

水槽内に見られたマツカサウオ *Monocentris japonicus* (HOULTUYN) の共生発光細菌による死物寄生発光

吉 葉 繁 雄*

Saprophytic Luminescence by the Symbiotic Luminous Bacteria of the
Japanese Knightfish, *Monocentris japonicus*, observed in an Aquarium

Shigeo YOSHIBA*

(With 1 Text-figure, 3 Table and 1 Plate)

マツカサウオを飼育中、その水槽内に飼育しておいた魚（イソカサゴ）が死後水底で発光する現象に遭遇したので、その発光細菌を分離した。さらに、後日エアープンプの故障により同水槽内の魚類が全滅した際、それらの消化管からも発光細菌を分離することが出来た。これらの各菌株を蛍光抗体法により検索したところ、すべてマツカサウオの発光器に由来した同魚の共生発光細菌と判定しえたので報告する。

なお、マツカサウオは矢崎教授¹⁾²⁾（1927, 現名誉教授）により魚類における共生発光が最初の実証された発光魚である。

I. 菌株分離までの経過

1968. 11. 23.: 藤田下田海中水族館で水揚げ中のマツカサウオ 2 尾入手（午後 6 時）、その夜酸素ポンペを携えて一泊。

1968. 11. 24.: 帰宅（午後 8 時）、水槽 2 個（A, B; とともに 60 cm×30 cm×36 cm）に分けて放入。それらに既に飼育中の魚類は次の通り。

[A] 水温 25°C（体長は死んだ時の計測）

ハクテンハタ *Epinephelus caeruleo-punctatus* (Bloch) 2 尾, 大 (16.5 cm) および小 (14.0 cm), 1967 年夏, 千葉県勝浦で採集 (Plate VI 1-A, B)。

ハナミノカサゴ *Pterois volitans* Linne 2 尾, 赤褐色個体 (17.5 cm) および黒褐色個体 (16.0 cm), 1968 年夏, 購入 (Plate VI 1-C, D)。

カワハギ *Stephanolepis cirrhifer* (Temminck et Schlegel) 1 尾 (10.3 cm), 1968 年夏, 神奈川県鎌倉で釣上げたもの (Plate VI 1-E)。

イソカサゴ *Scorpaenodes littoralis* (Tanaka) 1 尾 (6.5 cm), 1968 年夏, 千葉県勝浦で採集 (Plate VI 2)。

[B] 水温 20°C

オキナメジナ *Girella mezinga* Jordan et Starks 3 尾, 1967 年夏, 千葉県勝浦で採集。

メジナ *Girella punctata* Gray 3 尾, 1968 年夏, 千葉県勝浦で採集。

* 東京慈恵会医科大学衛生学教室 Department of Hygiene, Jikei University, School of Medicine, Tokyo, Japan.

コトヒキ (ヤカタイサキ) *Therapon jarbua* (Forskål) 20 尾, 1968 年秋, 鎌倉で採集。

1968. 11. 末: 夜, 水槽 A の水底 (水深約 25 cm) に青緑色に発光するものあり, 点燈すると前日まで生きていたイソカサゴの死体であった (Plate VI 2)。発光はその全体表にかなり強く認められたが, 鰓附近が最も強く, 魚体を竹製ピンセットで水中で持上げても光が流出することはなく, 空気中に出しても消光しなかった。そのまま容器に入れて冷蔵庫に保存, 翌日発光細菌の分離操作を行なった。その後も室温で 1 昼夜以上光り続けた。分離した菌株を「イソ」と名付け, 継代培養を行なった。

44. 1. 31.: 朝, 水槽 A の水濁濁, 魚類全滅 (Plate VI 1), 通気装置の故障に気付く。各死体を未使用海水で洗滌後, 冷海水に浸けて研究室に移送, 氷室 (4°C) に 2 時間保存後分離操作開始。その結果, マツカサウオ A の発光器 (Plate VI 3) および消化管, カワハギを除く全魚の消化管からは発光細菌を分離しえたが (7 株), カワハギの消化管からは得られなかった。一方, 水槽 B の生きているマツカサウオ B (Plate VI 4) の発光器内共生発光細菌をも分離した。

II. 共 試 菌 株

以上で分離した全菌株 (Plate VI 5) を一括して表示する (第 1 表)。

第 1 表 分離した菌株とその由来

記 号	菌 株 名	由 来				
		宿 主	生 死	部 位	水 槽	
1	左 右 腸	マツカサウオ A	死	左側の発光器	A	
2				右側の発光器		
3				消化管		
4	イ	死物寄生で発光しているイソカサゴ	体	左側の鰓	A	
5	ハ			ハクテンハタ { 大型 個体 { 小型 個体		消化管
6	タ					
7	ア			カ		消化管
8	ク	ロ	マツカサウオ B	生	左側の発光器	
9	L	マツカサウオ B				体
10	R					

これらの各菌株について, 蛍光抗体法による検索と生物学的性状の検査とを行なった。

蛍光抗体処理の際には対照として, 別種発光魚の共棲発光細菌 (1 C 株) および大腸菌 (梅沢株) を用い, 比較観察した。

発光細菌の培養には 3% 食塩 2% ペプトン 2% グリセリン寒天培地 (pH 7.4) を用い, 培養温度は 25°C とした。継代培養は毎月 1~2 回行ない, 高層に穿刺, 2~3 日培養してコロニーを充分発育させてから氷室 (4~5°C) に保存した。諸試験は斜面に 20~24 時間培養したものについて行なった。

III. 蛍光抗体法による検索

蛍光抗体法とは, 抗原性を有する物質に対する一種の特異蛍光染色法で, その原法は Coons (1942) により創始された。即ち, 蛍光色素で標識した抗体を, それに対応する抗原に, 免疫反応により特異的に結合させ, 蛍光顕微鏡で観察し, その抗原を蛍光によって検出する方法である。

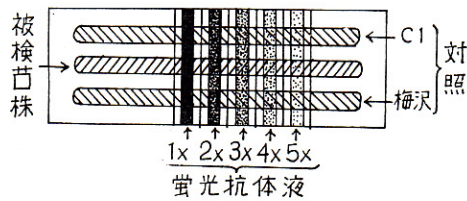
1. 蛍光抗体作成経過

免疫抗原としては「右」株生菌を用いた。白色カイウサギ(♀, 2050 g, 血清総蛋白 58 mg/ml)に, 20 時間培養の菌浮游液 (2 mg/ml; 生理的食塩水) を 0.25 ml, (6 日後) 0.5 ml, 以後 (5 日間隔) 1 ml 宛 2 回, 等量の incomplete adjuvant と混和して左右 (交互) 腎筋内に注射し, 毎回注射前の血清について, 生菌を凝集抗原として定量凝集反応を行なった。第 4 回目の注射終了 5 日後 (体重 2650 g) の血清 (総蛋白 61 mg/ml, 凝集価 1:1280~1:2560) 12.5 ml より硫酸塩析法により γ -globulin 13.2 mg を得, これに FITC (fluorescein isothiocyanate, B. B. L. 社) を 7°C で 4 時間作用させて conjugate させ, さらに Sephadex 次いで DEAE 各カラム通過により精製し, 蛍光抗体とした。

別に「右」株死菌体 (2 mg/ml 生理的食塩水浮游液, 100°C 2 時間, 鞭毛破壊, 菌体 polysaccharide 抗原とする) を用いて前と同様に蛍光抗体を作成, 用に備えた。

2. 蛍光抗体処理法 (直接法) および観察法

各菌株ごとにその生理的食塩水浮游液ならびに対照菌株浮游液を図のように線状に塗抹 (第 1 図), 室温で自然乾燥後, 火焰 (3 回通過) または ethanol (3 分間) または 10% formalin 水 (10 分間) で固定し, これに PBS (phosphate buffer saline, pH 7.4) で倍数稀釈 (1:1~1:16) した蛍光抗体液を菌塗抹線と直交するように画線して載せ, 湿室 (箱) に密封し, 4~5°C で 1 夜 (15~17 時間) 反応させた。これを, 同温度に保存しておいた PBS で 30 分間洗滌 (magnetic stirrer 使用), 水を軽く切ってから乾燥せぬうち緩衝グリセリンを滴下してカバーガラスで封じ, 直ちに蛍光顕微鏡で観察した。



第 1 図 蛍光抗体処理模図

使用した蛍光顕微鏡装置の構成は次の通りである。

顕微鏡: ニコン S 型; 接眼レンズ P8×, 対物レンズ 100× (絞り付き), コンデンサー Cardioid-Condenser (暗視野用)。

蛍光光源装置: オリパス HLS; 光源 超光圧水銀燈 AHL 250 (和光), 光源フィルター UVD 1 (イワキ), 接眼フィルター GG9 (Schott)。

第 2 表 蛍光抗体法成績

固定方法	抗体稀釈	ethanol 3 分間					10% formalin 10 分間				
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
被 検 菌 株	左	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	+
	右	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅
	腸	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+
	イソ	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	+
	ハタ大	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	+	+
	ハタ小	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	+
	アカ	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	+
	ク口	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	+
株	L	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	+
	R	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	+
対 照	1 C	--~+	--~±	--~±	-	-	--~+	--~±	-	-	-
	梅 沢	--~+	-	-	-	-	--~+	-	-	-	-

卅, 卅, +, 菌の存在が判る程度のもを ±, 螢光の全く認められぬものを - とした。

観察の結果, 対照の菌は -~± (時に +) であったが, 被検菌株は全て +~卅 であった。ethanol 固定および 10% formalin 固定の例を表示するが (第 2 表), 熱固定のものはこれらと同等か寧ろ更に良好な結果が得られた (Plate VI 6)。

従って, 全ての被検菌株は「右」株と同一の抗原構造を有すると判定される。すなわち, これらの発光細菌は免疫学的には同じ菌株と見做され, イソカサゴの死物寄生菌および他魚の消化管内発光細菌はマツカサウオ A の発光器に由来する共生発光細菌にほかならず, また A 発光器内共生発光細菌は B 発光器内共生発光細菌と同種のもであると判断しうる。しかし, マツカサウオの共生発光の発見当時の菌株と, その性状を比較するため, 通常の生物学的検索を追加実施した。

IV. 生物学的性状の検索

試験成績を矢崎²⁾ (1928) および馬島³⁾ (1931) によるものと対比して表示する (第 3 表)。

V. 考 察

従来, 発光細菌の免疫血清を用いて凝集反応による菌種の分類ならびに同定の試みが諸家によりなされているが, ほとんど成功を見ないようである。馬島³⁾ (1931) によれば, 病原性発光細菌 (ヌカエビの光り病⁴⁾ の病原菌) のみは凝集反応で完全に区別出来たが, 死物寄生菌 (15 株) および共生発光細菌 (マツカサウオ 18, ダンゴイカ 4, ケンサキイカ 7, ミミイカ 7 株) では菌株特異性は甚だ強かったが, 種特異性が微弱なために菌種の鑑別はほとんど不可能であった。

以上を考慮に入れば, 前述の発光細菌 10 株の螢光抗体法による検索ならびに糖および多価アルコール分解性を主とした生物学的検索からは, 全菌株とも同一種であることは勿論, 同一菌株と見做すことが出来よう。すなわち, マツカサウオ A を飼育中の水槽内のイソカサゴに死物寄生発光を起こさせた発光細菌 (イソ株) ならびにマツカサウオ A, 2 尾のハクテンハタおよび 2 尾のハナミノカサゴの消化管内に生存していた発光細菌 (腸, ハタ大, ハタ小, アカおよびクロの各株) は何れもマツカサウオ A の発光器に由来した発光細菌と考えられ, さらに, 2 個体のマツカサウオは同一株と見做される共生発光細菌を宿していたことになる。

なお, 著者のマツカサウオ菌株 (下田産) には, 矢崎²⁾ (1928) および馬島³⁾ (1931) によるもの (江の島および富山産) と解糖性の一部に差が認められたが, このことは大抵の共生発光細菌が元来海水由来のものとの考えからすれば余り重大な差と考える必要はなく, 矢崎名譽教授⁵⁾ によれば, マツカサウオの共生発光発見当時, その共生発光細菌の糖および多価アルコール分解性には産地により多少の差異が見られたという。

発光細菌の分布はかなり広く, 共生発光動物 (魚類, 頭足類) の発光器内に常在し, 通常の海水中に浮游生活するほか, 保存中の食品 (主として海産魚介類にみられる死物寄生発光), 海棲動物 (魚類⁶⁾⁷⁾, 甲殻類⁸⁾, 頭足類⁹⁾, 腹足類¹⁰⁾, 棘皮動物¹¹⁾) の消化管, 光り病⁴⁾ (病原性発光細菌感染症) による非発光動物の病的発光) 罹患動物等に生存することが知られている。

それらのうち, 死物寄生による発光は通常, 食品として空气中に保存中の魚肉, イカ・タコ, 魚介製品, 魚汁の浸み込んだ魚店頭の木箱, 稀に牛肉等の獣肉などが, 雑菌として海水中に存在する発光細菌の増殖により, 暗所で蒼綠色に発光する現象として認められることが多く, 水中で見られることは稀のようである。著者は 1966 年以來, 室内水槽に種々の海水魚を天然海水で飼育しているが, マツカサウオを飼育する以前は, それらが死んでも発光することはなかった。水温以外の種々の人為条件 (1~3 月ごとの海水交換, pH, CuSO₄, 抗生物質の投入等) が海水中の雑菌性発光

細菌の生存および増殖に不適当だったためとも考えられる。

ところが本報例では、発光細菌を常在させて游泳するマツカサウオの発光器からは絶えずそれらの共生発光細菌が水槽内の水中に游出し、それらがイソカサゴの死後その死体に急速に増殖して発光し、また他の魚類に嚥下されて消化管内に生存していたものと考えられる。イソカサゴはマツカサウオ放入数日後に死んだが、生前の光り病的発光は認められなかった。マツカサウオの共生発光細菌がイソカサゴの死に関与したかどうかは不明であるが、少なくとも他魚に対する病原性は否定されよう。

VI. 結 語

マツカサウオと一緒に飼育しておいたイソカサゴが死後、水槽の水底で発光していたので、その死体から発光細菌を分離した。その後、その水槽の通気装置の故障のため水槽内の魚類が全滅した際、マツカサウオの発光器および各魚の消化管からも発光細菌を分離することが出来た。以上の各菌株および別の生きているマツカサウオの発光器から分離した発光細菌について、蛍光抗体法を主とした検索を試みたところ、全て同一菌株と見做すことが出来た。またこれらの菌は、矢崎教授(1927)により魚類における共生発光の最初の例として、マツカサウオの共生発光が実証された当時の同魚の共生発光細菌と、ほとんど共通の生物学的性状を示した。

本報例のイソカサゴの死体の発光は、特定の共生発光魚の共生発光細菌が、水槽内の水中で死物寄生発光を発現させたことが明らかで、特異例であると考えられる。

最後に、種々御教示を賜った矢崎芳夫名誉教授、横須賀市博物館長羽根田弥太博士、御校閲を賜った小机弘之教授、ならびに材料を分与下さったフジタ下田海中水族館前田尚氏に深謝する。

Summary

A case of saprophytic luminescence was observed in a dead scorpionfish, *Scorpaenodes littoralis* (TANAKA) (Plate VI 2), lying on the bottom of an aquarium in which a Japanese Knightfish, *Monocentris japonicus* (HOUTTUYN), was kept together with several non-luminous fishes (Plate VI 1-A~E). A strain (Plate VI 5-1) of luminous bacteria was isolated from the luminescent corpse. The corpse continued to luminesce in the air for more than 24 hours after that.

About 2 months later, when all the fishes in an aquarium died because of aeration trouble, isolation of the luminous bacteria from them was attempted. Nine strains (Plate VI 5-2~10) were isolated from the luminous organs and the digestive canals of the knightfish, the digestive canals of the other fishes, and the luminous organs of a knightfish living in another aquarium.

After investigations of these 10 strains by the fluorescent antibody technique using FITC (fluorescein isothiocyanate) (Plate VI 6) and by the usual biological tests, it was found that the luminescence of the dead scorpionfish originated in the symbiotic luminous bacteria of the knightfish, and that the strains from the digestive canals were just the luminous bacteria which entered the water from the luminous organs and were swallowed into the digestive canals and survived there.

It is considered that the luminescence of the dead scorpionfish was an unique case

of saprophytic luminescence because it occurred in water and was caused by the symbiotic luminous bacteria from a particular luminous fish.

文 献

1. 矢崎芳夫, 1927: マツカサウオの発光について; 理学界 25 (8).
2. YASAKI, Y., 1928: On the nature of the luminescence of the knight-fish (*Monocentris japonicus* (Houttuyn); Jour. Exp. Zoology 50 (3) 495~505.
3. 馬島律司, 1931: 発光性細菌ノ研究(第三報告) 諸種発光菌ノ含水炭素多価酒精分解作用ト免疫凝集反応トニ就テ; 成医会雑誌 50 (4) 40~67.
4. 矢崎芳夫, 1925: 所謂信州諏訪湖産発光蝦ニ就テ(第一回報告) 発光蝦の発光本態ニ関スル研究; 成医会雑誌 45 (2) 1~19.
5. 矢崎芳夫, 1969: 私信.
6. 小机弘之, 1952: 海魚の消化管内発光細菌に関する知見補遺; 成医会雑誌 67 (3) 18~21.
7. 小机弘之, 1952: 共棲発光魚の消化管内発光細菌に就テ; 成医会雑誌 67 (3) 22~25.
8. 小田原利光, 1953: ガザミ *Portunus trituberculatus* MIERS の消化管内発光細菌に就テ; 慈医誌 68 (3) 183~186.
9. 柴田誠爾, 1953: ヤリイカ *Loligo bleekeri* Keferstein の消化管内から分離した発光細菌に就テ; 慈医誌 68 (3) 216~217.
10. 吉葉繁雄, 1958: 数種の海産腹足類の消化管より分離した発光細菌について; VENUS 20 (2) 229~235.
11. 吉葉繁雄, 1964: 浅虫の海産動物の消化管内発光細菌(未発表).

図版 VI の説明 Explanation of the Plate VI

1. A 水槽内飼育魚類. Fishes cultivated in the aquarium "A".
 A, B: ハクテンハタ「大」(A) および「小」(B). Grouper, *Epinephelus caeruleo-punctatus* (BLOCH), "large" (A) and "small" (B).
 C, D: ハナミノカサゴ「アカ」(C) および「クロ」(D). Zebrafish or Lionfish, *Pterois volitans* LINNE, "red" (C) and "black" (D).
 E: カワハギ. Common Filefish, *Stephanolepis cirrhifer* (TEMMINCK et SCHLEGEL).
 F: マツカサウオ「A」. Knightfish or Pine-cone Fish, *Monocentris japonicus* (HOUTTUYN), "A".
 From the alimentary canals of these fishes (except E) were the luminous bacteria isolated purely.
2. 死物寄生発光を呈していたイソカサゴの死体. Dead Scorpionfish, *Scorpaenodes littoralis* (TANAKA), which come to present the saprophytic luminescence.
3. マツカサウオ「A」の腹面; l, r はそれぞれ左側および右側の発光器. Ventral view of the knightfish "A" showing the left (l) and the right (r) luminous organs.
4. マツカサウオ「B」の発光; p は左側の発光器. The knightfish "B" showing the symbiotic luminescence of the left luminous organ (p).
5. 培養 24 時間の各菌株とその発光(数字は第 1 表の記号と共通). All the strains of the luminous bacteria examined (top), and their luminescence in the dark (bottom).
 Left to right: Isolated from—the left (1) and the right (2) luminous organs and the intestine (3) of the knightfish "A", the luminescent corpse of the scorpionfish (4), the alimentary canals of the "large" (5) and the "small" (6) of the groupers, the "red" (7) and the "black" (8) of the zebrafishes, and the left (9) and the right (10) luminous organs of the knightfish "B".
6. 各株発光細菌の蛍光抗体処理による蛍光像(数字は第 1 表の記号に同じ). Fluorescence photomicrograph of the luminous bacteria treated with the fluorescence antibody technique. The numerals indicate the each strains same as the above.

