真菌性肉芽腫症起病真菌に関する研究—II.

MG-fungus に関する 2・3 の知見

畑井喜司雄*・江草 周三**

(昭和 53 年 4 月 1 日受理)

Studies on the Pathogenic Fungus of Mycotic Granulomatosis—II. Some of the Note on the MG-fungus

Kishio HATAI* and Syuzo EGUSA**

*Central Research Lab., Sankyo Co., Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan

**Dept. of Fish., Fac. of Agr., Univ. of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

(Received April 1, 1978)

Experiments on the effect of dilution of fish meat extract in the FME agar on the growth of MG-fungus revealed that the fungus grew best on the FME agar which consisted of 10% w/v fish meat extract plus 1.5% Difco agar.

The MG-fungus grew well on the FME agar at 15 to 30°C, but failed to grow at 5 and 37°C. It grew in the FME broth at the pH range 5 to 10.

Chloramphenicol, malachite green, cycloheximide and NaCl completely inhibited mycelial growth at concentrations of 100 ppm, 1.0 ppm, 0.4 ppm and 1.0%, respectively. The mycelium of MG-fungus was killed in 10 ppm cycloheximide solution and 2% NaCl within 24 hours and 0.5 ppm malachite green solution within 2 hours.

著者らは前報(畑井ら, 1977b)において真菌性肉芽腫症罹病アユから FME 寒天培地を用いることにより病原真菌の分離, 培養に初めて成功したこと, また人工感染試験により自然発病魚と同一症状が再現されたことなどを述べ, その病原真菌を仮に MG-fungus と呼ぶことを提案した。

本報では MG-fungus の発育に及ぼす温度, pH, NaCl および薬剤の影響など, その 2, 3 の性状について検討したのでその概要を述べる。

材料および方法

供試株: 各試験に用いた MG-fungus は 1976 年 9 月, 滋賀県 N 養魚場の罹病アユから分離された SA-7610 株である。

FME 寒天培地の検討: アユ筋肉を 10 倍から 1,600 倍までに希釈し, 各希釈液に寒天末を 1.5% 加え, 高圧

* 三共(株)中央研究所

** 東京大学農学部水産学科

*** FME 寒天平板培地で 25°C, 10 日間培養後の MG-fungus の菌糸体を寒天ごと径 3.5 mm の円板状に切取ったもの。

滅菌後シャーレに流して平板とした後, その上に 1 個の agar block*** を真菌の発育面が平板に接するように置き, 25°C で培養後, 経時的に集落の径を測定する方法により最適培地の検討を試みた。

また, アユの筋肉で作製した FME 寒天培地とウナギ, キンギョ, コイ, ニジマスおよびアマゴの筋肉を材料として作製した培地とで MG-fungus の発育度が異なるか否かも検討した。

温度の影響: MG-fungus の発育に及ぼす温度の影響は agar block を FME 寒天平板上に静置した後, 5, 15, 25, 30 および 37°C の各温度で培養し, 経時的に集落の径を測定する方法によった。

培地上での真菌の生存期間は 15, 25 および 30°C の各温度にて一定日数培養後, 新しい培地に agar block の状態で移植し, 25°C で培養後, 菌糸の発育がみられるか否かにより真菌の生死を判定する方法によった。

pH の影響: 菌糸の発育に及ぼす pH の影響は 3 から 12 までの各 pH に調整した FME ブロスに 1 個の agar block を接種し, 25°C で培養後, 経時的に菌糸の発育の有無を肉眼的に判定する方法によった。

抗真菌作用: ampicillin, streptomycin, chloramphenicol, cycloheximide, malachite green および NaCl の計 6 種類の薬剤を用い、種々の濃度の薬剤加 FME 寒天平板地を作製した後、その中央に agar block を静置し、25°C で培養後、経時的に集落の径を測定する方法によった。

殺真菌作用: 試験は cycloheximide, malachite green および NaCl の 3 剤を用い、2 または 3 段階の濃度に調整した各薬剤の希釈液に agar block を浸漬させ、以後 10 および 30 分、1, 2 および 24 時間後に各薬液から agar block を取出し、滅菌水にて洗浄後、FME ブロスに接種し 25°C で培養する方法によった。判定は agar block から菌糸の発育がみられた場合を生存 (+)、発育の認められなかった場合を死滅 (-) とした。

結 果

FME 寒天培地の検討: 筋肉を 10 倍から 200 倍までの範囲内に希釈して培地を作成した場合、菌糸の発育速度は希釈するに従ってはやく、200 倍希釈時がもっとも急速な発育を示した (表 1)。しかし、菌糸の径は希釈するに従って細くなる傾向がみられた。

そこで筋肉をさらに希釈して検討した結果 (表 2)、菌糸の発育速度は 200 倍希釈時にもっともはやく、それ以上希釈すると希釈するに従って発育速度は緩やかとなり、1600 倍希釈では微弱な発育しか示さなくなった。培養 10 日後の菌糸の径を測定した結果 (表 2)、10 倍希釈時が 12~36 μ 、100 倍希釈時が 6~12 μ 、800 倍希釈時が 5~9 μ であった。

いっぽう、ウナギ、キンギョ、コイ、ニジマスおよびアマゴの筋肉を材料として作製した培地はアユの筋肉で作製した培地と比較して菌糸の発育にほとんど差異は認められなかった。

温度の影響: 各温度での発育試験の結果 (図 1)、発育は 6 日後まで 25, 15, 37°C の順に、10 日以後は 30, 25, 15°C と温度の高い順に良好であった。しかし、5 および 37°C で培養した場合に菌糸の発育は認められなかった。そこで培養 15 日後にこれらの平板培地を 25°C に移しその生存性を検討したところ、5°C から移動した培地には菌糸の発育がみられたが、37°C から移動した培地には発育が認められず死滅したものと思われた。

いっぽう、真菌の培地上での生存期間を検討した結果 (表 3)、MG-fungus は 30°C では 20 日後に、25°C では 30 日後に、また 15°C では 35 日後に死滅した。

pH の影響: 各 pH での発育試験の結果 (表 4)、

Table 1. Changes with time in growth of MG-fungus, strain SA-7610 incubated at 25°C on FME agar media containing fish meat extract of various dilutions

表 1. 希釈の異なる魚肉エキスからなる各培地上での MG-fungus SA-7610 株の発育

Dilution of fish meat	Days after incubation		
	5	8	10
× 10	20.5 mm*	28.1 mm	33.7 mm
30	19.5	27.8	31.1
40	22.7	28.4	29.9
50	26.0	33.5	34.5
100	23.1	34.7	40.8
200	33.8	53.9	59.9

* Diameter of mycelial mat.

(Agar block of 3.5 mm in diameter with mycelia was placed at the center of the FME agar plate.)

Table 2. Changes with time in growth of MG-fungus, strain SA-2710 incubated at 25°C on FME agar media containing fish meat extract of various dilutions

表 2. 希釈の異なる魚肉エキスからなる各培地上での MG-fungus SA-7610 株の発育

Dilution of fish meat	Days after incubation			
	4	8	10	10
× 10	15.2mm*	36.1mm	40.7mm	12-36 μ **
100	26.8	61.0	73.7	6-12
200	24.2	60.8	76.0	5-13
400	20.1	50.0	63.7	4-9
800	13.6	38.8	50.2	5-9
1600	7.1	16.1	18.4	

* Diameter of mycelial mat.

** Range of diameter of hyphae.

(Agar block of 3.5 mm in diameter with mycelia was placed at the center of the FME agar plate.)

MG-fungus は pH 5 から pH 9 の範囲内で良好な発育を、また pH 10 では微弱な発育を示したが、pH 4 以下および pH 11 以上では発育がみられなかった。真菌の発育状況から pH 7~8 の範囲が発育最適 pH 域と思われた。

抗真菌作用: 各薬剤の効果を検討した結果 (表 5)、ampicillin は 1,600 ppm の高濃度でも MG-fungus の

Fig. 1. Growth curves of MG-fungus, strain SA-7610 incubated at various temperature on FME agar.
(Agar block of 3.5 mm in diameter with mycelia was placed at the center of the FME agar plate.)

図 1. 種々の温度で培養された時の MG-fungus SA-7610 株の発育

Table 3. Survival of MG-fungus, strain SA-7610 incubated at various temperature

表 3. 種々の温度で培養した時の MG-fungus SA-7610 株の生存性

Temperature	Days after incubation				
	10	20	25	30	35
15°C	+	+	+	+	—
25	+	+	+	—	
30	+	—			

(Agar block of 3.5 mm in diameter with mycelia was placed at the center of the FME agar plate.)

発育にほとんど影響を及ぼさなかったが, streptomycin は 800 ppm 以上の濃度で明らかに真菌の発育を抑制した。Chloramphenicol, malachite green, cycloheximide および NaCl の各薬剤は各々 100 ppm, 1.0 ppm, 0.4 ppm および 1% の濃度で発育を阻止した。

殺真菌作用: 抗真菌作用の成績から, cycloheximide, malachite green および NaCl の 3 剤について殺真菌作用を検討した結果(表 6), MG-fungus は cycloheximide の 10 ppm 溶液に 24 時間, malachite green の 0.5 又は 1.0 ppm 溶液に 2 時間, あるいは 2 ppm 溶液に 10 分間浸漬させることで死滅した。また本真菌は

Table 4. Effects of pH on growth of MG-fungus, strain SA-7610

表 4. MG-fungus SA-7610 株の発育に及ぼす pH の影響

pH values	Days after incubation		
	4	6	11
3	—	—	—
4	—	—	—
5	+	+	+++
6	+	+	+++
7	++	++	+++
8	++	++	+++
9	++	++	++
10	+	+	+
11	—	—	—
12	—	—	—

(Agar block of 3.5 mm in diameter with mycelia was placed at the center of the FME agar plate.)

NaCl の 2% 又は 3% 溶液に 24 時間浸漬させることでも死滅した。

論義および考察

FME 寒天培地 (畑井ら, 1977 b) は養殖アユの筋肉を 10 倍に希釈して作製した培地であるが, その希釈が

Table 5. Effects of ampicillin, streptomycin, chloramphenicol, malachite green, cycloheximide and NaCl on growth of MG-fungus, strain SA-7610

表 5. MG-fungus SA-7610 株の発育に及ぼすアンピシリン, ストレプトマイシン, クロラムフェニコール, マラカイトグリーン, シクロヘキシミドおよび食塩の影響

Chemical agents	Concentrations	Days after incubation							
		4	5	6	7	8	9	10	11
Ampicillin	1600 ppm	12.6mm*				32.5mm		37.9mm	
	800	17.4				35.0		39.0	
Streptomycin	1600	3.5				5.6		7.7	
	800	3.5				14.1		21.1	
	400	10.2				29.2		34.9	
	200	12.3				32.0		40.0	
	0	15.2				36.1		40.7	
Chloramphenicol	100 ppm	3.5mm		3.5mm					3.5mm
	50	12.6		21.0					45.3
Malachite green	1.0	3.5		3.5					3.5
	0.5	12.5		26.5					43.3
	0.25	21.1		29.4					40.2
	0	21.7		29.8					41.3
Cycloheximide	0.4 ppm			3.5mm		3.5mm			3.5mm
	0.2			4.1		8.1			22.5
	0.1			25.5		32.7			43.4
	0.05			27.8		35.0			45.8
	0			29.3		36.8			47.7
NaCl	1%		3.5mm			3.5mm		3.5mm	
	0.5		11.7			22.0		25.0	
	0.25		15.4			26.1		28.0	
	0		27.0			37.0		39.8	

* Mean colony diameter of MG-fungus (n=2).

(Agar block of 3.5 mm in diameter with mycelia was placed at the center of the FME agar plate.)

Table 6. Fungicidal effects of cycloheximide, malachite green and NaCl for MG-fungus, strain SA-7610

表 6. MG-fungus SA-7610 株の菌糸体に対するシクロヘキシミド, マラカイトグリーンおよび食塩の殺真菌作用

Chemical agents	Concentrations	Exposure time				
		10	30 min	1	2	24 hr
Cycloheximide	20 ppm	+	+	+	+	—
	10	+	+	+	+	—
	2	+	+	+	+	+
Malachite green	2	—	—	—	—	—
	1	+	+	+	—	—
	0.5	+	+	+	—	—
NaCl	3%	+	+	+	+	—
	2	+	+	+	+	—

最適であるか否かを検討した結果、200倍希釈時において菌糸の発育はもっとも急速であった。しかし、その時の菌糸の径は $5\sim 13\mu$ と極めて細く、自然発症魚の病患部内菌糸の径が $11\sim 26\mu$ (畑井ら, 1977b)であったことから推察して200倍希釈時が最適とはいい難かった。いっぽう、10倍希釈時の菌糸の径は $12\sim 36\mu$ で、自然発症魚の菌糸の径と酷似した。従って、菌糸の発育速度はやや緩慢ではあるが、10倍希釈のFME培地がMG-fungusの培養には最適と思われた。

MG-fungusの発育は用いた6種の魚種間にはほとんど差異が認められなかったが、これは本真菌の発育要因がどの魚種の筋肉内にも共通して存在するものであることを示した。この事実はFME培地はアユ以外のどの魚種の筋肉を原料として作製しても支障がないことを示しており、また真菌性肉芽腫症は種々の淡水魚に発生可能なことを示唆するといえる。

病魚から真菌を分離する際に、細菌の発育を抑制するための手段としてpenicillinおよびstreptomycinなどの抗生物質を用いるが、時に真菌の発育のみられない場合もあり、その原因が薬剤の添加量にも起因するのではないかと推察された。この点を3種類の抗生物質を用いて検討した結果、ampicillinは高濃度でもMG-fungusの発育にはほとんど影響を示さなかったのに対して、高濃度のstreptomycinおよびchloramphenicolは本真菌の発育を抑制することが明らかにされた。従って、病魚からMG-fungusを分離する際にはstreptomycinおよびchloramphenicolを培地に添加しすぎないように留意すべきである。

抗真菌作用を検討した結果、cycloheximideは供試薬剤中もっとも低い濃度で本真菌の発育を阻止したが、殺真菌作用は極めて弱いことが示された。同様のことはNaClについてもいえた。従って、これらは治療剤として不適であると推察された。

malachite greenはミズカビなどに著効を示すために繁用されるが(NELSON, 1974)、その実用濃度は通常0.5ppmである。また、malachite greenはミズカビの休眠胞子の発芽に対し0.2ppmで抑制効果を示すのに対

して(畑井ら, 1977a)、MG-fungusに対しては1.0ppmでなければ抑制効果を示さなかった。さらに、MG-fungusを短時間で殺滅させるには2ppmの濃度が必要であることも判明した。malachite greenは極めて魚毒性の強い薬剤であり(NELSON, 1974)、しかも本症は深在性真菌症である。従って、本剤により魚に影響を及ぼさずに筋肉内の真菌をも死滅させることは不可能と思われる。

以上述べたごとく、現在のところ本症の治療は極めて困難と思われるが、今後、その対策法を十分に検討する必要がある。

要 約

1. アユ筋肉を種々に希釈して作製したFME寒天上でのMG-fungusの発育は10倍希釈時が最良であった。
2. MG-fungusはFME培地作製の際、用いたどの魚種の筋肉を材料としてもほぼ同一の発育を示した。
3. MG-fungusは温度が $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ 、pHが $5\sim 9$ の範囲内で良好な発育を示した。
4. chloramphenicol, malachite green, cycloheximideおよびNaClは各々100ppm, 1.0ppm, 0.4ppmおよび1.0%の濃度でMG-fungusの発育を阻止した。
5. MG-fungusは10ppm cycloheximide溶液に24時間、0.5ppm malachite green溶液に2時間または2% NaCl溶液に24時間浸漬させることで死滅した。

文 献

- 畑井喜司雄・江草周三 (1977a): サケ科魚類稚魚の内臓真菌症に関する研究—II. アマゴ稚魚の腹腔内より分離された真菌の性状。魚病研究, 11(4), 187-193.
- 畑井喜司雄・江草周三・高橋 誓・大江孝二 (1977b): 真菌性肉芽腫症起病真菌に関する研究—I. 病アユからの真菌の分離およびその病原性。魚病研究, 12(2), 129-133.
- NELSON, N. C. (1974): A review of the literature on the use of malachite green in fisheries. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, PB 235 450, 79 pp.