連鎖球菌の検査法

——培養学的、生化学的および血清学的性状を中心として——

北尾 忠利*

The Methods for Detection of *Streptococcus* sp., Causative Bacteria
of Streptococcal Disease of Cultured Yellowtail
(*Seriola quinqueradiata*)

—Especially, Their Cultural, Biochemical and
Serological Properties—

Tadatoshi KITAO

Lab. of Microbiology, Fac. of Agr., Miyazaki Univ., Miyazaki, Japan

The comparison of the cultural, biochemical and serological properties of 286 strains of *Streptococcus* sp. isolated from streptococcal disease of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) at various parts of Japan during the period from 1974 to 1980 were investigated.

It was confirmed that these strains have been possessed a very similar characteristics according to the cultural and biochemical tests.

Although some cultural characteristics of *Str.* sp. are most similar to those of *Str. faecalis* and *Str. faecium*, *Str.* sp. are not react with group D streptococcus antiserum. Therefore, it is necessary to establish the identification method for *Str.* sp.

Str. sp. were presumptively identified by bile-esculin medium (growth in 40% bile and hydrolyze esculin), eosin-methylene blue medium (no ferment lactose), a modified NaCl medium by QADRI (no change color) and the rapid hippurate hydrolysis test by HWANG (negative reaction), and in addition, accurately identified by the slide agglutination using *Str.* sp. antiserum prepared with *Str.* sp. KG-type strain.

Besides, *Str.* sp. could be detected in pur and a high frequency from brain rather than other organs of diseased fish in our own past experience.

1974年夏、九州および四国の一部の養殖場で発生した養殖ハマチの連鎖球菌症（以下本症と呼ぶ）は、翌年には日本各地の養殖場へ蔓延し、その後流行の形態が周年発生型へ移行して来たため、養殖ハマチの疾病の中では最も大きな経済的被害の原因となっている細菌性疾病の一つである。

本症の原因菌の性状については、楠田ら（1974, 1975, 1976, 1978）、北尾ら（1975）により *Streptococcus faecalis* および *Streptococcus faecium* と近似する性状を示すが、それらと完全に一致しないため、現在のところ種の決定がなされておらず便宜的に *Streptococcus* sp.（以下 *Str.* sp. と略す）とされている。

一方、見奈美ら（1979）は、局所的に発生した養殖ハマチの病魚から、生物学的性状が *Streptococcus equisimilis* に一致する β -hemolytic *Streptococcus* の検出例を報告している。

つまり、わが国の養殖ハマチの連鎖球菌症の原因菌としては、*Str.* sp. と β -hemolytic *streptococcus* と2の種類の細菌が存在することが確認されているといえる。しかしながら、1974年以降、養殖ハマチの連鎖球菌症の病魚から分離される菌株は殆んどが *Str.* sp. で占められているのが現況であるので、*Str.* sp. にしぼって研究を行った。

ひるがえって、1974年以降最近まで日本各地で分離される *Str.* sp. の培養学的、生化学的性状ならびに血清学的性状が同一のカテゴリーに属するか否かについてそれ

* 宮崎大学農学部水産衛生学講座

Table 1. Sources of *Streptococcus* sp. used in this study

Locations	Year					Total
	1974-1976	1977	1978	1979	1980	
Kagoshima	4	9	16	60	29	118
Miyazaki	3	3	20	13	1	40
Oita			2		2	4
Kumamoto			3		2	5
Nagasaki	6	20	27	12	3	68
Yamaguchi				1		1
Ehime			3	5		8
Tokushima		11	15	14		40
Mie	2					2
Total	15	43	86	105	37	286

Table 2. Comparison of biochemical characteristics of *Streptococcus* sp. isolated from yellowtails during 1974-1980

Characteristics	Year (No. of strain)						<i>S. faecalis</i> ATCC 19433	<i>S. faecium</i> ATCC 19434
	1974-1976 (15)	1977 (43)	1978 (86)	1979 (105)	1980 (37)	Total (286) (%)		
Growth at: 10°C	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	+	+	+	+	+	+	+	+
6.5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 9.6	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth after 60°C, 30 min.	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on 40% Bile agar	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-
Methylene blue milk	+	+	+	+	+	+	+	+
Litmus milk	RA	RA	RA	RA	RA	RA	RAC	RAC
Hydrolysis of Hippurate	-	-	-	-	-	-	+	+
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	{+85 - 1	{+100 - 5	+	{+97.9 - 2.1	+	+
Citrate utilization	-	{-37 + 6	{-69 +17	-	{-35 + 2	{-91.3 + 8.7	+	-
VP test	{+ 3 -12	{+39 - 4	{+75 -11	+	+	{+90.6 - 9.4	+	+
Fermentation of:								
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	+
Glycerin	-	-	-	-	-	-	+	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	+	+
Mannitol	+	{+42 - 1	+	+	+	{+99.7 - 0.3	+	+
Laffinose	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	{+102 - 3	+	{+99.0 - 1.0	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	+	-
Sucrose	-	-	-	{-102 + 3	-	{-99.0 + 1.0	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+
Agglutination test								
Anti-NGT7754(KG ⁻)	+	+	+	+	+	+	-	-

RA : Positive of nitrate reduction and acid production.

RAC: Positive of nitrate reduction, acid production and coagulation.

らの諸性状を明らかにしておくことは、*Str. sp.* の同定試験を行なうに際して最も重要なことであるにもかかわらず、残念ながら詳細な比較研究が行われていない。そこで著者は、1974年以降の教室保存の菌株を用いて、分離年次毎および地域毎の比較ならびに血清学的同定試験に必要である血清学的性状について、*Str. sp.* の同定上の観点から研究を行ったので報告する。

1. 培養学的ならびに生化学的性状の比較検討

供試菌株としては表1に示すとおり、1974年から1980年にかけて鹿児島、宮崎、大分、熊本、長崎、山口、愛媛、徳島および三重の各地から蒐集し、教室に保存中の *Str. sp.* を使用した。対照菌株として American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, U.S.A.) から取寄せた *Str. faecalis* ATCC 19433 および *Str. faecium* ATCC 19434 を用いた。

10°C および 45°C における発育、6.5% NaCl 加培地における発育、pH 9.6 に調節した培地における発育試験には、0.5% ブドウ糖加ハートインヒュージョンブイヨン (HI) (ニッスイ) を使用し、40% 胆汁加培地における発育およびエスクリンの加水分解能の有無の試験には、Bile-esculin agar (Difco) を斜面培地として使用した。馬尿酸塩加水分解能試験には、菌を接種後2時間以内で判定できる HWANG ら (1975) の方法を用いた。その他の性状試験はすべて医学細菌同定の手引き (1974) に記載された方法に従って実施した。各種の糖分解能試験は、糖分解用半流動培地 (栄研) にそれぞれの糖を 1% の割合に添加したものをを用いた。培養温度は特別の場合を除きすべて 30°C とし、培養時間は各試験項目に応じて 1~7 日間後に判定した。

すなわち、FACKLAM ら (1970, 1973) や DONNELLY ら (1978) が述べているように、10°C, 45°C, 6.5% NaCl, pH 9.6 および 40% 胆汁培地における発育、エスクリン加水分解能陽性など D 群連鎖球菌の基本的性状については供試菌株間に差異は認められなかったが、アルギニン加水分解試験では、1978年分離株 86 株中 1 株と 1979年分離株 105 株中 5 株に陰性反応を示すものがあり、クエン酸塩利用能試験においては、1977年分離株 43 株中 6 株、1978年分離株 86 株中 17 株、1980年分離株 37 株中 2 株に陽性反応を呈するものがあり、VP 試験においては、1974~1976年分離株 15 株中 12 株、1977年分離株 43 株中 4 株、1978年分離株 86 株中 11 株に陰性反応を示すものがあった。糖分解能試験では、アラビノース、グリセリン、ラクトース、ラフィノース、ソルビ

ットはすべて分解せず、トレハロースはすべて陽性であったが、1977年分離株 43 株中 1 株がマンニット陰性であり、1979年分離株 105 株中 3 株がサリシン陰性、ソルビット陽性が 3 株認められた。これらの成績は表2に示すとおりであり、総体的には 90% 以上の適合率を示すことから年次別には大差はないと考えられる所見が得られた。

又、分離された地域別に培養学的および生化学的性状に差異があるかをしらべた結果は表3に示すとおりである。供試菌株数の比較的多かった鹿児島、長崎、宮崎および徳島で分離された菌株間に若干の差異が認められた。すなわち、宮崎で分離された菌株中にクエン酸塩利用能および VP 試験で差異が認められ、長崎で分離された菌株中に VP 試験で差異がみられたが、これらの不一致株を別のカテゴリーの生物型とするよりは、むしろ同一種と取扱った方が妥当と考えている。

2. *Str. sp.* の検索法

Str. sp. の感染に起因するハマチ病魚であれば、体表特に尾柄部ならびに鰓蓋内側の膿瘍形成部および内臓諸器官より本菌が容易に検出されるが、特に脳からは高濃度に且つ純粋に本菌が検出されることが多いので、検体としては最も適当な材料と考えている。

Str. sp. の検査法としては、既に魚類等防疫指針 3 (1979) の病原細菌鑑別法の項目に記載されているが、われわれの教室で考案した検索法を図1に示してみた。

(1) 塗沫標本による顕微鏡的検査法

本症の特徴的病変部である尾柄部および鰓蓋内側などの膿瘍形成部位、心臓病変部、脳ならびに腎臓などからスライドグラスに塗沫標本を作り常法に従ってグラム染色標本を作成する。いずれの染色標本からも *Str. sp.* を見出すことができるが、観察が容易である点からいえば、脳の塗沫標本が最も良好である。腎臓塗沫標本では色素顆粒が出現して判別が困難な場合が多い。液体培地で培養した菌体は長い連鎖状を呈するが、生体から直接作成した標本中では本菌は単在もしくは 2 連鎖のグラム陽性の球菌として観察されることが多い。

(2) 培養学的検索法

培養学的検索法としては、増菌培養法と直接分離培養法があるが、状況に応じて適宜両法を併用すると検出率が高められる。

i) 増菌培養法

海水など本菌の存在が少ないと考えられる材料については、増菌培養法を併用すると検出率を高めることがで

Table 3. Comparison of biochemical characteristics of *Streptococcus* sp. isolated from yellowtails in various areas

Characteristics	Location (No. of strain)								
	Kagoshima (118)	Miyazaki (40)	Oita (4)	Kumamoto (5)	Nagasaki (68)	Yamaguchi (1)	Ehime (8)	Tokushima (40)	Mie (2)
Growth at: 10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6.5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 9.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth after: 60°C, 30 min.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Growth on 40% Bile agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Methylene blue milk	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Litmus milk	RA	RA	RA	RA	RA	RA	RA	RA	RA
Hydrolysis of Hippurate	—	—	—	—	—	—	—	+	+
Esuculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine	{ +116 — 2	+	+	{ +4 — 1	{ +65 — 3	+	+	+	+
Citrate utilization	{ — 116 + 2	{ — 27 + 13	—	—	{ — 64 + 4	—	—	{ — 34 + 6	—
VP test	{ +116 — 2	{ +30 — 10	+	+	{ +58 — 10	+	+	{ +37 — 3	—
Fermentation of:									
Arabinose	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Glycerin	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lactose	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Mannitol	+	+	+	+	{ +67 — 1	+	+	+	+
Laffinose	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Salicin	{ +117 — 1	{ +39 — 1	+	+	{ +67 — 1	+	+	+	+
Sorbitol	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sucrose	{ — 115 + 3	—	—	—	—	—	—	—	—
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+

RA : Positive of nitrate reduction and acid production.

RAC: Positive of nitrate reduction, acid production and coagulation.

Microscopic examination

Brain, Kidney etc. of diseased fish
 ↓
 Smear
 ↓
 Gram staining
 ↓
 Gram positive cocci

Cultural examination

Fig. 1. Detection method of *Streptococcus* sp.

きる。特に海水より本菌を検出する場合には、海水を直接増菌培地に接種するよりも、北尾ら (1979) が報告しているようにメンブランフィルター (Millipore Filter Corporation) による集菌法を応用すると検出効率がよい。増菌培地としては、0.025% 窒化ナトリウム加チオグリコレート培地を使用し、30°C で 48 時間培養後分離培養する。

ii) 分離培養法

顕微鏡の検査に供した検体や増菌培地から平板培地に画線培養する。

a. 選択培地を用いた分離培養法: *Str. sp.* は、*Str. faecium* と異なり、*Str. faecalis* と同様に 2, 3, 5-Triphenyl-tetrazolium Chloride (TTC) を還元する能力をもっているため、EF 寒天培地 (ニッスイ) に画線塗抹したのち、30°C で 36~48 時間培養すると濃赤色のコロニーを形成する。ちなみに、*Str. faecium* は TTC を還元しないので黄色のコロニーを形成する。ただ、市販の EF 寒天培地の処方どおりに TTC を添加すると発育抑制が強いので、規定量の 50~70% を添加すると良好な発育がみられる。

b. 非選択培地を用いた分離培養法: EF 寒天培地上の濃赤色コロニーからの純培養ならびに病魚の脳や腎臓などより直接分離培養する場合には、0.5% ブドウ糖加

HI 寒天培地が適当である。病魚から *Str. sp.* を分離する場合には、脳材料を用いると通常純培養状に分離されるので、強いて選択培地を使用しなくてもよい。30°C で 16~20 時間培養すると、不透明の乳白色のコロニーが出現し、熟達するとコロニーの色調と形状から大体の判別ができるようになる。

iii) 確認培養試験

0.5% ブドウ糖加 HI 寒天培地に純培養した菌を用いて、グラム陽性の球菌で、カタラーゼ反応陰性であることを確めたのち、Bile-esculin agar 斜面培地に接種すると、40% 胆汁中で発育し、エスクリンを加水分解するため培地は黒褐色となる。更に QADRI ら (1978) が D 群連鎖球菌から腸球菌を区分するために開発した迅速食塩耐容 (6.5% NaCl) 試験培地に接種すると、*Str. faecalis* と *Str. faecium* は 24 時間以内で黄色に変化するが、*Str. sp.* は変色せずに紫色のままに留まる。乳糖分解性は *Str. faecalis* と *Str. faecium* は陽性であるが、*Str. sp.* は陰性である。この試験には市販の EMB 寒天培地を用いると判定が容易である。

3. *Str. sp.* の血清学的性状

(1) *Str. sp.* KG 7409 抗血清の特異性に関する試験
 1974 年鹿児島県下で流行した本症の病魚から分離し

Fig. 4. Agglutination against antiserum of *Streptococcus* sp. KG7409

Antigens	Dilution								Cont.
	1: 20	1: 40	1: 80	1: 160	1: 320	1: 640	1: 1280	1: 2560	
<i>Streptococcus</i> sp. KG7409	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
<i>Streptococcus</i> sp. EH7573	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 19433	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus faecalis</i> 21A*	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus faecalis</i> 26A*	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus faecium</i> ATCC 19434	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus faecium</i> M235*	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus faecium</i> M302*	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus faecium</i> M304B*	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus durans</i> T72*	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* These strains were supplied by Prof., Dr. H. HASHIMOTO, Hiroshima Univ.

た *Str.* sp. KG 7409 を免疫原として、細菌学実習提要 (1976) の免疫方法に従ってウサギ抗血清を作成した。すなわち、*Str.* sp. KG 7409 を 0.5% ブドウ糖加 Todd-Hewitt Broth (Difco) に接種し、30°C で 18 時間培養したのち、60°C で 30 分間加熱した菌液を型の如くウサギの耳静脈内に接種し、最終回の接種後 7 日目に試験採血して抗体価の上昇を確認したのち、翌日心臓穿刺法により全採血し血清を分離し非働化したのち使用時まで -80°C に保存した。

この *Str.* sp. KG 7409 抗血清の特異性をしらべる目的で定量凝集反応を行った。*Str.* sp. KG 7409, *Str.* sp. EH 7573, *Str. faecalis* ATCC 19433, *Str. faecium* ATCC 19434 および広島大学、橋本秀夫教授より分与を受けた *Str. faecalis* 21A と 26A, *Str. faecium* M 235, M 302 と M 304 B, *Str. durans* T 72 の各株を 0.5% ブドウ糖加 Todd-Hewitt Broth に接種し、30°C で 18 時間培養したのち、0.3% の割合にホルマリンを加えて殺菌し、滅菌生理食塩水を用いて遠心操作により 3 回洗浄した沈渣を、MacFarland No. 3 の濃度に再浮遊させたものを凝集反応用抗原として使用した。定法のとおりに、試験管法により抗体価を測定した。すなわち、表 4 に示すように、ホモの *Str.* sp. KG 7409 ならびに *Str.* sp. EH 7573 に対しては、1: 1280 と 1: 640 の抗体価を示したが、D 群連鎖球菌として供試した *Str. faecalis* の 3 株、*Str. faecium* の 4 株および *Str. durans* 1 株に対してはすべて 1: 20 以下であり、*Str.* sp. の抗原構造は特異的であり、診断用抗血清としてスライド凝集反応に利用できることが立証され、以後の血清学的最終同定に應用した。

Table 5. Distribution of KG⁻ type strains among *Streptococcus* sp.

Locations	Year			Total
	1977	1978	1979	
Ehime		0/3	0/5	0/8
Kagoshima	3/9	7/22	22/42	32/73
Kumamoto		0/7		0/7
Mie		0/2		0/2
Miyazaki	0/6	13/36	3/13	16/50
Nagasaki	9/33	19/41	3/14	31/88
Oita	0/6	2/4		2/10
Tokushima	0/13	7/15	4/14	11/42
Yamaguchi			0/3	0/3
Total	12/67	48/130	32/91	92/288

Note: Denominators indicate number of strains tested and numerators indicate number of KG⁻ type strains.

(2) *Str.* sp. KG 7409 抗血清に非凝集性菌株 (KG⁻ タイプ) の出現

1974 年から 1976 年前半にかけて日本各地の養殖ハマチから分離される連鎖球菌はすべて KG 7409 抗血清に対して凝集を示す *Str.* sp. であったが、1977 年頃から形態学的、培養学的および生化学的諸性状は、従来の *Str.* sp. と全く同一の性状を呈するにもかかわらず、KG 7409 抗血清に凝集しない菌株が出現しはじめて来た。そこで、われわれは KG 7409 抗血清に凝集しない *Str.* sp. を KG⁻ タイプと呼び、KG 7409 抗血清に凝集する *Str.* sp. を KG⁺ タイプと呼んで区別することにした。

それでは実際にどの程度の割合で KG⁻ タイプが存在するのかを確かめるため、教室でストック中の 1977 年

Table 6. Antigenic analysis between KG⁻ type and KG⁺ type *Streptococcus* sp. by absorption test

Antigens	Antisera					
	NGT7754 Antiserum (KG ⁻)			KG7409 Antiserum (KG ⁺)		
	Unabsorbed	Absorbed with		Unabsorbed	Absorbed with	
		NGT7754	KG7409		NGT7754	KG7409
<i>Streptococcus</i> sp. NGT7754 (KG ⁻)	+	-	+	-	-	-
<i>Streptococcus</i> sp. KG7409 (KG ⁺)	+	-	-	+	-	-

Table 7. Effect of concentration of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) on the variation to KG⁺ type from KG⁻ type

Strains	Concentration of TTC	0.00375%		0.0075%		0.015%		0.03%	
	No. of passage	once	twice	once	twice	once	twice	once	twice
NGT7754 (KG ⁻)		-	-	-	-	-	+	+	+
NGT7810 (KG ⁻)		-	-	-	-	-	+	+	+
NGT7811 (KG ⁻)		-	-	-	-	-	+	+	+
NGT7813 (KG ⁻)		-	-	-	-	-	+	+	+
KGB7802 (KG ⁻)		-	-	-	-	-	+	+	+
KGB7804 (KG ⁻)		-	-	-	-	-	+	+	+
KGB7805 (KG ⁻)		-	-	-	-	-	+	+	+

-; not agglutinate against antiserum of KG⁺ type.

++; agglutinate against antiserum of KG⁺ type.

から 1979 年までに日本各地で分離された *Str.* sp. 288 株についてしらべた成績は表 5 に示すとおりである。愛媛、熊本、三重および山口の各県で分離された菌株はいずれも KG⁻ タイプの菌株は含まれていなかったが、その他の県で分離された菌株中には、頻度の差はあるが KG⁻ タイプが含まれていた。年次別の KG⁻ タイプの菌株の割合は、1977 年は 67 株中 12 株 (17.9%)、1978 年は 130 株中 48 株 (36.9%)、そして 1979 年は 91 株中 32 株 (35.2%) であった。

(3) KG⁻ タイプと KG⁺ タイプの抗原的関係の解析

KG⁻ タイプの代表菌株として、*Str.* sp. NGT 7754 を用い、前述の連鎖球菌抗血清の作成方法と同様にして作成した NGT 7754 抗血清 (KG⁻ 抗血清) と既存の KG 7409 抗血清 (KG⁺ 抗血清) の両者を用い、常法に従って交差吸収試験により抗原構造を解析した。その結果は表 6 に示すとおりであり、未吸収の KG⁺ 抗血清 (KG 7409 抗血清) には KG⁻ 菌株 (NGT 7754) は凝集しないが、未吸収の KG⁺ 抗血清には、KG⁻ 菌株は勿論のこと KG⁺ 菌株も凝集する。交差吸収試験の結果から判る

ように、KG⁻ 抗血清を KG⁺ 菌株で吸収した上清には、KG⁻ 抗原と反応する抗体が残存することから、KG⁻ タイプの抗原構造は KG⁺ タイプの抗原と特異的なタイプの抗原の両方を併有していることが判明した。更に KG⁻ タイプの菌株が KG⁺ 抗血清に凝集しないのは、KG⁻ タイプの特異的抗原物質が KG⁺ 抗血清に被凝集性阻的に作用しているためと考えられた。

(4) KG⁻ タイプから KG⁺ タイプへの抗原変異

KG⁻ タイプの抗原的特異性は、普通寒天培地で保存中若しくは継代培養を繰返すことによっても KG⁺ タイプ (KG⁺ 抗血清に凝集するようになる) へ変異することが判明した。更にこの KG⁻ タイプから KG⁺ タイプへの変異は、EF 寒天培地を通過させると比較的容易に変異がおこることが証明された。そこで、EF 寒天培地中のどの成分がその変異誘発に関連しているかを予備的に検討したところ、TTC が関与していることが判った。すなわち、HI 寒天培地を基礎培地として、TTC を 0.00375%、0.0075%、0.015% および 0.03% の割合になるように添加し、TTC の変異誘発の影響をしらべた。そ

Table 8. Precipitation test against *Streptococci* group-antiserum

Antigens*	Group-antisera												
	A	B	C	D	E	F	G	H	K	L	N	O	MG
<i>Streptococcus</i> sp. KG 7409 (KG ⁺)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus</i> sp. KGB7802 (KG ⁺)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus</i> sp. MZS7801 (KG ⁺)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus</i> sp. NGT7754 (KG ⁺)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus</i> sp. KGB7802 (KG ⁻)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus</i> sp. MZS7801 (KG ⁻)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus</i> sp. NGT7754 (KG ⁻)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 19433	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus faecium</i> ATCC 19434	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* Antigens were prepared by three extract methods; Autoclave method, HCl-Alcohol method & Hot-HCl method.

の結果は表7に示すとおりで、0.015% 含有培地を1代通過させた場合には変異は起こらないが、同一濃度の培地を2代通過させると供試KG⁻タイプの7株ともKG⁺タイプへ変異し、0.03% 含有培地では1代通過のみでKG⁺タイプへ変異した。0.0075% 以下のTTC含有培地では2代継代では変異が認められなかった。

次いで、KG⁻タイプの菌株を物理的および化学的処理を施した場合、KG⁺タイプへ変異するか否かをしらべた。すなわち、オートクレープで121°C、15分間加熱処理する方法、菌体を1/5 N・HClを含む生理食塩水中に懸濁し10分間煮沸処理する方法、菌体を2%デオキシコール酸ナトリウム(SDC)を含む生理食塩水に懸濁し、37°Cで60分間処理する方法、菌体を2%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含む生理食塩水に懸濁し、37°Cで60分間処理したのち、更に10%トリクロール酢酸(TCA)を含む生理食塩水に再懸濁させ90°Cで10分間処理する方法、菌体を1%トリブシン(Difco, 1:250)を含むpH 8.0生理食塩水に懸濁し、37°Cで1夜処理する方法、菌体を2%SDSで処理したのち、更に1%トリブシン液で処理する方法の7つの方法を用いてKG⁻タイプ菌株を処理したが、KG⁺抗血清に凝集するようにはならなかった。

(5) KG⁻タイプの菌体を抗原として既知の連鎖球菌群血清に対する沈降反応試験

前述の*Str. sp.*の血清学的性状試験の結果から、KG⁺タイプはKG⁻タイプの特異的抗原物質の脱落型と考えられる成績が得られた。すなわち、*Str. sp.*が既知の連鎖球菌群血清と反応を示さなかったのは、KG⁺タイプの菌株を用いて作成した抗原を用いたためとも考えられたので、改めてKG⁻タイプの菌株で作成した抗原を用いて既知のA, B, C, D, E, F, G, M, K, L, N, OおよびMGの群血清(Difco製およびWelcome製)との間で沈降反応を行なった。沈降反応用抗原は、KG⁻タイプの菌株(原株)とその菌株をEF寒天培地を通過させて完全にKG⁺タイプへ変異させた菌株(変異株)を用い、RANTZとRANDALL(1955)のオートクレープ法、FULLER(1938)の酸アルコール法、およびLANCEFIELD(1933)の熱塩酸法の各抽出法でそれぞれの菌株の抽出抗原を作成した。その結果は表8に示すとおりであり、KG⁺株は勿論のことKG⁻株で作成した抗原に対しても供試群血清との間に沈降反応は認められず、少なくともA~MGの13種の群血清には適合しない別のタイプであることが再確認された。なお、対照として同時に供試した*Str. faecalis* ATCC 19433と*Str. faecium* ATCC 19434はD群血清に明瞭な陽性反応が観察された。

ま と め

1974年から1980年までの間に日本各地から蒐集した総計286株の *Str. sp.* について培養学的および生化学的諸性状を比較検討したところ、検出年次、検出場所により若干の差異はみられたが、現在わが国の養殖ハマチの連鎖球菌症の原因菌は同一のカテゴリーに属するものと判断された。

Str. sp. の検索にあたって、病魚からの検出は脳材料が最も適当であり更に Bile-esculin agar, QADRI ら (1978) が開発した迅速食塩耐性試験培地や EMB 培地の使用と馬尿酸塩の加水分解試験は本菌の同定に有用である。

Str. sp. は抗原変異から KG^- タイプと KG^+ タイプに区別されるが本質的には同一の血清型と考えられ、表2に示したように1974年以降1980年までの間に得られた286株すべてが KG^- タイプ (NGT 7754) の抗血清に凝集を示したことから、現在わが国で流行している *Str. sp.* の血清型は一つと考えるのが妥当であり、 KG^- タイプの抗血清を常備しておけば、スライド凝集反応によって最終的な血清学的な確定診断が可能であることが判明した。

KG^- タイプの特異的抗原性状は継代により容易に KG^+ タイプへ変異するので、分離後継代を重ねることなく Todd-Hewitt Broth に接種培養し、 $-80^\circ C$ で凍結保存すると比較的 KG^- の性状を保持することができることを付記しておく。

いずれにしても、*Str. sp.* に見出された KG^- タイプと KG^+ タイプの病原学および疫学的意義については別の機会に報告したい。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費補助金によって行なわれたことを記して謝意を表します。また本研究に使用した菌株を分与いただいた広島大学橋本秀夫教授ならびに関係水産試験場の方々に厚く御礼を申しあげる。

文 献

DONNELLY, L. S. and P. A. HARTMAN (1978): Gentamicin-based medium for the isolation of group D streptococci and application of the medium to water analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 576-581.

FACKLAM, R. (1973): Comparison of several laboratory media for presumptive identification of enterococci and group D streptococci. *Appl. Microbiol.*, **26**, 138-145.

FACKLAM, R. and M. MOODY (1970): Presumptive identification of group D streptococci: the bile-esculin test. *ibid.*, **20**, 245-250.

FULLER, A. T. (1938): The formamid method for the extraction of polysaccharides for hemolytic streptococci. *Br. J. Exp. Pathol.*, **19**, 130-139.

HWANG, M.-N. and G. M. EDERER (1975): Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.*, **1**, 114-115.

医科学研究所学会編 (1976): 「改訂5版細菌学実習提要」丸善, 東京, pp. 207-215.

北尾忠利・木村正雄・安田公昭・森直郎・上田忠男・岩田一夫 (1975): ハマチレンサ球菌感染症原因菌の分類学的考察について, 昭和50年度日本水産学会春季大会講演要旨, p. 57.

北尾忠利・青木 宙・岩田一夫 (1979): ハマチ連鎖球菌症の疫学的研究—I. ハマチ養殖場における海水・海泥中の *Streptococcus sp.* の分布, 日水誌, **45**, 567-572.

楠田理一 (1979): 「魚類等防疫指針・3」, 水産庁編, 東京, p. 79.

楠田理一・川合研児・豊嶋利雄 (1974): 養殖ハマチの細菌性眼球突出症 (仮称) に関する研究—I. 病原菌の性状について, 昭和49年度日本水産学会秋季大会講演要旨, p. 7.

楠田理一・小松 功・豊嶋利雄 (1975): 魚類の病原性連鎖球菌に関する研究—I. 各種病魚から分離された *Streptococcus* 属細菌の同定, 昭和50年度日本水産学会春季大会講演要旨, p. 56.

楠田理一・川合研児・豊嶋利雄・小松 功 (1976): 養殖ハマチから分離された *Streptococcus* 属の新魚病細菌について, 日水誌, **42**, 1345-1352.

楠田理一・小松 功 (1978): 各種病魚から分離された *Streptococcus* 属細菌の比較研究, 同誌, **44**, 1073-1078.

LANCEFIELD, R. C. (1933): A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.*, **57**, 571-595.

見奈美輝彦・中村正夫・池田弥生・尾崎久雄 (1979): 養殖ハマチから分離された β 溶血レンサ球菌, 本誌, **14**, 33-38.

RANTZ, L. A. and E. RANDALL (1955): Use of autoclaved extracts of hemolytic streptococci for serological grouping. *Stanford Med. Bull.*, **13**, 290-291.

坂崎利一 (1974): 「医学細菌同定の手びき」, 近代出版, 東京, pp. 188-261.

質 疑 応 答

【問】 楠田理一(高知大農): 選択培地に EF 培地を用いる場合に TTC を減量したら, 他の菌の発育を阻止できないのではないのでしょうか。

【答】 検討はしていない。他の菌の発育阻止と TTC の量は関係ないと思います。

【問】 若林久嗣(東大農): KG 抗原において中の露出したものが出てきておりそれは何なのか。

【答】 KG には +, - 両方持ったものがあり, KG⁻ から KG⁺ になったのは, KG⁻ 抗原が脱落したタイプではないかと思う。

【問】 谷口道子(高知内水面): 海水から菌を分離する場合の方法として, プランクトンに付着するような状態

で存在していると考えられるのでいきなり 0.1 μ でプランクトン区をろ過すると, このメンブレン上に連球菌も止どめられることが心配されるので前処理として振盪などの方法によってプランクトンと細菌とを遊離させることが必要ではないか。

【答】 おっしゃる通りです。バクテリアは海の中で浮いているわけではない。これは連球菌に限らず, ビブリオにおいてもそうですが必ずプランクトンをしらべると菌がたくさん出てくる。そういうことも考えて 1.2 μ の大きなフィルターと 0.4 μ の小さなフィルターの 2 枚を, ダブルメンブレンとして使ったわけです。30°C で 48 時間培養するので, 当然, プランクトンは破壊するので振盪の必要はないと考えている。