

# クロダイ稚魚から分離された *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*

中西雅幸, 釜石 隆, 桐生郁也, 傍島直樹

*Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from juvenile black seabream *Acanthopagrus schlegeli*

Masayuki Nakanishi, Takashi Kamaishi\*, Ikunari Kiryu\*, and Naoki Sobajima

In August 2007, an infectious disease was observed in cultured juvenile black seabream *Acanthopagrus schlegeli* in Kunda bay. The maximum mortality per day was 1.3% of the stock. The average size of diseased fish was 73 mm in fork length and 6.3 g in body weight. All moribund fish examined showed severe anemia, especially pale gill, as the main clinical sign. Bacteria were isolated from the kidneys of moribund fish. Isolates were identified as *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* based on physiological and biochemical tests, including API20E, the oligonucleotide DNA array, and multiplex PCR assay for the investigation of partial genes of 16S rRNA and *ureC*.

キーワード：クロダイ, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*

2007年8月, 京都府宮津市にある京都府栽培漁業センターが栗田湾内で中間育成していたクロダイ *Acanthopagrus schlegeli* 稚魚に, 日間死亡率が1.3%に達する死亡が見られた。衰弱魚の細菌学的検査を行ったところ, 1種の細菌が分離され, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* と同定された。魚類の類結節症の原因菌である *P. damsela* subsp. *piscicida* は性状や病原性等も良く知られており (室賀, 2004), クロダイに対する病原性も報告されている (Muroga *et al.*, 1977)。しかしクロダイ稚魚の *P. damsela* subsp. *damsela* 感染症はこれまで報告がない。本報では, 本疾病の発生状況及び分離菌の性状等について報告する。

## 材料及び方法

衰弱魚の病理検査 2007年8月21日に, クロダイ衰弱魚5尾 (平均尾又長 (FL) 73 mm, 平均体重 (BW) 6.3 g) の病理検査をするとともに, うち2尾の腎臓から常法により1% NaCl加BHI寒天平板培地 (Difco) を用いて細菌の分離を行った。

供試菌 細菌の性状検査に用いた菌株を Table 1 に示した。API20Eによる簡易同定及び薬剤感受性試験には前述の2尾から分離されたAsK-0701株とAsK-0702株を, 生化学的性状検査及びMultiplex PCRにはこの2株の他に対照菌株として *P. damsela* subsp. *piscicida* (OT-51443株) を用いた。併せて, *P. damsela* が以前

Table 1 List of the bacterial isolates studied

Isolate	Date of isolation	Host	Age of host	Fork length	Body weight	Organ
Ask-0701	Aug.21.2007	Black seabream ( <i>Acanthopagrus schlegeli</i> )	0	69 mm	4.5 g	Kidney
Ask-0702	〃	〃	〃	75 mm	7.2 g	〃
OT-51443	Jun.23.1995	Yellowtail ( <i>Seriola quinqueradiata</i> )	〃	-	32 g	-
PK-9705	Jun.5.1997	Japanese flounder ( <i>Paralichthys olivaceus</i> )	〃	38 mm*1	0.5 g	Kidney

\*1, Total length.

\*独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所 (National Research Institute of Aquaculture, Minami-ise, Mie 516-0193 Japan)

*Vibrio damsela* とされていたことから、代表的なピブリオ病原菌である *Vibrio (Listonella) anguillarum* (PK-9705株) も性状検査の対照株とした。なお、PK-9705株は、グラム陰性、運動性のある短桿菌で、オキシダーゼ<sup>+</sup>、カタラーゼ<sup>+</sup>、グルコースを発酵的に分解し、ピブリオ病診断用抗血清 (坑*V.anguillarum* A type) によるスライド凝集反応で陽性反応を示したことから、*V. (Listonella) anguillarum* A type と同定されている。

**病理組織検査** 病理検査の供試魚とは別の衰弱魚4尾 (FL 65~82 mm, BW 4.3~8.7 g) の内臓を同年8月21日及び8月23日にダビッドソン固定液で固定した。その後、常法によりパラフィン包埋して3 µm厚の切片に切り出し、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色及びMay-Grunwald染色を施して、肝臓・脾臓、脾臓及び腎臓の各組織を鏡検した。

**DNAチップを用いた病原体の検出** 8月21日に病理検査及び病理組織検査の供試魚とは別の衰弱魚3尾 (FL 68~77 mm, BW 5.0~8.2 g) から脾臓を摘出し、-20 で凍結した。この脾臓から常法により抽出した核酸と3種類のDNAチップ、すなわち真正細菌類を広く探ることができる16Sチップ<sup>\*1</sup>、ピブリオ類の種を推定するためのピブリオチップ (Matsuyama *et al.*, 2006) 及び魚病ウイルス類15種類を検出可能なウイルスチップ<sup>\*2</sup> とを反応させて病原体の検出を試みた。

**API20Eによる分離菌の簡易同定** API20E (V4.1) (Biomerieux) を用いてAsK-0701株とAsK-0702株の簡易同定を行った。

**供試菌の生化学的性状検査** 坂崎ら (1988) の方法及び常法により、供試菌4株のグラム染色性、運動性、オキシダーゼ、カタラーゼ、ウレアーゼ、炭水化物利用能等、全55項目の生化学的性状を検査した。性状検査に際し、供試菌を1% NaCl加BHI寒天平板培地で25 1日間 (OT-51443株は2日間) 前培養した。性状検査の培養温度は25 とし、試験培地の塩分はO/129感受性の項目を除いて1% に調整した。

**好塩性・塩分耐性試験** では、NaClを0, 0.5, 1.0, 1.5, 3.0及び7.0% 添加した1% トリプティックケースペプトン (BBL) 水に供試菌を接種し、培養5日後の発育状況を実体顕微鏡下で観察した。

**薬剤感受性試験** 細菌感受性試験用ディスク (昭和、栄研、武田) 及び感性ディスク培地 (日水) を用いてAsK-0701株とAsK-0702株の薬剤感受性試験を行った。供した薬剤は、OA, CP, NB, FOM, CL, SiX, NA, ST, NFT, OTC, ABPC, FFであった。

**Multiplex PCR** *P. damsela* subsp. *piscicida* と subsp.

**Table 2** Oligonucleotide sequences of primers used for multiplex PCR (Osorio *et al.* (1999) and Osorio *et al.* (2000))

Primer	Nucleotide sequence (5' - 3')
F Car1	GCT TGA AGA GAT TCG AGT
R Car2	CAC CTC GCG GTC TTG CTG
F Ure-5'	TCC GGA ATA GGT AAA GCG GG
R Ure-3'	CTT GAA TAT CCA TCT CAT CTG C

*damselae* を識別するため、Osorio *et al.* (2000) に準じ、Car1 と Car2 (増幅産物長 267 bp) 及び Ure-5' と Ure-3' (同 448 bp) の2組のプライマーを用いてMultiplex PCRを行った。Car1と Car2 は subsp. *piscicida* と subsp. *damselae* の相同な16S rRNAに特異的なプライマーであり (Osorio *et al.*, 1999)、また、Ure-5' と Ure-3' は subsp. *damselae* のウレアーゼ遺伝子 (*ureC*) に特異的なプライマーである。これらプライマーの塩基配列を Table 2 に、Multiplex PCR反応液の組成を Table 3 にそれぞれ示した。

供試菌からのDNA抽出、増幅及び確認は以下のとおり行った。細菌の性状検査と同様に前培養した供試菌4株のコロニーをTris-EDTA buffer (pH 8.0) 100 µLにそれぞれ懸濁し、ドライバスで99 , 10分間加熱した後、14,000 rpm, 3分間遠沈して上澄をDNAテンプレートとした。PCR反応のポリメラーゼにはPrimeSTAR Max (Takara) を使用し、変性98 ・10秒、アニーリング55 ・10秒、伸長72 ・10秒を35サイクル行うこと

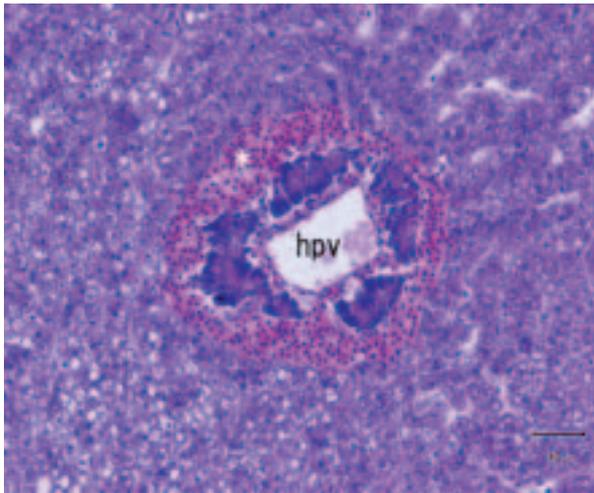
**Table 3** Components of the multiplex PCR mixture

PrimeSTAR Max (Takara)*1	2 ×	10.0 µL
Primer F Car1	100 pmol/µL	0.1
R Car2	100 pmol/µL	0.1
F Ure-5'	100 pmol/µL	0.1
R Ure-3'	100 pmol/µL	0.1
Deionized, distilled water		8.6
DNA template		1.0
Total		20.0 µL

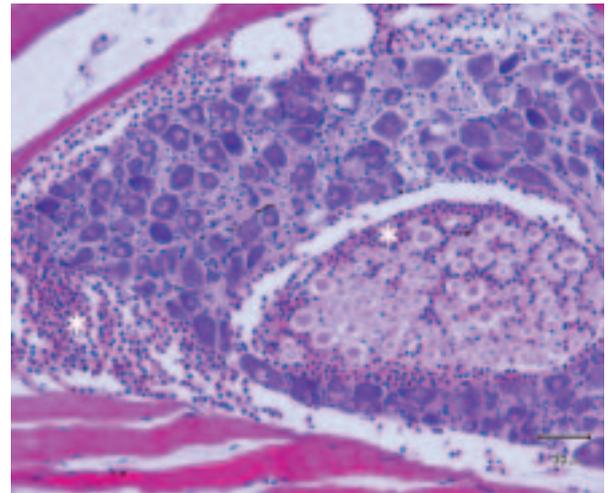
\*1, Including polymerase, buffer, and d-NTPs.

<sup>\*1</sup> 釜石 隆, 松山知正, 高見生雄, 大迫典久. 2004. マイクロアレイシステムを用いた魚病細菌の検出. 平成16年度日本魚病学会大会講演要旨集, p. 49

<sup>\*2</sup> 釜石 隆, 伊東尚史, 栗田 潤, 松山知正, 大迫典久, 佐野元彦. 2007. DNAチップを用いた魚病ウイルスの検出. 平成19年度日本魚病学会大会講演要旨集, p. 34



**Fig. 1** Light micrograph of the hepatopancreas of an affected black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. Note hemorrhage (\*) at the margin of the pancreas. hpv, hepatic portal vein. H-E stain.



**Fig. 2** Light micrograph showing hemorrhage (\*) in the spinal ganglion of an affected black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. H-E stain.

により供試菌のDNA断片を増幅した。増幅産物をアガロースゲル電気泳動，エチジウムブロマイド染色により確認した。

### 結 果

**衰弱魚の病理検査** 死亡の発生したクロダイは大阪府で種苗生産され，2007年6月22日に京都府栽培漁業センターへ移入後，同年7月12日に栗田湾内の網生簀へ沖出しされた。飼育尾数は4万尾で，8月20日に初めて100尾の死亡が認められ，8月21日には飼育魚の1.3%に相当する500尾が死亡した。8月23日からアンピシリン (ABPC) が投薬されると死亡魚は減少し，8月28日には死亡が2尾となって終息した。累積死亡率は2.8%で，この間の海水温は28.4～29.8 °Cであった。

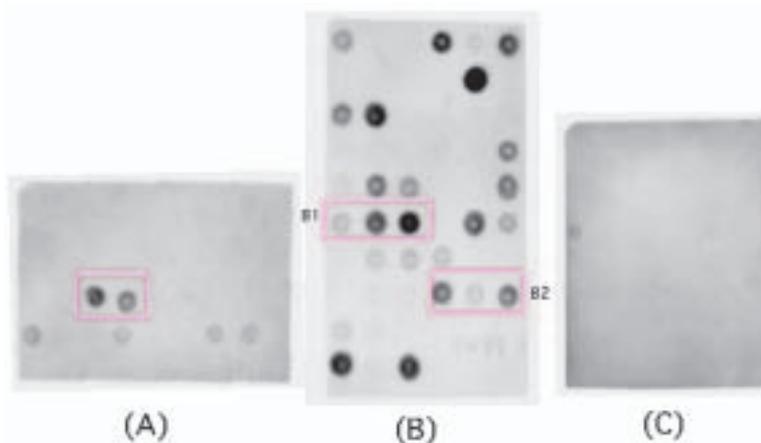
8月21日に衰弱魚5尾の病理検査を行ったところ，共通する特徴的な症状は極度の貧血であった。鰓はほぼ

白色化しており，心臓，肝臓及び脾臓が退色していた。一部の魚では腎臓の退色と脾臓の肥大が認められた。なお，体表，鰓等に寄生虫は認められなかった。

細菌分離を試みた2尾 (FL 69 mm, BW 4.5 g及びFL 75 mm, BW 7.2 g) の腎臓から同一と考えられる細菌が純培養状に分離された。前者からの分離菌をAsK-0701株，後者をAsK-0702株とした (以下分離菌株という)。

**病理組織検査** 衰弱魚4尾の肝臓・脾臓，脾臓及び腎臓の各組織切片を観察したところ，脾臓の周辺に出血の見られるものが1個体 (Fig.1) と神経節の周辺に出血の見られるものが1個体 (Fig.2) 認められたが，出血の原因は不明であった。

**DNAチップを用いた病原体の検出** 脾臓から抽出した核酸と16Sチップの反応では *P. damsela* のスポットが陽性となったので，類結節症原因菌もしくはその近



**Fig. 3** Spots of *Photobacterium damsela* were positive in the 16S rRNA-based microarray (A). *Vibrio harveyi* (B1) and *P. damsela* (B2) were detected in the DNA tip for the discrimination of fish pathogens *Vibrio* and *Photobacterium* species (B). No signal was obtained from the array for fish pathogenic virus (C).

**Table 4** Biochemical characteristics of isolates from diseased black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) and reference strains

Characteristics	Isolates		References	
	AsK-0701	AsK-0702	OT-51443*1	PK-9705*2
Gram stain	-	-	-	-
Cell form	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod
Motility	+	+	-	+
Cytochrome oxidase	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-
MR test	+	+	+	-
VP test	-	-	-	+
2,3-Butanediol production	-	+	+w	+
Indole production	-	-	-	+
Nitrate reduction	+	+	-	+
Urease	+	+	-	-
Malonate utilization	+	+	+	-
Gelatin liquefaction	-	-	-	+
Casein digestion	-	-	-	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+
Esculin hydrolysis	-	-	-	+
Tween 80	+	+	+	-
ONPG	-	-	-	+
Phenylalanine deaminase	-	-	-	-
O/129 sensitivity	+	+	-	+
Arginine dihydrolase	+	+	-	+
Lysine decarboxylase	+	+	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-
Citrate utilization	-	-	-	-
Hugh & Leifson test	F	F	F	F
DNase	+	+	-	+
Growth on TCBS	Gr	Gr	-	Y
Chitin hydrolysis	-	-	-	-
Lecithinase	-	-	-	+
Growth in 0% NaCl	-	-	-	-
0.5%	+	+	-	+
1.0%	+	+	+	+
1.5%	+	+	+	+
3.0%	+	+	+	+
7.0%	-	-	-	-

+, positive; +w, weakly positive; -, negative; F, fermentative; Gr, green; Y, yellow.

\*1, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

\*2, *Vibrio (Listonella) anguillarum*.

縁種の関与が疑われた (Fig.3A)。より詳しい情報が得られるピブリオチップでは *Vibrio harveyi* と *P. damsela* のスポットが陽性となった (Fig.3B)。

ウイルスチップではラド系ウイルスのスポットがわずかにクロス反応しているようであったが、既知の魚病ウイルスは検出できなかった (Fig.3C)。

API20Eによる分離菌の簡易同定 分離菌株に対する API20Eによる簡易同定を行ったところ、AsK-0701株及びAsK-0702株の profile number は 6014004 で一致し、*P. damsela* と判定された (同定確率 99.9%ID, Tインデックス 1.0)。

供試菌の生化学的性状検査 供試菌4株の性状検査の結果を Table 4 及び Table 5 に示した。分離菌株は共にグラム陰性、運動性+の短桿菌で、オキシダーゼ+, カタラーゼ+, VP-, インドール-, 硝酸塩還元+, ウレアーゼ+, O/129感受性+, アルギニン分解+, リジン脱炭酸+, DNase+, TCBS培地での発育+, キチン加

水分解-, レシチナーゼ-, 0.5~3.0% NaClでの発育+, ズルシトールからの酸産生-を示し、2,3ブタンジオール産生を除き、他の全ての性状が一致した。

類結節症原因菌である *P. damsela* subsp. *piscicida* (OT-51443株) は、運動性-, 硝酸塩還元-, ウレアーゼ-, O/129感受性-, アルギニン分解-, リジン脱炭酸-, DNase-, TCBS培地及び0.5% NaClでの発育-であった。

一方、*V. (Listonella) anguillarum* (PK-9705株) は、VP+, インドール+, ウレアーゼ-, ゼラチン加水分解+, リジン脱炭酸-, レシチナーゼ+であった。

薬剤感受性試験 分離菌株はOA, CP, NB, FOM, CL, NA, ST, NFT, OTC, ABPC, FFに対して感受性を示し、SiXには耐性であった。

Multiplex PCR Multiplex PCRで得られた増幅産物の電気泳動結果を Fig.4 に示した。分離菌株は、共に 267 bp 付近と 448 bp 付近に明瞭なバンドが認められ、*P. damsela* subsp. *damsela* と判定された。*P. damsela*

**Table 5** Carbohydrate utilization of present isolates and reference strains

Characteristics	Isolates		References	
	AsK-0701	AsK-0702	OT-51443*1	PK-9705*2
Acid from:				
Glucose	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+
Maltose	+	+	-	+
Sucrose	-	-	-	+
Dextrin	+	+	-	+
Glycerin	w+	w+	-	+
Arabinose	-	-	-	+
Rhamnose	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-
Threhalose	+	w+	-	+
Lactose	-	-	-	-
Cellobiose	w+	+	-	+
Melibiose	-	-	-	-
Starch	+	+	-	+
Raffinose	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	+
Adonitol	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	+
Ribose	+	+	+	+

+, positive; +w, weakly positive; -, negative.  
 \*1, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.  
 \*2, *Vibrio (Listonella) anguillarum*.

subsp. *piscicida* (OT-51443株) では Osorio *et al.* (2000) の報告と同様に 267 bp 付近のバンドのみが検出され、448 bp 付近のバンドは出現しなかった。

また、*V. (Listonella) anguillarum* (PK-9705株) では両方のバンドとも出現しなかった。

### 考 察

クロダイ衰弱魚5尾全てで極度の貧血症状が認められたこと、細菌分離を試みた2尾の腎臓から同一と考えられるグラム陰性、運動性のある短桿菌が分離されたこと、分離菌株は簡易同定で *P. damsela* と判定されたこと、及び分離菌株が感受性を示したアンピシリンの投薬で死亡が治まったことから、今回の死亡事例は細菌感染症と判断された。

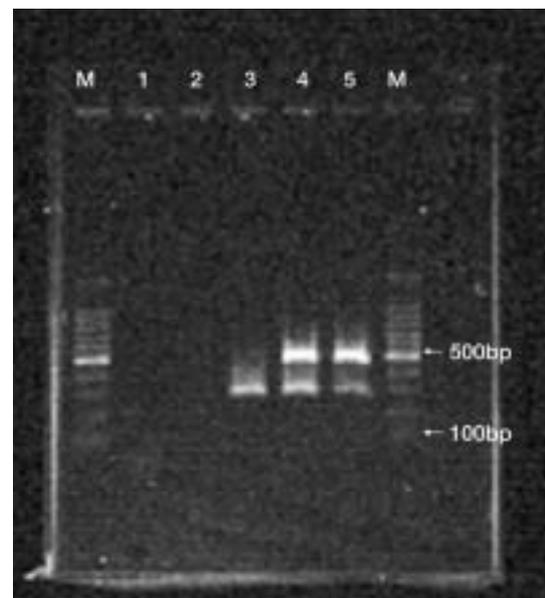
分離菌株が簡易同定された *P. damsela* は以前 *Vibrio damsela* とされており、ブリ *Seriola quinqueradiata* 稚魚 (Sakata *et al.*, 1989) 及び turbot *Scophthalmus maximus* (Fouz *et al.*, 1992) からの分離例がある。そこで、分離菌株の性状を Sakata *et al.* (1989) の報告と比較したところ、VP、リジン脱炭酸、キチン加水分解、レシチナーゼ並びにズルシトール及びトレハロースからの酸産生で一致しなかった (Table 6, 7)。また、Fouz

*et al.* (1992) の報告と比較するとVP、リジン脱炭酸、キチン加水分解で一致しなかったが、他の主要な性状検査結果やDNAチップとの反応から、分離菌株は *P. damsela* (= *V. damsela*) と推定された。

なお、ピブリオチップとの反応で検出された *V. harveyi* については、この菌が衰弱魚の腎臓からは分離されなかったことから、環境水に由来するものと判断された。

*P. damsela* には subsp. *piscicida* と subsp. *damsela* が知られており、前者は魚類の類結節症原因菌であり、クロダイに対しても病原性を示すことが報告されている (Muroga *et al.*, 1977)。このことから、クロダイ稚魚の死亡原因は当初、類結節症と考えられたが、分離菌株は、特に重要な性状項目と考えられる運動性+、硝酸塩還元+、アルギニン分解+、O/129感受性+で異なっており、*P. damsela* subsp. *piscicida* ではないと判断された。

*P. damsela* subsp. *piscicida* と subsp. *damsela* を明確に識別する方法として、Osorio *et al.* (2000) は Multiplex PCRが有効であると報告している。Osorio *et al.* (2000)は、Car1 と Car2 及び Ure-5' と Ure-3' の2組のプライマーを用いて Multiplex PCRを行い、*P. damsela* subsp. *piscicida* 25株と subsp. *damsela* 16株から得られた各々の増幅産物の泳動結果を比較して、前者では 267 bp のバンドのみが検出され、後者では 267 bp と 448 bp に明瞭なバンドが認められることを示した。そして、供試株の性状検査では subsp. *piscicida* 25株は



**Fig. 4** Profile of the multiplex PCR-amplified DNA fragments obtained from four strains studied. Lanes: M, DNA marker (Takara 100 bp DNA marker); 1, negative control; 2, *V. (Listonella) anguillarum* (PK-9705); 3, *P. damsela* subsp. *piscicida* (OT-51443); 4 and 5, AsK-0701 and AsK-0702 isolated from diseased black seabream, respectively.

**Table 6** Comparison of biochemical characteristics between present isolates and *Vibrio damsela* (Sakata *et al.* (1989) and Fouz *et al.* (1992))

Characteristics	Present isolates		<i>Vibrio damsela</i>	
	AsK-0701/Ask-0702		Sakata <i>et al.</i> (1989)	Fouz <i>et al.</i> (1992)
Gram stain	-		-	-
Cell form	Short rod		Short rod	Rod
Motility	+		+	+
Hugh & Leifson test	F		F	F
Cytochrome oxidase	+		+	+
Catalase	+		+	+
O/129 sensitivity	+		+	+
Nitrate reduction	+		+	
Urease	+			+
Gelatinase	-			-
Indole production	-		-	-
VP test	-		+	+
MR test	+		+	+
H <sub>2</sub> S production	-		-	
Arginine dihydrolase	+		+	+
Lysine decarboxylase	+		-	-
Ornithine decarboxylase	-		-	-
Citrate utilization	-		-	
Starch hydrolysis	+		+	
Casein hydrolysis	-		-	-
Chitin hydrolysis	-		+	+
Lecithinase	-		+	
DNase	+		+	
ONPG	-		-	
Growth on TCBS	Gr		Gr	Gr
Growth in 0% NaCl	-		-	-
0.5%	+		+	
1.0%	+			
1.5%	+		+	
3.0%	+		+	+
7.0%	-		-	-
Hemolysis	NT		+	+

+, positive; -, negative; F, fermentative; Gr, green; NT, not tested.

全てウレアーゼ陰性であったのに対し, subsp. *damse-lae* 16株は全てウレアーゼ陽性であり, *ureC* DNAプロ-ープを用いた検査結果と合わせて, subsp. *piscicida* ではウレアーゼ遺伝子が欠如していると結論している。今回行った分離菌株のMultiplex PCRで 267 bp 付近と 448 bp 付近に2本の明瞭なバンドが認められたこと, 及び性状検査でウレアーゼが陽性であったことは Osorio *et al.* (2000) の報告と一致し, 分離菌株は *P. damsela* subsp. *damsela* と同定された。

*V. damsela* (= *P. damsela*) の重要な生化学的性状項目と考えられるリジン脱炭酸については, Sakata *et al.* (1989) 及び Fouz *et al.* (1992) は陰性と報告している。しかし, 今回の分離菌株はAPI20E及び生化学的性状

検査のいずれにおいてもリジン脱炭酸陽性を示した。上述のように, 分離菌株は運動性, API20E, DNAチップとの反応, 及びMultiplex PCR等の結果から, *P. damsela* subsp. *damsela* と同定されており, リジン脱炭酸陽性株と判断された。

病魚から分離された細菌の病原性の確認には原則として感染実験が不可欠であり, 今後は, 罹病魚と同種のクロダイ稚魚を用いた感染実験により病原性を明らかにすることが必要である。

Sakata *et al.* (1989) 及び Fouz *et al.* (1992) の報告には罹病魚の貧血についての記載は無いが, 分離された *V. damsela* (= *P. damsela*) の性状検査では共に溶血性を認めている。また, 著者らはクロダイ衰弱魚の剖検で

**Table 7** Comparison of carbohydrate utilization between present isolates and *Vibrio damsela* (Sakata *et al.* (1989) and Fouz *et al.* (1992))

Carbohydrates	Present isolates	<i>Vibrio damsela</i>	
	AsK-0701/Ask-0702	Sakata <i>et al.</i> (1989)	Fouz <i>et al.</i> (1992)
Cellobiose	w+/+	Fg	
Dextrin	+	Fg	
D-Fructose	+	Fg	
D-Galactose	+	Fg	
D-Glucose	+	Fg	+
Maltose	+	Fg	+
D-Mannose	+	Fg	+
Starch	+	Fg	
Dulcitol	-	F	
D-Ribose	+	F	
Glycerol	w+	O	
D-Mannitol	-	-	-
Melibiose	-	-	
Salicin	-	-	
Sucrose	-	-	-
Threhalose	+/w+	-	
L-Arabinose	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	
m-Inositol	-	-	-
Lactose	-	-	
Raffinose	-	-	
Rhamnose	-	-	
D-Xylose	-	-	

+, positive; +w, weakly positive; -, negative; Fg, fermentative with gas production; F, fermentative; O, oxidative.

極度の貧血状態を確認しており, *P. damsela* subsp. *damselae* のクロダイ稚魚に対する病原因子として溶血性が疑われるが, 分離菌株の性状検査では溶血性については検討しておらず, このことを明らかにすることも今後の課題として残された。

#### 謝 辞

本報で分離菌株の対照株とした *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (OT-51443株) を分与していただいた 大分県農林水産研究センター水産試験場 福田 穰氏に感謝します。

#### 文 献

Fouz B., Larsen J.L., Nielsen B., Barja J.L., Toranzo A.E. 1992. Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain. *Dis.Aquat.Org.*, **12**: 155-166.

Matsuyama T., Kamaishi T., Oseko N. 2006. Rapid discrimination of fish pathogenic *Vibrio* and *Photobacterium* species by oligonucleotide DNA array. *Fish Pathol.*, **41**: 105-112.

室賀清邦. 2004. ブリの類結節症, 「魚介類の感染症・寄生虫病」(若林久嗣・室賀清邦編). 206-211. 恒星社厚生閣, 東京.

Muroga K., Sugiyama T., Ueki N. 1977. Pasteurellosis in cultured black seabream. *J.Fac.Fish.Anim.Husb.*, Hiroshima Univ., **16**: 17-21.

Osorio C.R., Collins M.D., Toranzo A.E., Barja J.L., Romalde J.L. 1999. 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 2942-2946.

Osorio C.R., Toranzo A.E., Romalde J.L., Barja J.L. 2000. Multiplex PCR assay for *ureC* and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. *Dis.Aquat.Org.*, **40**: 177-183.

坂崎利一, 吉崎悦郎, 三木寛二. 1988. 新細菌培地学講座・下, 第2版. 近代出版, 東京.

Sakata T., Matsuura M., Shimokawa Y. 1989. Characteristics of *Vibrio damsela* isolated from dis-

eased yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**: 135-141.