ドジョウから分離された病原性粘液細菌
Chondrococcus columnaris の性状

若林久嗣・江草周三

(1966年11月2日受理)

CHARACTERISTICS OF A MYXOBACTERIUM, *CHONDROCOCCUS*
COLUMNARIS, ISOLATED FROM DISEASED LOACHES.

Hisatsugu WAKABAYASHI and Syuzo EGUSA*

A *Chondrococcus*-like bacterium of high virulence was isolated from diseased loaches (*Misgurnus anguillicaudatus*). The basal medium used in this study as the standard for various purposes contains 0.3 per cent Bacto-tryptone and 0.2 per cent yeast extract, adjusted to pH 7.5 (TY broth). TY agar media containing 1.5 per cent agar and 0.4 per cent agar were suitable for the isolation and the maintenance of the bacterium, respectively. Stock cultures were stored in a refrigerator and subculture was made every two or three weeks.

Colonies on TY agar plates were usually yellow and flat and have irregular, rhizoidar edges, though showing a wide variation in form in older cultures. (Fig. 2). Vegetative cells from lesions or young cultures were Gram-negative, slender, flexible rods and have 3 to 8 microns in length and about 0.5 microns in width. Under cultural conditions the cells usually went through degenerative processes similar to those described by GARNJOBST³⁾ and by BORG⁴⁾.

A swinging motion and column formation were observed in materials scraped directly from lesions and placed in a wet mount. (Fig. 3). A sliding movement was also observed on solid media. The formation of fruiting bodies and microcysts was clearly demonstrated by using BORG's method. (Fig. 5). Tests for biochemical characteristics of the bacterium yielded the results shown in Table 2.

On the basis of the information obtained, the organism was identified with *Chondrococcus columnaris* (DAVIS) ORDAL and RUCKER (1944).

魚類に対する病原性粘液細菌は DAVIS¹⁾ によつて最初に発見されたが、以来、主としてアメリカにおいて広く淡水魚全般を冒す重要な病原菌の一つとして、かなり多くの研究が成されてきた²⁾⁻⁵⁾。わが国においては、以前からニジマスやコイにこれによく似た菌による疾病が起こつているといわれていたが、現在まで、病原菌に関する報告がなされていない。

筆者らは流水槽に蓄養しているドジョウが非常に高い頻度で粘液細菌に冒されることを知り、これらからその病原菌を分離することを試みた。その結果、ORDAL and RUCKER²⁾ の報告した *Chondrococcus columnaris* (DAVIS) ORDAL and RUCKER (1944) に同定される粘液細菌を分離することができたので、以下にその分離菌の性状について報告する。

分離並びに培養

本菌に冒されたドジョウは典型的な *columnaris disease* の症状を示す。まず、鰭の先端、吻端、その他体表各所、さらに鰓葉端などに菌の塊りである灰白色の斑紋が現われ、急速に発達して、魚は短時間内に死

* 東京大学農学部 (Department of Fishery, Faculty of Agriculture, the University of Tokyo, Tokyo, Japan.

(印刷費負担)

亡する。症状が進むと、通常、体表の至るところに菌塊が見られるようになるが、時には、鰓、尾部、吻端などに局限され、いわゆる gill disease, peduncle disease, mouth fungus などの様相を呈する場合もある。

患部から菌塊を掻き採って検鏡すると、ほぼ純粋な粘液細菌の集落がみられる。できるだけ純粋な菌塊を白金線で採って、そのまま、あるいは滅菌水で洗滌して直接寒天平板に画線すると後述のような特徴あるコロニーが分離される。

培地の組成について、(1) ポリペプトン 1.5 %, 肉エキス 0.75 %, 食塩 0.5 %, 寒天 1.5 %, (2) バクトトリプトン 1 %, 肉エキス 0.5 %, 寒天 1.5 %, (3) バクトトリプトン 0.5 %, 寒天 1.5 %, (4) バクトトリプトン 0.3 %, 酵母エキス 0.2 %, 寒天 1.5 % をそれぞれに含む 4 種の培地を pH 7.0~7.5 に調整、試用したところ、そのいずれにも発育することがわかった。しかし、(1) (2) は雑菌の発育が旺盛で分離に不適當であるほか、本菌の発育も良好とはいえない。また、(3) は本菌の分離には適しているが発育にやや難がある。それゆえ、これらの中では (4) が最も適当と判断された。さらに、これらから寒天成分を除いた液体培地のいずれにも本菌は発育可能であるが、やはり (4) が良いように思われた。しかし、分離の際、増菌を目的として患部から採った菌塊を液体培地に入れると、いずれの場合も雑菌だけが発育してその目的を果すことができなかった。

Table 1 はよりよい培養条件を知るために、いくつかの培養条件について、その二、三の水準を直交表を使って割りつけ、振盪培養 24 時間後の発育の有無を指標として、その効果を調べた結果である。これに基いて筆者らは通常、本菌の培養にバクトトリプトン 0.3 %, 酵母エキス 0.2 %, pH 7.5 の培地 (以下、

Table 1. Effects of several cultural factors on the growth of *C. columnaris* isolated from diseased loaches.

Factor	Level	Growth index* (Number of samples tested)
Bacto-tryptone	0.25 %	67 (18)
	0.5	61 (18)
	1.5	44 (18)
Yeast extract	0.05 %	50 (18)
	0.1	56 (18)
	0.2	78 (18)
Sodium chloride	0 %	72 (18)
	0.25	61 (18)
	0.5	39 (18)
Tween 80	0.001 %	67 (18)
	0.01	50 (18)
	0.1	56 (18)
Initial pH	6.5	6 (18)
	7.0	78 (18)
	7.5	89 (18)
Cultural temperature	20°C	33 (9)
	25	67 (9)
	28	67 (27)
	30	56 (9)
Strain	A	58 (45)
	C	56 (9)

* Growth index

$$= \frac{\text{Number of samples showing growth on the level}}{\text{Number of samples tested on the level}} \times 100$$

TY 培地と略称する)を使用することにした。平板の場合、従来 1% 以下の寒天含量が賞用されているが、本菌の場合、増殖に差が認められなかつたので操作のしやすい 1.5% のものを使用することにした。

菌株の保存は 0.4% の寒天を含む TY 培地を高層に固め、菌を穿刺して 28°C で培養後、冷蔵庫に保管し、2~3 週間毎に継代した。

以上のようにして分離、培養した菌を使つて再現実験を試みたところ、ドジョウの他、コイ、キンギョ、ウナギなどにも感染し、短時間に致死せしめることが判明したが、これらについては改めて報告することにした。

形 態

本菌はグラム陰性の細長い桿菌で鞭毛をもたず、患部から直接塗抹した菌では長さ 3~8 μ 、幅 0.5 μ 前後で比較的均一であるが、培地中では時間と共に極めて不揃いになる。長さの変化ばかりでなく、波状をしたものや、輪状になったものなど、形の変化したものが多くなる。終には球状あるいは無定形の粒子ばかりになつてしまう。このような粒子は新しい培地に移しても再び発育することがなく、GARNJOBST³⁾や BORG⁴⁾の記載している involution form に当ると推定される (Fig. 1)。

運 動

患部から採つたばかりの菌の運動はかなり活発であるが、培養菌は概して不活発である。患部から菌塊を採つて検鏡すると、一端を固定して他端をもつて円を描いたり首を振るような運動をしている多数の個体を見ることができる。さらに、スライド面上をゆつくり滑走している個体を見ることがある。滑走運動はスライド上よりも寒天平板上ではつきり観察することができる。本菌は、このように粘液細菌特有の屈曲運動と滑走運動をするが、游泳運動をすることはない。

やや時間が経つと、スライド上の菌塊の辺縁に付近の菌体が集まつて、Fig. 3 のような特徴的なコラム状の集落を形成する。

培 養 所 見

分離直後の菌は通常、平板培地上で Fig. 2-1 のような辺縁が樹根状をした黄色の扁平なコロニーを形成する。表面は粗で乾燥し、強靱な膜を形成して平板に密着している。寿命が短かく、1~2 週間で枯死する。しかし、コロニーの形や性質は菌の状態や培地によつてかなり変化する。Fig. 2-2 はその極端な例で永く継代したものなどからまれに出てくることがある周辺の全く無構造のコロニーである。また Fig. 2-3 は両者の中間的な形をしているが、その性質はかなり異なり、粘稠で寿命が長く、表面はいぼ状で盛り上つている。BORG⁴⁾はこのようないぼについて、これらが幾分 cyst の性質を具えているのではないかといつている。ともあれ、このような傾向の変化はどの菌株にも程度の差こそあれ継代していく内には必ずみられるものである。

高層培地に穿刺すると穿刺線に添つて発育するが、表面の発育が最も良好である。

液体培地に静置培養すると、ある程度一様に濁るが管壁、とりわけ培地と空氣の境界線付近に付着集落を作る。また、液面には菌膜を作り時間と共に白色から黄色に変わり強靱さを加える。

振盪培養をすると初期には管壁に多少付着集落を作るが、やがてほぼ一様に混濁する。しかし、温度、pH などの条件が悪いと応々 Fig. 4 のように糸屑状に固つたり、あるいは管壁の付着集落が棍棒状に伸び出したりして容易に混濁しないことがある。

Fruiting body

Fruiting body 形成の有無は粘液細菌の分類上重要な基準とされるものである⁶⁾、その形成は条件に左右されるので分類基準にすることに疑問ももたれている⁷⁾。本菌の場合は Borg⁵⁾の方法によつてこれを形

成することが認められた。すなわち、高圧滅菌をしたドジョウの尾部の小片に分離直後のできるだけ新しい菌を移植し、200 ml 前後の滅菌水を入れた三角コルベンに投入して 28°C で培養する。5 日程後に滅菌水を入れ換え、さらに 5 日ほど培養を続けると小片表面全体に Fig. 5-1 のような fruiting body が林立する。長さは 0.1~0.5 mm 位で、突起状をなし、あるいは枝分れしているものも認められる。かなり強靱な構造をもち、解剖顕微鏡下で単離することができる。採り出した fruiting body をスライドに載せ、押し潰して検鏡すると Fig. 5-2 のように、菌に混つて BORG⁴⁾ の記載する microcyst と形態の一致する径 1 μ 前後の輪郭のはっきりした球体の群をとこところに観察することができる。

生 化 学 的 性 状

Table 2 に本菌の生化学的性状をとりまとめた。とくに以下に断りのない場合は TY 培地を基礎培地とし、従来の方法にしたがつてその結果を判定している。

チトクローム・オキシダーゼは産生すると認められるが、反応は他種の明らかに産生する対照菌に比べ微弱であつた。

ゼラチンは基礎培地を加えた場合も加えない場合も液化されたが速やかとはいひ難いように思われた²⁾⁸⁾。

牛乳凝固テストは基礎培地を加えない普通のリトマス牛乳を使つて行なつたが、2~14 日後から明らかに酸産生を伴わない凝固が認められた。

インドールの産生は TY 培地と 0.3 % トリプトン培地の二つを使つて調べたが、いずれの場合も検出されなかつた。

硫化水素の産生は酢酸鉛 TY 寒天培地を使つて調べた。

VP 反応並びに MR 反応のために所定のブドウ糖リン酸ペプトン水 (バクトトリプトン 5 g, K₂HPO₄ 5 g, ブドウ糖 5 g, 蒸留水 1000 ml, pH 7.5) を調製し本菌を移植したところ、検体 16 本中 1 本も発育しなかつた。しかし、これを二倍に希釈して使用したところ 8 本中 3 本に発育が認められたのでテストを行な

Table 2. Biochemical characteristics of *C. columnaris* isolated from diseased loaches.

Test	Result	Test	Result
Presence of catalase	+	Carbohydrate utilization	
Presence of cytochrome oxidase	+	Glucose	—
Reduction of nitrate*	+	Xylose	—
Reduction of methylene blue*	+	Arabinose	—
Reduction of neutral red	—	Rhamnose	—
Liquefaction of gelatin	+	Fructose	—
Coagulation of milk	+	Galactose	—
Production of indole*	—	Mannose	—
Production of hydrogen sulfide	+	Sucrose	—
Production of ammonium*	+	Maltose	—
Production of pigment	—	Raffinose	—
Voges-Proskauer test	—	Dextrin	—
Methyl red reaction	—	Starch	—
Hydrolysis of starch	—	Glycogen	—
Utilization of cellulose	—	Glycerol	—
Utilization of chitin	—	Mannitol	—
Utilization of agar	—	Inositol	—
Haemolysis	—		

* Tested on shake cultures.

つた。VP 反応は APHA (1946) の標準法によつた。

糖類の分解は、糖 0.5~1.0 g, バクトトリプトン 0.3 g, 寒天 1 g, 0.2 % BTB 溶液 1.2 ml, 蒸留水 100 ml, pH 7.5 の培地を高層に固め穿刺培養をして調べた。

セルロースの分解は円形濾紙を TY 平板培地に載せ、その上に少量の培地を重層したものと、TY 液体培地に濾紙粉末を加えたものの二つを用い肉眼的に判定したが、いずれの場合も分解は認められなかつた。

キチンの分解は TY 培地に精製キチンの小片数個を投入し肉眼的に崩壊過程を対照と比較する方法によつて調べた。さらに基礎培地として無機培地 (KH_2PO_4 1 g, CaCl_2 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, NaCl 0.1 g, Fe_2Cl_6 0.01 g, 蒸留水 1000 ml, pH 7.5) も使つてみたが、これには菌の発育が認められなかつた。

温度, pH, 酸素

TY 培地を使用し、振盪培養によつて判断すると、発育する温度範囲は 15~35°C, pH 範囲は 6.5~8.5 で、至適温度は 27~28°C, 至適 pH は 7.5 前後と推定される。

好気性で嫌気的条件下では発育しない。

薬剤に対する感受性

若干の抗生物質に対する感受性を“栄研”の三濃度ディスクを使つて調べたところ、Table 3 のような結果が得られた。カナマイシン以外の全ての供試薬剤、とりわけ、阻止円の大きさから判断すると、ノボビオシン、ペニシリンなどに対して高い感受性を示した。このような傾向の感受性は KINCHELOE²⁾ が各種の魚から分離された粘液細菌について調べたものとおおむね符合する。

Table 3. Antibiotic sensitivity of three strains of *C. columnaris* isolated from diseased loaches.

Antibiotic	Concentration			A	B	C
	High	Med.	Low			
Penicillin	10	2	0.5 (u.)	+++	+++	+++
Erythromycin	10	2	0.5 (mcg.)	+++	+++	+++
Oleandomycin	15	5	2 (mcg.)	+++	+++	+++
Leucomycin	15	5	2 (mcg.)	+++	+++	+++
Novobiocin	10	2	0.5 (mcg.)	+++	+++	+++
Chloramphenicol	30	10	5 (mcg.)	+++	+++	+++
Tetracycline	30	10	5 (mcg.)	+++	+++	+++
Dihydrostreptomycin	50	10	2 (mcg.)	+++	+++	+++
Kanamycin	30	10	5 (mcg.)	+	+	+
Colistin	300	100	50 (u.)	+++	+++	+++

+++ = Zone of inhibition was formed by either of the high, medium and low concentrations.

++ = Zone of inhibition was formed only by the high concentration.

考 察

以上のような性状を示す本菌の分類上の位置であるが、本菌が order *Myxobacteriales* に属することは滑走運動と特有の屈曲性から明らかである。さらに、球状の microcyst を作ることから family *Myxococcaceae* に、fruiting body が堅牢で融化石ないことから genus *Chondrococcus* に属するものと判断される。

すでに報告されている魚に病原性のある粘液細菌は ORDAL and RUCKER²⁾ の報告した *Chondrococcus*

columnaris, GARNJOBST³⁾ の報告した *Cytophaga columnaris*, BORG⁴⁾ の報告した *Cytophaga psychrophila* の3種である。そこで、本菌を *Chondrococcus columnaris* と比較してみると、本菌がブドウ糖を分解せず、また硝酸塩を還元する点が異なっているほかは、とくに著しい差は認められない。それゆえ、本菌は *Chondrococcus columnaris* (DAVIS) ORDAL and RUCKER (1944) と同定して差支えないと考えられる。しかし、*C. columnaris* の生化学的性状に関して知り得たデータが少ないので、ブドウ糖分解や硝酸塩還元を含め、さらに検討を要するものと思われる。

要 約

1. ドジョウから病原性粘液細菌が分離された。
2. 分離菌について、培養条件の検討、菌体、コロニーおよび fruiting body などの形態観察、生化学的性状テスト、薬剤感受性テストなどを行なった。
3. その結果、分離菌は *Chondrococcus columnaris* (DAVIS) ORDAL and RUCKER (1944) と同定された。

文 献

- 1) H. S. DAVIS: *U. S. Bur. Fisheries Bull.*, **38**, 261~280 (1922).
- 2) E. J. ORDAL, and R. R. RUCKER: *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, **56**, 15~18 (1944).
- 3) L. GARNJOBST: *Jour. Bact.*, **49**, 113~128 (1945).
- 4) A. F. BORG: *Wildlife Disease*, **8**, 1~85, 2 microcards, (1960).
- 5) D. T. KINGSBURY, and E. J. ORDAL: *Jour. Bact.* **91** (3), 1327~1332 (1966).
- 6) R. S. BREED, E. G. D. MURRAY and N. R. SMITH: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7th edition.
- 7) S. F. SNIESZKO: *Develop. Ind. Microbiol.*, **5**, 97~148 (1964).
- 8) J. W. KINCHELOE: *Prog. Fish. Cult.*, **24** (3), 119~126 (1962).

Explanation of the plate

- Fig. 1.** *C. columnaris* isolated from infected loaches (*Misgurnus anguillicaudatus*). Fixed in Zenker's fluid and stained with basic fuchsin. $\times 1,100$
- 1-1. Vegetative cells smeared directly from a lesion.
 - 1-2. From a 24 hour shake culture. A ring form (*arrow*) and elongated forms.
 - 1-3. From a 2-week-old broth culture after the initial 24 hour shake culture. Coccus or amorphous granule involution forms.
- Fig. 2.** Three colony types of *C. columnaris* on the TY agar. $\times 30$
- 2-1. A typical rhizoid form.
 - 2-2. A circular form without rhizoid.
 - 2-3. A warty form with minute rhizoids.
- Fig. 3.** Columnar structures formed in a drop of water on a slide. $\times 300$.
- Fig. 4.** Thread-like colonies of *C. columnaris* occasionally appeared in TY broth shake culture. $\times 1.5$
- Fig. 5.**
- 5-1. Fruiting bodies produced by a strain of *C. columnaris*. After BORG's method. $\times 80$
 - 5-2. Materials found in crushed fruiting bodies. $\times 470$.
m: microcysts. v: vegetative cells.