養殖アユから分離された病原性 *Pasteurella* 菌の性状について

楠田 理一・三浦 航*

(昭和 47 年 8 月 2 日受理)

1971 年 5 月下旬から 7 月上旬にかけて、徳島県下のアユ養殖池において、アユの肝臓に白斑のできる疾病が発生し、大きな被害が生じた。原因について調査したところ、復元性のある菌が分離できた。ここでは、分離菌の形態学的、生化学的ならびに生物学的性状を調べ、分類学的位置について検討したので報告する。

材料および方法

実験に供した病魚は徳島県阿南市羽ノ浦の養殖池において、1971 年 6 月 10 日に発病した体長約 15 cm のアユ 10 尾である。

病魚の外観症状は眼球内の出血と眼球の突出、肝門の拡張と周辺部の発赤、黄色粘液便の放出、鰓の出血などがみられる。また、鰓や腹部に発赤が認められるものや、腹部の膨満したものも存在した。解剖的には腹水の貯溜しているものが多く、腹膜の出血、腸管の炎症や粘膜剥離による黄色粘液様物の充満などが認められる。また、脾臓や肝臓には腫脹と出血斑がみられる。肝臓は灰黄色に退色しており、斑紋状の白斑が形成されたものが多い。このような肝臓の白斑形成が、本病の最も特徴的な症状である (図版 1)。

病魚の肝臓白斑部と腎臓血液から分離した菌のうち、復元性を確かめた TA-II L 株と、その際に再分離された W-1 株を性状検査に供した。

分離菌の形態や生化学的性状は市販 (栄研) のブレインハートインフュージョン (BHI) 寒天培地に 25°C、20~24 時間培養した菌を用い、常法にしたがって検査した。なお、食塩耐容性、発育温度範囲および発育 pH 域の検査にはブイヨン培地 (Bacto-peptone (Difco) 0.5%, Proteose Peptone No. 3 (Difco) 0.5%, Beef extract 0.3%, Yeast extract 0.3%, Glucose 0.1%, K₂HPO₄ 0.5%) を用いた。

分離菌の薬剤に対する感受性については BHI 寒天斜面培地に 25°C、20 時間培養した菌を滅菌生理的食塩水に湿菌量で 1 mg/ml になるように懸濁させた。その 1 滴を BHI 寒天平板上にひろげ、その上に感受性ディスクをのせ、25°C で 24 時間後に発育阻止円をはかり、最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。

結 果

供試菌 2 株の形態学的性状は表 1 に示すとおりで、いずれも同様の性状を示した。大きさは通常 1.0~3.0×0.3~0.5 μ の両端鈍円の短桿菌で多少、わん曲あるいは S 字型の形態を示す (図版 2)。また、両極染色性がみられる。グラム陰性で、運動性はなく、非抗酸性である。

BHI 寒天平板上のコロニーは 25°C、24 時間培養では直径 1 mm 以下の点状のやや隆起した表面円滑な周縁無構造の透明微小集落である。培養の継続によって大きさは 2 mm 前後まで成長し、形は正円になり、不透明となる。液体培地における発育は普通の培地では発育が悪いが、栄養豊富な培地では適度に発育して一様に混濁する。しかし、沈澱はみられない。また、菌膜は形成しない。血液寒天上では BHI 寒天平板上におけるコロニーと同様であるが、培養 4 日後には β 型の溶血環を形成する。

分離菌の生化学的性状は表 2 に示すとおりである。すなわち、ゼラチン液化性、インドール産生性、アンモニア産生性、H₂S 産生性、VP 反応および MR 試験はいずれも陰性である。リトマスミルクから微酸を

* 高知大学農学部栽培漁業学教室

表 1. 分離菌の形態学的性状
Table 1. Morphological characteristics of the isolates

Characteristics	Strain (TA-II L, W-1)
Cell form	short rods, slightly curved or sigmoid, round ended, stained bipolar, occurring singly
Size	1.0~3.0×0.3~0.5 μ
Gram	negative
Motility	negative
Flagella	non
Acid fast	negative
Agar colonies	circular but punctiform in early stage, slightly raised, entire, opaque but transparent in early stage
Blood agar	same as agar colonies, hemolysis
Broth culture	scanty on nutrient broth, but on enriched broth moderate, no pellicle, no sediments

產生するが、凝固はみられない。硝酸塩還元性は微陽性である。アミノ酸を脱炭酸せず、炭素源としてクエン酸塩を利用しない。カタラーゼとオキシダーゼ試験は陽性で、ウレアーゼ試験は陰性である。HUGH-LEIFSON 培地における糖の代謝形式は酵素的である。

各種の炭水化物分解性は表 3 に示すとおりである。すなわち、グルコース、フラクトース、ガラクトース、サッカロース、マルトース、デキストリンを分解して酸を產生するが、ガスの発生はない。セロビオースからは培養 7 日後に微酸の產生がみられ、サリシンからは培養 10 日後に微酸の產生が認められる。また、アラビノース、キシロース、ラムノース、マンノース、ラクトース、トレハロース、メリビオース、ラフィノース、メレジトース、スターチ、グリコーゲン、イヌリン、グリセロール、エリトリット、アドニット、マンニット、ズルシット、ソルビット、エスクリンおよびイノシットは分解しない。

分離菌の生物学的性状は表 4 に示すとおりである。分離菌は MACCONKEY 培地、遠藤培地ならびに荒川変法培地に発育する。しかし、SS 寒天培地、WA 寒天培地および BTB ティポール寒天培地には発育しない。

分離菌の発育適温は 13~18°C にあり、12°C 以下と 30°C 以上では発育しない。発育可能な pH 域は 6.0~9.2 で、6.4~7.0 の間で最もよく発育する。また、発育可能な食塩濃度は 0~5.0% で、0~3.5% の間で最もよく発育する。

分離菌の薬剤に対する感受性は表 5 に示すとおりである。すなわち、テトラサイクリンに対して最も強い感受性を示し、ついでオキシテトラサイクリン、ノボビオシン、クロラムフェニコール、ナリジキシクアシッド、エリスロマイシン、チアンフェニコールの順になる。サルファ剤に対しては、すべて耐性であった。

考 察

分離菌の分類学的位置は BERGEY's manual¹⁾ や COWAN & STEEL²⁾ などの記載と比較検討した結果、*Pasteurella* 属に属させるのが最も妥当であると思われる。すなわち、BERGEY's manual では *Pasteurella* 属をつぎのように定義している。“短桿ないしは長桿菌で、両極染色性を示し、運動性または非運動性である。グラム陰性、ゼラチン非液化性で、ミルクを凝固しない。炭水化物を酵素的に分解するが、ガスは產生しない。好気性または通性嫌気性である。” また、COWAN & STEEL は *Pasteurella* 属を 2 群にわけて、つぎのように定義している。“Yersinia 群: グラム陰性桿菌、運動性または非運動性。カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性。通性嫌気性、糖を酵素的に分解する。ガスを產生しない。サッカロースを分解しない。MACCONKEY の寒天で発育する。Multocida 群: グラム陰性桿菌、非運動性。カタラーゼ陽性、オキシダ

表 2. 分離菌の生化学的性状

Table 2. Biochemical characteristics of the isolates

Characteristics	Strain	
	TA-II L	W-1
Gelatin liquefaction	—	—
Loeffler's serum digestion	—	—
Litmus milk	(A)	(A)
Esculin hydrolysis	—	—
Indole production (SIM)	—	—
H ₂ S production (SIM)	—	—
Nitrate reduction	(+)	(+)
Ammonium production	—	—
VP reaction	—	—
MR test	—	—
MB reduction	+	+
Arginine hydrolysis	—	—
Lysine decarboxylase	—	—
Arginine decarboxylase	—	—
Ornithine decarboxylase	—	—
2,3-butanediol dehydrogenase	—	—
Phenylalanine deaminase	—	—
Tryptophane deaminase (SIM)	—	—
Gluconate oxidation	—	—
Citrate utilization (SIMMONS)	—	—
Malonate utilization	—	—
D-tartrate utilization (K-P)	—	—
Mucate utilization (K-P)	—	—
Citrate utilization (K-P)	—	—
Urease	—	—
Catalase	+	+
KOVAC's oxidase	+	+
Cytchrome oxidase	+	+
HUGH-LEIFSON's test	F	F
Gas production from carbohydrate	—	—
KCN test	—	—
Hemolysis	+(β)	+(β)

A: acid, F: fermentation, (): weakley

表 3. 分離菌の炭水化物分解性

Table 3. Acid production from carbohydrate of the isolates

Carbohydrate	Strain	
	TA-II L	W-1
Glucose	+	+
Arabinose	—	—
Xylose	—	—
Rhamnose	—	—
Fructose	+	+
Mannose	—	—
Galactose	+	+
Saccharose	+	+
Lactose	—	—
Maltose	+	+
Trehalose	—	—
Cellobiose	(+)	(+)
Melibiose	—	—
Raffinose	—	—
Melezitose	—	—
Starch	—	—
Dextrin	+	+
Glycogen	—	—
Inulin	—	—
Glycerol	—	—
Erythritol	—	—
Adonitol	—	—
Mannitol	—	—
Dulcitol	—	—
Sorbitol	—	—
Salicin	(+)	(+)
Esculin	—	—
Inositol	—	—

(): weekly

一ゼ陽性または陰性。通性嫌気性，糖を発酵的に分解，サッカロースを発酵する。MACCONKEY の寒天で発育しない。”

分離菌の性状は BERGEY's manual の *Pasteurella* 属の定義を完全に満足し，COWAN & STEEL の定義にも，MACCONKEY の寒天での発育可能なことを例外とすれば，Multocida 群の定義を満足する。したがって，分離菌は *Pasteurella* 属に属させることが妥当であると考えられる。

魚に病原性がある *Pasteurella* 菌には GRIFFIN³⁾ が天然のサケ科魚類の潰瘍病魚から分離した *P. tularensis* 類似菌，AJMAL⁴⁾ がウグイやスズキ類の魚から分離した菌，および SNIESZKO⁵⁾ が white perch

表 4. 分離菌の生物学的性状
Table 4. Biological characteristics of the isolates

Characteristics	Strain (TA-II L, W-1)
Crowth on	
MACCONKEY agar	+
SS agar	-
BTB Teepol agar	-
ENDO agar	(+)
WA agar	-
ARAKAWA modified agar	+
Growth temperature range	12~30
(°C) opt.	13~18
Growth pH range	6.0~9.2
opt.	6.4~7.0
Growth NaCl conc. range.	0~5.0
(%) opt.	0~3.5

(): weakly

表 5. 分離菌の薬剤に対する感受性
Table 5. Sensitivity of strain TA-II L to antibacterial agents

Drugs	MIC* (mcg/ml)
Tetracycline	<0.04
Oxytetracycline	<0.051
Novobiocin	<0.083
Chloramphenicol	<0.11
Nalidixic acid	<0.35
Erythromycin	0.11~0.15
Tianphenicol	0.27~0.32
Nitrofurantoin	0.85~1.0
Furazolidon	0.93~1.2
Oleandomycin	0.93~1.2
Streptomycin	1.9 ~2.5
Spiramycin	3.9~5.1
Kanamycin	7~9
Penicillin	8.8~11 (u.)
Aminobenzylpenicillin	8.9~11
Nifurpirinol	40
Colistin	260~410 (u.)

* Minimum inhibitory concentration

から分離し, JANSSEN ら⁶⁾によって *P. piscicida* と命名された菌がある。なお, 楠田ら⁷⁾は養殖ハマチの類結節症の原因菌について分類学的に検討し *P. piscicida* に同定すべきであるとしている。分離菌の性状をこれらの菌と比較してみると, GRIFFIN³⁾の菌は co-carboxylase などの特有の発育必須栄養素を要求するので, 本菌とは明らかに相違する。また, AJMALら⁴⁾の菌とは分類学上の重要性状であるカタラーゼ反応や糖の分解性などに多くの相違点が認められる。JANSSEN ら⁶⁾の *P. piscicida* とは最も類似しているが, 溶血性, MR 試験, 硝酸塩の還元, アルギニン脱炭酸, マンノース, セロビオース, サリシンの分解性などに多くの相違がみられる (表 6)。

以上のことから, 本菌を *Pasteurella* 属の新種であると認めて, アユ (*Plecoglossus altivelis*) に病原性があることから, アユの種名を本菌の種小名に引用し, 英語の kill に相当するラテン語接尾動詞の cida を付し, 本菌を *Pasteurella plecoglosacida* sp. nov. と命名することを提案する。

なお, 本病に対する予防と治療法の基礎を見出すために分離菌の薬剤に対する感受性を調べた結果, テトラサイクリン, オキシテトラサイクリン, ノボビオシン, クロラムフェニコール, ナリジキシック・アシッドなどに強い感受性を示したので, これらの薬剤によって, 予防や治療の効果が望めるものと思われる。

要 約

1. 1971 年 5 月下旬から 7 月上旬にかけて, 徳島県下のアユ養殖池に流行した肝臓に特徴的な白斑の形成される細菌性疾病の原因菌の分類学的位置を検討した。

2. その結果, 分離菌は *Pasteurella* 属の新しい病原性細菌であることが確認できたので, 本菌を *Pasteurella plecoglosacida* sp. nov. と命名することを提案した。

3. 本菌はテトラサイクリン, オキシテトラサイクリン, およびノボビオシンなどに対して強い感受性を示した。

表 6. 分離菌と類似菌との性状比較

Table 6. Differences between the isolates and some similar organisms

Characteristics	Isolates	<i>Pasteurella piscicida</i> (JANSSEN et al, '68)	<i>P. piscicida</i> K-1 (KUSUDA et al, '72)	<i>P. multocida</i>
Cell-form	R	R	R	R
Bipolar stain	+	+	+	+
Motility	—	—	—	—
Growth at 37°C	—	—	—	+
Growth on MACCONKEY agar	+	—	—	—
Hemolysis	+	—	—	—
Gelatin liquefaction	—	—	—	—
Litmus milk	(A)		A	—
Indole production	—	—	—	+
H ₂ S production	—	—	—	+
Nitrate reduction	(+)	—	—	+
VP reaction	—	—	(+)	—
MR test	—	+	+	—
Arginine hydrolysis	—		+	—
Arginine decarboxylase	—	+	+	—
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+		+	
Acid from				
glucose	+	+	+	+
arabinose	—	—	—	—
xylose	—	—	—	+
mannose	—	+	+	+
saccharose	+	+	—	+
trehalose	—	—	—	+
cellobiose	(+)		—	
dextrin	+	—	—	—
mannitol	—		—	+
sorbitol	—	—	—	—
salicin	(+)	—	—	—

R:rod, A:acid, ():weakly

文 献

- 1) BREED, R. S., E. G. D. MURRAY, and N. R. SMITH, 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed., Williams and Wilkins, Baltimore.
- 2) COWAN, S. T. and K. J. STEEL, 1965. Manual for the Identification of Medical Bacteria, 1st ed., Cambridge University Press, London.
- 3) GRIFFIN, P. J., 1954. The nature of bacteria pathogenic to fish. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 83, 241~253.
- 4) AJMAL, M. and B. HOBBS, 1967. Species of corynebacterium and pasteurella isolated from diseased salmon, trout and rudd. *Nature*, 215, 142~143.
- 5) SNIESZKO, S. F., G. L. BULLOCK, and J. G. BOONE, 1964. *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *J. Bacteriol.*, 88, 1814~1815.

- 6) JANSSEN, W. A. and M. J. SURGALLA, 1968. Morphology, physiology, and Serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). *J. Bacteriol.*, **96**, 1606~1610.
- 7) 楠田理一・山岡政興, 1972. 養殖ハマチの細菌性類結節症の原因菌に関する研究—I. 形態学的ならびに生化学的性状による種の同定. 日水誌 (投稿中).

Characteristics of a *Pasteurella* sp. pathogenic for pond-cultured Ayu

Riichi KUSUDA and Wataru MIURA

(Dep. Cult. Fish., Fac. Agr., Kochi Univ.)

During the late spring to the midsummer of 1971, an epizootic occurred among pond-cultured Ayu, *Plecoglossus altivelis*, in Tokushima Prefecture. The disease was characterized by the disposition of white spots on the liver.

The etiological agent was isolated from white spots on the liver and the kidney. The organisms were gram-negative, non-motile, polarly stained rods, and usually 1.0 to 3.0 by 0.3 to 0.5 μ in size.

On BHI agar, colonies developed within 24 hours at 25°C, and were uniformly round 1 mm or less in diameter. Growth was observed on MACCONKEY agar, ENDO agar, and ARAKAWA modified agar. Glucose, furactose, galactose, saccharose, maltose, dextrin, cellobiose, and salacin were fermented anaerogenically by the organism, whereas arabinose, xylose, mannose, trehalose, mannitol, and sorbitol were not attacked. Indole, H₂S, acetyl methyl carbinol, methyl red, nitrate reduction were negative. Oxidase and catalase were positive.

Because of its polar-staining and physiological reactions, the organism fits best in the genus *Pasteurella*. The isolate was found to be not identical to any formally established species. We propose that it be identified as *Pasteurella plecoglosacida* sp. nov.

Plates

1. Typical anatomical symptom of a diseased Ayu (arrow).
2. Electron microscopic photograph of *Pasteurella plecoglosacida* sp. nov., cultured on Blood agar at 25°C for 18 hours.

図 版

1. 病魚の解剖学的症状、矢印は肝臓の白斑を示す。
2. *Pasteurella plecoglosacida* sp. nov. の電子顕微鏡像。