ぶことが知られた。著者が応用した数値分類によれば、これらの未同定菌は、8.7%と減少し、その有用性が明らかとなった。

*Aeromonas* 属のファージについては、著者はわが国で初めて分離に成功し、本菌のファージ型別を確立した。

以上のように，本研究は *Aeromonas* 属の分類学的研究に多くの新知見を加えたもので，細菌学上，公衆衛生学上高く評価される業績であり，獣医学博士の学位授与に値するものと認める。