

# 弧菌細胞外產物之研究—I.

## 弧菌細胞外產物對魚類之致病性研究

### Studies on Extracellular products of *Vibrio anguillarum*—I.

#### Studies on Pathogenicity of Extracellular Products of *Vibrio anguillarum* in Fish

陳石柱<sup>1</sup>·劉正義<sup>2</sup>

Shih-Chu Chen and Cheng-I Liu

#### Abstract

*Vibrio anguillarum*, cultured in brain heart infusion broth containing 1.5% NaCl, was centrifugated and collected supernatant to extract its extracellular products as VA-0-70 by 70% ammonium sulfate. The other extracellular products labeled as VA-70-80 was also extracted by adding 80% of ammonium sulfate to the supernatant of VA-0-70. VA-0-70 was shown its active properties of hemolysin and protease, and was inactivated by potassium periodate and by heat it 121°C for 20 minutes. VA-0-70 and its D-II fraction appeared the same three protein bands in SDS-PAGE. Of which, the molecular weight of these protein bands were approximately calculated as 67K, 37K and 21K, respectively.

The toxicity of VA-0-70 to mice was higher than VA-70-80. The LD<sub>50</sub> of VA-0-70 in mice (IV), eel (IP), loach (IP) and milk fish (IP) were tested as 155 μg, 375 μg, >2000 μg and 59 μg, respectively. Milk fish inoculated with VA-0-70 showed typical lesions of vibriosis. Marked hemorrhage was noted in pectoral, ventral fins and in some parts of the body surface. Focal necrosis were found in some parenchymatous organs such as liver, kidney and heart. Owing to the lesions found in the experimental cases, VA-0-70 is presumed to possess the main pathogenicity factors of *V. anguillarum* to cause vibriosis in fish.

#### 緒 言

由 *Vibrio anguillarum* 感染所引起之弧菌症 (Vibriosis) 是海水魚 (Haastein *et al.*, 1972; Levin *et al.*, 1972; Smith 1961) 及淡水魚類 (Hacking *et al.*, 1971; Muroga *et al.*, 1967) 的重要細菌性傳染病，其以引致皮膚、鰭及內附器官出血與壞死為特徵。在本省 *V. anguillarum* 主要

1. 國立屏東農專獸醫科 (Department of Veterinary Medicine, National Pingtung Institute of Agriculture, Pingtung, Taiwan, R. O. C.)

2. 國立中興大學獸醫系 (Department of Veterinary Medicine, National Chung-Hsing University.)

感染虱目魚 (Chen and Liu 1972; Tung *et al.*, 1985) 鰻魚 (Liu 1981) 及香魚 (Kou *et al.*, 1976)。

本省虱目魚，每年在越冬期易罹患弧菌症而遭受重大經濟損失。據統計，1957年至1972年間，越冬溝虱目魚年平均死亡率為15% (Chen *et al.*, 1972)，而1975年則死亡率高達70% (Huang 1977)。

許多魚類細菌性疾病之病原如：*Aeromonas hydrophila* (Allan *et al.*, 1981; Tune *et al.*, 1982 a. b)、*Pseudomonas spp* (Fukumori *et al.*, 1983; Li 1967)、*Edwardsiella Tarda* (Salati *et al.*, 1983; Ullah 1983) 及 *V. anguillarum* 等皆有細菌細胞外產物 (extracellular products) 之文獻報告。

*V. anguillarum* 之細胞外產物具有溶血素活性 (hemolysin activity) (Inamura *et al.*, 1984; Kodama *et al.*, 1984; Moustafa *et al.*, 1984; Munn 1978; Toranzo *et al.*, 1983) 及蛋白質分解酵素活性 (Protease activity) (Inamura *et al.*, 1984; Kodama *et al.*, 1984)。

*V. anguillarum* 之細胞外產物對金魚、日本鰻、香魚、虹鱒及小白鼠均有致病性，可引致內臟器官出血及水腫 (Kodama *et al.*, 1985; Munn 1980)，並對魚類細胞株 CHSE-214 cell 具有細胞病變作用 (Kodama *et al.*, 1984)。但對虱目魚之毒性如何尚未有文獻報告。

本試驗及研究萃取之細胞外產物物理化學性狀，並以人工接種試驗確定細胞外產物是否為虱目魚紅斑病之主要致病因子，以瞭解細胞外產物和本病發生之關係。

## 材料與方法

### 一、供試菌株

由臺南地區虱目魚罹患紅斑病例所分離之 *Vibrio anguillarum* (編號為 AC716) 為供試菌株。本菌株由屏東農專南區魚病中心提供。

### 二、供試動物

#### (一) 鰻魚：

購自鹿港地區養鰻場，大小每尾 35~40g，體長為 30~34 cm 於 100 l 容積並附有打氣裝置之塑膠水槽中，水溫為 26°C。所購之鰻魚部分行逢機取樣做細菌分離及病理切片。證明健康之鰻魚放置一星期以適應水槽中環境，並用 formalin 20 ppm 每日浸浴 18 小時，連續 2 天後，做為本試驗之供試鰻魚。

#### (二) 小白鼠：

由屏東農專實驗動物舍供應，體重為 22~25 g，小白鼠每組四隻分別飼養於鋁製籠子內。

#### (三) 泥鰍：

購自屏東市場，每尾泥鰍體重為 11~13 g，體長為 9~11 cm，逢機取樣做細菌分離及病理切片。證明為健康之泥鰍以 Benzalkonium Chloride 1 ppm 浸浴 3 天，(水溫為 26°C) 後做供試泥鰍。

#### (四) 虱目魚：

購自省水產試驗所臺南分所，體重為 12~14 g，體長為 8~10 cm，飼養 40 l 之塑膠水槽內並有打氣裝置，水溫為 26°C，並逢機取樣做細菌分離及病理切片。證明健康之虱目魚以 Benzalkonium chloride 1 ppm 浸浴 3 天後做為供試虱目魚。

### 三、*V. anguillarum* 細胞外產物之製備及其蛋白質濃度測定與蛋白質成份分析

#### (一) *V. anguillarum* 細胞外產物之製備：

*V. anguillarum* (AC716) 培養於 5 ml 含有 1.5% NaCl 之 Brain Heart Infusion broth

(BHI broth)。於 28°C，18 小時後再次培養於 1000 ml 之含 1.5 % NaCl BHI broth。在 28°C，18 小時後，在 4°C 下，以 4500×g 離心 30 分鐘。收集上清液，以 0.45 μm 濾過膜過濾後加 70% 飽和硫酸銨，慢慢攪拌於 4°C 感作 1 小時，之後在 4°C，以 8000×g 離心 20 分鐘，取沉澱物並把此階段之沉澱物稱為 VA-0-70。另外上清液加飽和硫酸銨至 80%，於 4°C 下感作 1 小時，然後在 4°C，以 8000×g 離心 20 分鐘，此階段所得之沉澱物稱為 VA-70-80。將兩階段沉澱物分別以 0.85% NaCl 收集，在 4°C，以 0.85% NaCl 透析 48 小時，以 0.45 μm 濾過膜過濾後，分裝貯存於零下 20°C 備用。

#### (一)蛋白質濃度測定 (Biorad Protein Assay)：

係以 Bio-Rad 蛋白質標準定法來測定之 (Hanson etc 1984 及 Kessler 1975)，使用 Bovine Serum Albumin 為對照組做標準曲線以資對照。

#### (二)蛋白質成份分析：

##### 1.離子交換色層分析法 (Ion Exchange Chromatography)

將細胞外產物 (VA-0-70) 注入事先以 0.01 M 磷酸緩衝液平衡好的 DEAE-cellulose 管柱 (1.6 × 50 cm)，在 pH 7.0 下流速調整為 30 ml/hr，同時以波長 280 nm 的吸光度 (Optical density OD 值) 作為蛋白出流的指標，不被吸收部分在 4°C 下流出，稱為 D-I fraction。吸收物質以 1 M NaCl 洗出稱為 D-II fraction。

##### 2.SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳法 (Sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis)：

配製 12% 之 lower gel，標準蛋白使用 low molecular weight 及 high molecular weight marker (pharmacia)。在 200 伏特，50 安培通電 3 小時，以 coomassie brilliant blue 染色。

#### 四、不同細胞外產物對小白鼠毒性試驗

以不同細胞外產物即：VA-0-70，VA-70-80，D-I Fraction 及 D-II fraction，依每 0.3 ml 含 500 μg 之劑量靜脈注射於 22~25 g 小白鼠以 BHI broth (500 μg) 及 0.85% NaCl 靜脈注射做為對照組，以測其對小白鼠之毒性，並供為致病性試驗之依據。

#### 五、細胞外產物 (VA-0-70) 之物理化學性狀及酵素活性測定

##### (一)物理化學性狀：

###### 1.胰蛋白酶處理組：

以 1.2 ml 之 VA-0-70 (含 2000 μg 蛋白質) 混合 5 mg 胰蛋白酶 (1:250 Difco)，在 37°C 溫箱內振盪感作 1 小時，再以 10 mg Soybean Trypsin Inhibitor (Type-II-S Sigma St Louis Mo) 在室溫混合感作 15 分鐘，以究其對 VA-0-70 毒力之影響。

###### 2.乙醚處理：

以 1.2 ml 之 VA-0-70 加 1.2 ml Ethyl ether，激烈振盪混合，然後放置於 4°C 冰箱隔夜，間歇振盪。Ethyl ether 以真空陰壓力使之發揮。

###### 3.過碘酸鉀處理組：

以 1.2 ml 之 VA-0-70 加 1.2 ml 1/90 M 過碘酸鉀溶液混合在室溫感作 15 分鐘在 4°C 下，以 0.85% NaCl 透析隔一夜，並以 PEG 20,000 濃縮及以 1.2 ml 0.85% NaCl 溶解濃縮細胞外產物。

###### 4.熱處理組：

每 1.2 ml 之 VA-0-70 分別在 37°C、56°C 及 80°C 各感作 30 分鐘，以及在 100°C 及 121°C 下各處理 20 分鐘。

(一) 酵素活性測定：

溶血素及蛋白分解酵素測定

(1) 紅血球懸浮液之製備：

以含有肝素之注射筒採血，立即加磷酸緩衝生理鹽水溶液 (Phosphate Buffer Saline Solution, PBSS pH 7.2) 離心  $400 \times g$  15 分鐘。如此重複洗滌三次，然後以 PBSS 做成 0.5% 紅血球懸浮液。

(2) 溶血素半定量測定及蛋白分解酵素測定 (1984 Kodama etc)。

六、*V. anguillarum* 細胞外產物 (VA-0-70) 對小白鼠及各種不同魚類之致病性研究

(一) LD<sub>50</sub> 之測定：

1. 小白鼠：

細胞外產物 (VA-0-70) 以不同蛋白質濃度對小白鼠行 LD<sub>50</sub> 之測定共分為 6 組，每組 4 隻。第 1 組至第 5 組分別以 1000  $\mu g$ ，500  $\mu g$ ，250  $\mu g$ ，125  $\mu g$  及 62  $\mu g$  靜脈注射，第 6 組以 0.85% NaCl 靜脈注射做為對照組。

2. 虱目魚、鰻魚、及泥鰍：

細胞外產物 (VA-0-70) 以不同蛋白質濃度對虱目魚、鰻魚及泥鰍 (虱目魚及鰻魚每組各 8 尾，泥鰍每組 5 尾) 行腹腔注射測定其 LD<sub>50</sub>，並以 0.85% NaCl 腹腔注射做為對照。小白鼠、虱目魚、鰻魚及泥鰍致病性試驗期間為兩週。

(二) 肉眼及組織病理學檢查：

各試驗組動物包括試驗期間死亡，先行外表及內部各器官之肉眼病理學檢查，並記錄可視之病變後行細菌分離及組織病理學採樣。供組織病理學檢查之標本係採自肝、腎、脾、心、胃、腸及鰓等。所採樣標本固定於 10% 中性福馬林溶液，再經石臘包埋切片，並以蘇木紫——伊紅 (Hematoxylin-Eosin; H&E) 染色後鏡檢。

結 果

一、*V. anguillarum* 細胞外產物之製備、蛋白質濃度測定及蛋白質成份分析結果

(一) *V. anguillarum* 細胞外產物之分離：

以 4~5 個菌落接種入 5 ml BHI Broth 培養 18 小時後，再將 5 ml BHI Broth 倒入 1000 ml BHI Broth 培養 18 小時後，以 70% 飽和硫酸銨分離細胞外產物可以獲得 20 mg 細胞外產物。以此萃取之細胞外產物 40 mg 溶於 8 ml 之 0.85% NaCl，經離子交換色層分析，可以獲得兩個收集峰。第一個收集峰為 D-I fraction 約 8.5 mg；第二個收集峰約 15 mg。蛋白質回收率約 58% (圖 1)。

(二) SDS- 聚丙烯醯胺膠體電泳法 (SDS-PAGE) 分析結果：

細胞外產物 VA-0-70 及半純化 D-II fraction 以 SDS-PAGE 進行分析。VA-0-70 及半純化 D-II fraction 與標準蛋白 (pharmacia) 比較結果，VA-0-70 具有三種主要分離帶 (Band)，與半純化 D-II fraction 的分離帶相同，其分子量分別為 67K、37K 及 21K。

二、細胞外產物 VA-0-70 之物理化學性狀及其酵素活性之測定結果

(一) 物理化學性狀：

細胞外產物 VA-0-70 對小白鼠之毒性易被過碘酸鉀 (Potassium Periodate) 破壞，但對 Trypsin 具有抵抗性。又經 Ethyl ether 及 100°C 之處理亦可減低 VA-0-70 之毒性，但在 121°C，20 分處理後則毒性完全消失 (表 1)。

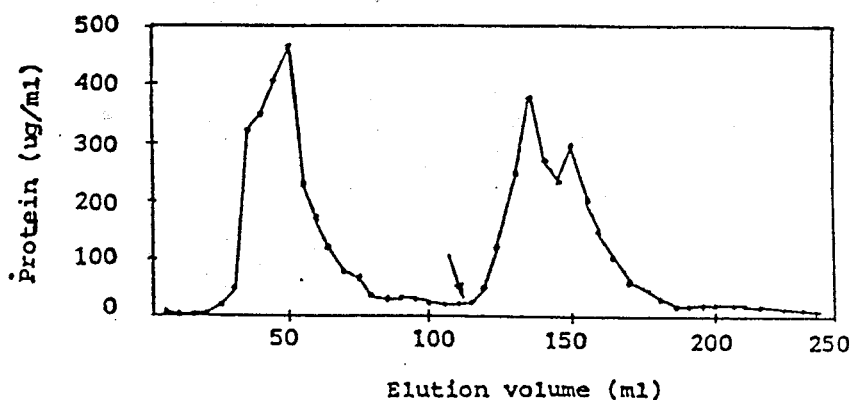


Fig. 1. Elution profile of DEAE-cellulose ion exchange chromatography of extracellular products (VA-0-70). The material was absorbed onto a column (1.6×50 cm) equilibrated with 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.0). Unabsorbed material was washed out with the buffer at a flow rate 30 ml/hr. The absorbed material was then eluted with 1 M NaCl. Arrow shows the start of the elution with 1M NaCl.

Table 1. Effect of various treatment on lethal toxicity of extracellular products of *V. anguillarum* (VA-0-70) in mouse

Treatment	No. of death/total
Trypsin	4/4
Ethyl ether	2/4
Potassium periodate	0/4
37°C for 30 minutes	4/4
56°C for 30 minutes	4/4
80°C for 30 minutes	3/4
100°C for 20 minutes	2/4
121°C for 20 minutes	0/4
Untreated	4/4

Mice were injected with treatment or untreated with VA-0-70 by IV. Original material before treatment contained 500  $\mu$ g of protein per 0.3 ml.

(二) 酵素活性測定：

1. 溶血素：

細胞外產物 VA-0-70 與雞、兔子及鰻魚之紅血球行溶血反應測定，結果顯示此細胞外產物具有溶血素，但對不同動物之溶血力價有所差異；雞為 16 倍，鰻魚 32 倍及兔子大於 4096 倍。

2. 蛋白質分解酵素之測定：

VA-0-70 在不同 pH 值下 (5.0-11.5) 均能測到蛋白分解酵素之活性，而以 pH 值 9.3-10.7 之間活性最強。

三、*V. anguillarum* 之不同細胞外產物對小白鼠毒性試驗結果

*V. anguillarum* 細胞外產物 VA-0-70 比 VA-70-80 之毒性強，又 VA-0-70 經離子交換色層

分析來純化之 D-I 及 D-II fraction 對小白鼠行毒性試驗亦顯示都具有毒性，以 D-II fraction 之毒性較強 (表 2)。

四、*V. anguillarum* 細胞外產物 VA-0-70 對小白鼠及各種不同魚類之致病性研究結果

(-)LD<sub>50</sub> 之測定：

細胞外產物 VA-0-70 之不同蛋白質濃度靜脈注射小白鼠，腹腔注射鰻魚、虱目魚及泥鰍結果顯示依小白鼠、鰻魚、虱目魚及泥鰍其 LD<sub>50</sub> 分別為 155 μg、375 μg、59 μg 及大於 2000 μg (表 3)。由試驗結果得知細胞外產物對虱目魚的毒性最強，而泥鰍具有抵抗力。

Table 2. Toxicity of different fraction of extracellular products of *V. anguillarum* in mouse

Material	Inoculum (μg/0.3 ml) protein. IV.	No. of death/total
VA-0-70	500	4/4
VA-70-80	500	1/4
DEAE-cellulose		
Peak I (D-I fraction)	500	1/4
Peak II (D-II fraction)	500	4/4
BHI broth control	500	0/4
0.85% NaCl	—	0/4

Table 3. Lethal toxicity of extracellular products of *V. anguillarum* (VA-0-70) in mouse, eel, milk fish, and loach

Test animal	Amount of inoculation protein (μg/animal)	No. of death/total	2-wk-LD <sub>50</sub> *
Mouse (IV)	1000	4/4	155
	500	4/4	
	250	3/4	
	125	2/4	
	62	0/4	
Eel (IP)	2000	8/8	375
	1000	7/8	
	500	6/8	
	250	3/8	
	125	1/8	
Milk fish (IP)	250	8/8	59
	125	6/8	
	62	5/8	
	31	1/8	
Loach (IP)	2000	1/5	>2000
	1000	0/5	
	500	0/5	

\* LD<sub>50</sub> calculated by Behrens-Karber Method.

## (二)肉眼及組織病理學檢查：

## 1.小白鼠：

經 VA-0-70 不同濃度蛋白質靜脈注射小白鼠，一般於 24 小時後被毛豎立，食慾不振或廢絕，痙攣性收縮及迴旋運動為特徵症候且陸續於 2~3 日內死亡。剖檢可見肺臟充血，肝臟顯著腫大且有白色壞死點。鏡下，肝臟除局部壞死灶 (focal necrosis) 外肝細胞亦多見急性細胞腫脹及核濃縮現象 (圖 2)。肺臟呈現輕度充血及水腫。腎臟則腎小管上皮細胞呈急性腫脹及核濃縮，腎小管腔內蓄積脫落之上皮碎片 (圖 3)。脾臟可見許多淋巴濾泡呈輕度之淋巴球壞死現象 (圖 4)。

## 2.虱目魚：

虱目魚接種 24 小時後開始顯示病徵，而於 48 小時內死亡尾數最多。病魚大都於體表，特別是胸鰭及腹鰭呈明顯出血斑，體表糜爛，鱗片脫落及肛門出血 (圖 5)。肝臟中度腫大，散發性黃白色壞死點。鏡下，肝臟呈顯著之局部壞死灶，有些壞死灶融合而成為較大之膿瘍 (圖 6、7)。部分肝細胞亦可見空泡化及肝索分離現象。心臟亦可見壞死灶，炎症滲出物蓄積於心肌纖維間隙以及心內膜之內皮細胞增生現象 (圖 8)。腎臟則以間質充血，局部壞死灶及呈晶質小滴樣變性為主徵，部分之脫落細胞碎片及炎症滲出物亦見蓄積於腎小管腔內 (圖 9)。腸管之病變以壞死性腸炎為主。嚴重病例，壞死病變波及粘膜下層。

## 3.鰻魚

供試鰻之內眼病變與虱目魚類似。體表、腹鰭及胸鰭亦有明顯充出血。組織病變方面亦於肝、腎、心及脾可見局部壞死灶，但程度較輕。

## 3.泥鰍：

泥鰍對 VA-0-70 之抵抗力最強，只能在高濃度下見一尾死亡。病死之泥鰍亦未見顯著之病理變化。

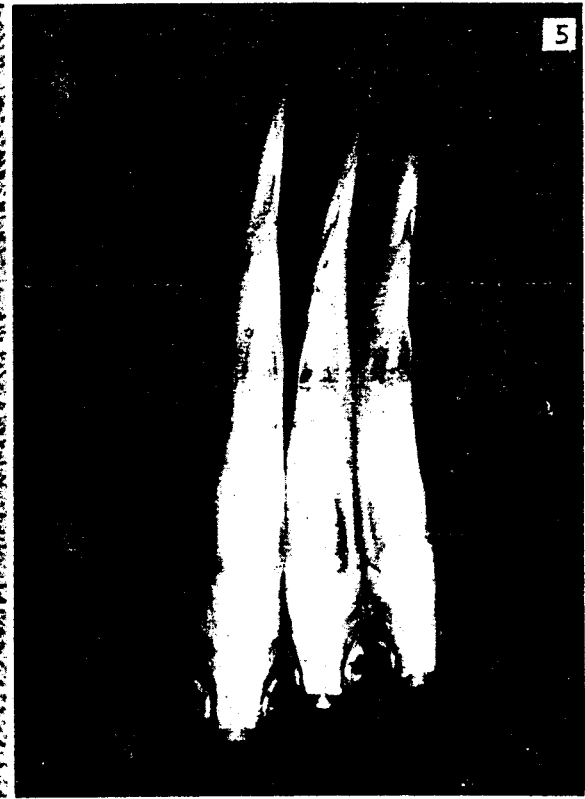
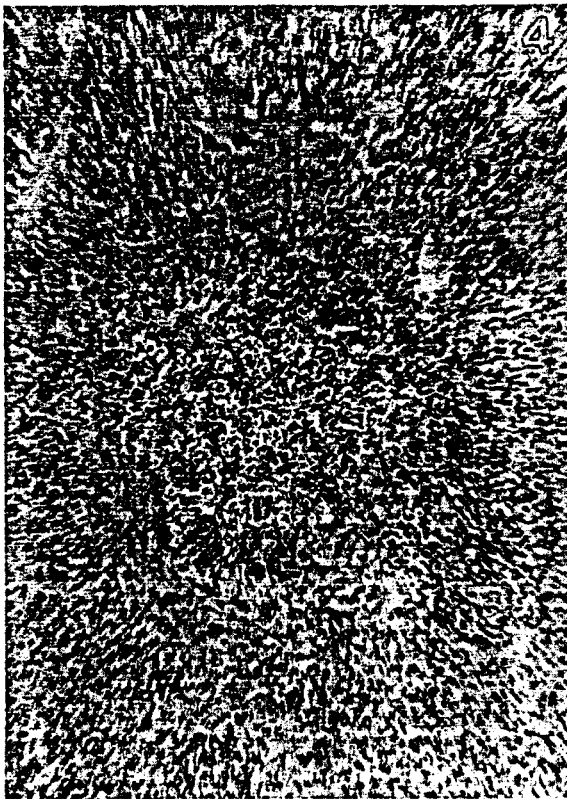
## 討 論

本試驗關於萃取 *V. anguillarum* 細胞外產物係參考 Inamura 等 1984 及 Kodama 等 1984 方法，但加以修改部份細菌培養方法及程序。將 *V. anguillarum* 接種入 5 ml 含有 1.5% NaCl 之 BHI Broth 培養 18 小時後，再將 5 ml BHI Broth 倒入 1000 ml 含有 1.5% NaCl 之 BHI Broth 培養 18 小時後，以 70%飽和硫酸銨感作 1 小時就可以萃取出對虱目魚、鰻魚及小白鼠具有致死性之細胞外產物。

本試驗以 SDS-PAGE 方法分析所萃取之細胞外產物 VA-0-70 之蛋白質及其分子量，發現 VA-0-70 及其 D-II fraction 皆具有相同之三種蛋白質，其分子量分別為 67K、37K 及 21K。Kodama 等 1985 從 *V. anguillarum* 所萃取之細胞外產物顯示亦有三種蛋白質，但其與 D-II fraction 的蛋白質在分子量有所差異；前者為 78K、65K 及 39K，而 D-II fraction 之分子量則為 66K、60K 及 38K。本試驗萃取之細胞外產物與 Kodama 分子量有所不同，可能與不同菌株有關，也可能與萃取細胞外產物之方法不同有關。

關於細胞外產物之理化學性狀方面，本試驗萃取之 VA-0-70 易被過碘酸鉀破壞，對 Trypsin 具有抵抗力，經 Ethyl ether 及 100°C 之處理可減低毒性，但在 121°C 20 分鐘後則毒性完全消失等。這些性狀與 Kodama 等 1985 及 Moustafa 等 1984 所得細胞外產物大致相同，而僅有對 Ethyl ether 之敏感性方面有所差異。至於與 Inamura 等 1984 所得之細胞外產物比較則差異較大。Inamura 所萃取之細胞外產物對溫度相當敏感，在 60°C 加熱 10 分鐘即降低對小白鼠之毒力，而在 70°C 時所有活性完全消失。

本細胞外產物經測定顯示具有溶血酵素活性，能對不同動物之紅血球引致溶血現象，但有敏感性差





異。比較所測之兔子、鷄及鰻魚等三種動物則兔子之感受最高而鷄最低。Moustafa 等 1984 及 Kodama 等 1984, 亦證明 *V. anguillarum* 之細胞外產物具有溶血酵素, 且對鷄、牛、天竺鼠、馬、人類 (O 型血)、小白鼠、兔子、綿羊、鱒魚、鮭魚及金魚等動物有敏感性不同之溶血現象。*V. anguillarum* 所具有之另一酵素活性為蛋白質分解酵素。Kodama 等 1984 認為此酵素之活性在 pH 8.6 或 9.5 最佳, 但 VA-0-70 經測試則發現其活性以 pH 10 最強。這可能由於菌株不同的關係。

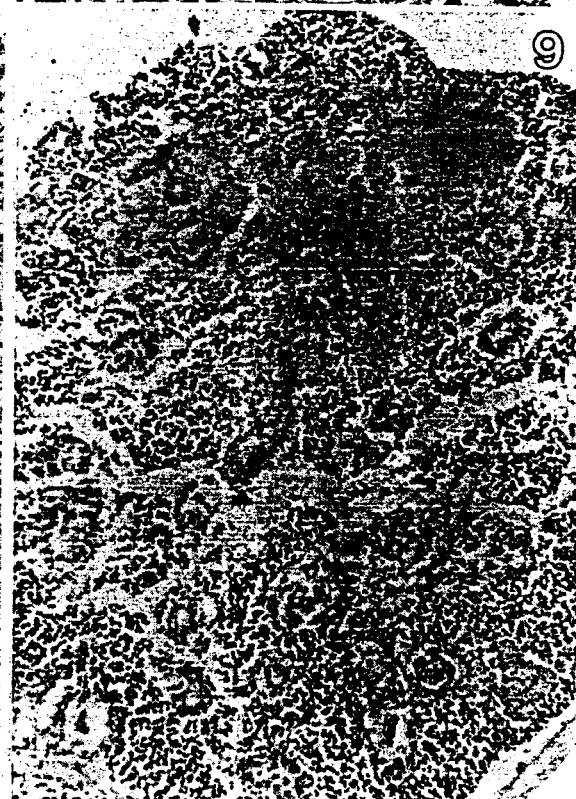
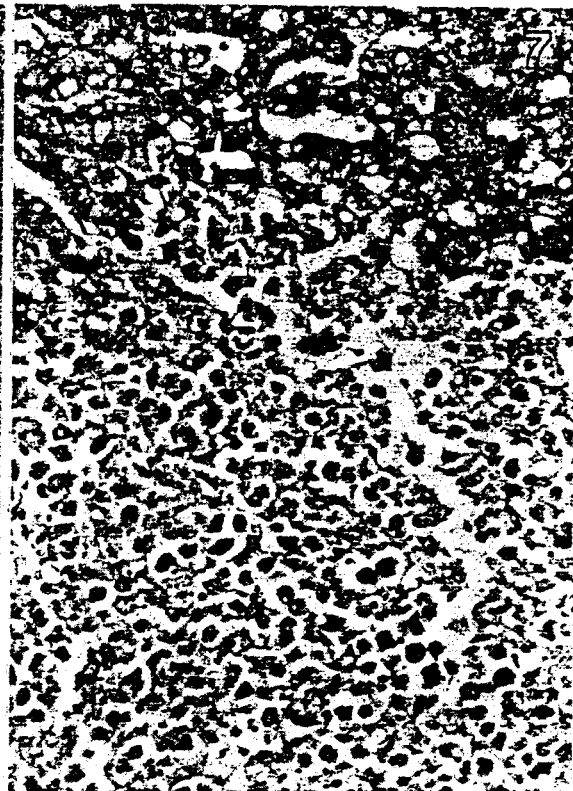
以 VA-0-70 及 VA-70-80 行靜脈注射於小白鼠以比較其毒性顯示 VA-0-70 之毒性較強。證明以 70% 飽和硫酸銨萃取之細胞外產物 VA-0-70 就其毒性及萃取量皆比再經 80% 飽和硫酸銨行二次萃取之 VA-70-80 為佳。因此本試驗有關於 *V. anguillarum* 細胞外產物之致病性。以 VA-0-70 為主而測試之。VA-0-70 對鰻魚、虱目魚、泥鰍及小白鼠之毒性試驗顯示對虱目魚之毒性最強, 其 LD<sub>50</sub> 為 59 μg, 而小白鼠為 155 μg, 其次為鰻魚 375 μg, 而泥鰍具有相當之抵抗力為大於 2000 μg。虱目魚接種 VA-0-70 後, 呈現典型之紅斑病病徵, 即胸鰭、腹鰭及體側之體表有明顯出血斑, 以及肝臟、腎臟及心臟呈局部壞死灶等。因此 *V. anguillarum* 之細胞外產物可能是紅斑病之主要致病因子。Kodama 等 1985 及 Inamura 等 1984 亦曾對所萃取之 *V. anguillarum* 細胞外產物對許多動物行致病性及其 LD<sub>50</sub> 測定。但是, 關於虱目魚及泥鰍之致病性尚無文獻報告。

### 摘 要

以含有 1.5% NaCl 之 Brain Heart Infusion Broth 所培養之 *Vibrio anguillarum*, 經 70% 飽和硫酸銨加入上清液中萃取之細胞外產物為 VA-0-70; 然後再加入飽和硫酸銨於上清液至 80%, 其萃取之細胞外產物為 VA-70-80。以 VA-0-70 測其理化化學性狀得知具有 hemolysin 和 protease 活性。對胰蛋白酶具有抵抗性, 但被過碘酸鉀所不活化。以及在 121°C 加熱 20 分鐘, 其致病性完全消失。經 SDS- 聚丙烯醯胺膠體電泳分析結果顯示 VA-0-70 及 VA-0-70 通過 DEAE-cellulose

### Explanation for Figures

- Fig. 2. Liver. Mouse received 0.3 ml (500 μg) of VA-0-70, IV. Marked focal necrosis was found. Hepatocytes underwent pyknosis, karyorrhexis and karyolysis. X200, H & E.
- Fig. 3. Kidney. Mouse received 0.3 ml (250 μg) of VA-0-70, IV. Marked necrotizing change of renal tubules. X400, H & E.
- Fig. 4. Spleen. Mouse inoculated with 0.3 ml (500 μg) of VA-0-70, IV. Some of the lymphocytes in the lymphoid follicle underwent pyknosis, karyorrhexis and karyolysis. X200, H & E.
- Fig. 5. Milk fish inoculated with 0.5 ml (250 μg) of VA-0-70, IP. Marked hemorrhage was found in the ventral and pectoral fins, 36 hrs post inoculation.
- Fig. 6. Liver. 36 hrs post inoculated with 0.5 ml (250 μg) of VA-0-70, IP. Marked multifocal and extensive lesions of liquefactive necrosis were noticed. X400, H & E.
- Fig. 7. Liver. Milk fish inoculated with 0.5 ml (125 μg) of VA-0-70, IP. Marked pyknosis, karyorrhexis and karyolysis in the hepatocytes. X400, H & E.
- Fig. 8. Heart. Milk fish inoculated with 0.5 ml (125 μg) of VA-0-70, IP. Showing exudative accumulation in the interstitium of the myocardium. Some of the cardiac fibers underwent fragmentation. X200, H & E.
- Fig. 9. Kidney. Milk fish inoculated with 0.5 ml (125 μg) of VA-0-70, IP. Marked necrosis involved both renal tubules and hematopoietic tissue. X200, H & E.



之 D-II fraction 皆具有三種相同蛋白質，其分子量為 67K、37K 及 21K。

以 VA-0-70 及 VA-70-80 分別行靜脈注射於小白鼠比較其毒性，結果以 VA-0-70 之毒性較強。VA-0-70 對小白鼠 (IV)、鰻魚 (IP)、泥鰍 (IP) 及虱目魚 (IP) 等之半致死濃度 (LD<sub>50</sub>) 分別為 155 μg、375 μg、>2000 μg 及 59 μg。虱目魚經 VA-0-70 之注射後呈典型之紅斑病病徵，即胸鰭、腹鰭及體側之體表呈現明顯出血斑、肝臟、腎臟及心臟呈局部壞死灶等。因此 *V. anguillarum* 之細胞外產物實具致病性，並且可能是紅斑病之主要致病因子。

### 參 考 文 獻

- Allan, B. J. and R. M. W. Stevenson (1981) Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. *Can. J. Microbiol.* 27: 1114-1122.
- Chen, H. C. and C. Y. Liu. (1972) Ecological study of milk fish wintering pond. *JCRR Fisheries Series No. 12*: 35-39.
- Fukumori, F., F. Nagayama and S. Horie. (1983) Lytic and lethal effect culture supernatant of *pseudomonas* sp. against fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Bull. Soc. Sci Fish NIPPON SUISAN GAKKAISHI*. Vol. 49, No. 7: 1109-1116.
- Haastein, T. and G. Holt (1972) The occurrence of vibrio diseases in wild Norwegian fish. *J. Fish Boil.* 4: 33-37.
- Hacking, MA. and J. Budd, (1971) *Vibrio* infection in tropical fish in a freshwater aquarium. *J Wildl Dis* 7: 273-280.
- Hanson, D. C. and V. N. Schumaker. (1984) A model for the formation and inter-conversion of protein A-immunoglobulin G soluble complexes. *J. Immunol.* 132(3): 1379-1409.
- Huang, Y. H. (1977) Preliminary report of the studies on bacterial disease of milkfish, *Chanos chanos* winter water. *JCRR. Fish Ser.*, No. 29: 59-54.
- Inamura, H., K. Muroga and T. Nakai. (1984) Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum*. *Fish Pathol.* 19, 2: 89-96.
- Karber, G. (1931) Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischen reihenversuche. *Arch. Exp. Pathol. pharmacol.*, 162: 480-483.
- Kessler, S. (1975) Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A-antibody absorbent: Parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A *J. Immunol.* 115(6): 1617-1699.
- Kodama, H., M. Moustafa, S. Ishiguro, T. Mikami and H. Izawa. (1984) Extracellular virulence factors of fish *Vibrio*: Relationship between toxic material, hemolysin and proteolytic enzyme. *Am. Vet. Res.*, 45: 2203-2207.
- Kodama, H., M. Moustafa, T. Mikami and H. Izawa. (1985) Partial purification of extracellular substance of *Vibrio anguillarum* toxigenic for rainbow trout and mouse. *Fish Pathol.* 20(2/3): 173-179.
- Kodama, H. M., Moustafa, T. Mikami and H. Izawa. (1985) Characterization of extracellular substance of *Vibrio anguillarum* toxic for rainbow trout and mice. *Microbiol. Immunol.* Vol, 29(10) 909-920.
- Kou S. C., H. Y. Chung and G. H. Kou., (1976) *Vibrio anguillarum* isolated from a *Vibrio* disease of fresh-water cultured ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Journal of the*

Fisheries society of Taiwan Vol. 4, No. 2. June. 21-24.

- Levin, MA., RE. Wolke and VJ. Cabelli (1972) *Vibrio anguillarum* as a cause of disease in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). Can. J. Microbiol. 18: 1585-1592.
- Li, Mf. Flemming C. (1967) A proteolytic *Pseudomonas* from skin lesions of rainbow trout (*salmon Gairdneri*) I. Characteristics of the pathogenic effects and extracellular proteinase. Can. J. Microbiol. 13: 405-416.
- Liu, C.I. (1981) The pathology of the major diseases of eel in Taiwan proceedings of republic of China-United states cooperative science seminar. on fish diseases. (NSC symposium series No. 3) National science council republic of china. 89-99.
- Muroga, K. and S. Egusa, (1967) *Vibrio anguillarum* from an endemic disease of ayu ia Lake Hamana. Bull. Jan. Soc. Sci. Fish 33: 636-640.
- Munn, C.B. (1978) Hemolysin production by *Vibrio anguillarum*. FEMS Microbiol. Letter, 3: 265-268.
- Moustafa, M., H. Kodama, S. Ishiguro, T. Mikami and H. Izawa. (1984) Partial purification of extracellular toxic material of fish *Vibrio*. Am. J. Vet. Res. 45: 2208-2210.
- Salati, F., K. Kawai and R. Kusuda (1983) Immunoresponse of eel against *Edwardsiella tarda* antigen. Fish Pathol. 18. 3: 135-141.
- Smith, I.W. (1961) A disease of finnock due to *Vibrio anguillarum* J. Gen. Microbiol. 24: 247-252.
- Thune, R.L., T.E. Graham, L.M. Riddle and R.L. Amborski (1982a) Extracellular products and endotoxin from *Aeromonas Hydrophila*: effects on age-O Channel catfish. Trans. Amer. Fish Soc., 111: 404-408.
- Thune, R.L., T.E. Graham, L.M. Riddle and R.L. Amborski (1982b) Extracellular protease from *Aeromonas hydrophila*: Effect on age-O Channel, catfish, Trans. Amer. Fish Soc. 111: 749-754.
- Toranzo, A.E., J.L. Barja, R.R. Colwell, F.M. Hetrick and J.H. Crosa. (1983) Hemagglutinating, Haemolytic and cytotoxic activities of *Vibrio anguillarum* and related *vibrio* isolated from striped bass on the Atlantic Coast. FEMS Microbiol., letter., Vol. 18, No. 3: 257-262.
- Tung, M.C., S.S. Tasi and S.C. Chen. (1985) Study on *Vibrio anguillarum* infection in milkfish, COA Fisheries Series No. 4. Fish Disease Research (VII), 12: 27-37.
- Ullah, M.A. and T. Arai (1983) Exotoxic substances produced by *Edwardsiella tarda*. Fish pathol. 18. 2: 71-75.