各種病魚から分離された *Streptococcus* 属細菌の比較研究

楠 田 理 一・小 松 功

(1978 年 4 月 18 日受理)

A Comparative Study of Fish Pathogenic *Streptococcus* Isolated from Saltwater and Freshwater FishesRiichi KUSUDA*¹ and Isao KOMATSU*²

Pathogenic streptococci have been isolated from both freshwater- and saltwater-fishes in Japan as well as in America. However, comparative studies among these strains have not been reported. Characteristic properties of the strains were compared in this study.

Properties of 12 strains from yellowtails and eels in Japan, and 4 strains from saltwater fishes and white basses in America were well in agreement among themselves. However, differences between Japanese and American strains were observed in important properties; growth at 10°C and 45°C, growth in 0.1% methylene blue milk, growth on 40% bile agar, growth at pH 9.6 and esculin hydrolysis. Japanese strains were similar to *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium*, but they were negative in PT test, positive in TTC test and not classified as LANCEFIELD serological group D. Therefore, they were identified as a new species of *Streptococcus*, which was reported by KUSUDA *et al.*²⁾ American strains agreed with *Streptococcus agalactiae* CDC strains used as control in almost all properties examined, and were thus identified as *Streptococcus agalactiae*.

魚類の病原性連鎖球菌はこれまでに、わが国¹⁻³⁾と米国⁴⁻⁶⁾で分離された報告がある。わが国においては 1974 年の夏以来、養殖ハマチに連鎖球菌症が多発し問題となっており、その原因菌は *Streptococcus* 属の新しい魚病細菌であるとして報告されている²⁾。しかし、そのほかの病魚由来の連鎖球菌の分類学的位置や、性状などには不明な点が多い。そこで、本報ではわが国と米国の病魚から分離された菌株の分譲をうけ、性状を詳細に比較するとともに、種の同定を試みたので報告する。

実 験 方 法

菌株の由来 供試菌は Table 1 に示すとおりで、1974 年に高知、愛媛、山口県の養殖ハマチ病魚から分離された 10 株、1973 年に高知と愛媛県の養殖ウナギ病魚から分離された 2 株、米国の sea catfish など海産病魚から分離された 3 株、および white bass 病魚から分離された 1 株の計 16 株である。対照には *S. faecalis* 4 株、*S. faecium* 2 株ならびに *S. agalactiae* 2 株を用いた。

細菌学的性状検査 各種性状は 0.5% 食塩加 BHI 寒天培地 (栄研) あるいは 0.5% 食塩加 BHI プイヨン

(栄研) に 25°C、20~24 時間培養した菌を使用し、細菌学実習提要ならびに培地学各論の方法に準じて検査した。LANCEFIELD の血清型については、BBL の *Streptococcus* Antiserum Group A~G を用いて検査した。なお、炭水化物の分解性は糖分解用半流動培地 (栄研) を基礎培地として用い、1% の炭水化物を添加して検査した。

結 果

形態学的性状 供試菌株および対照菌株の形態学的性状は類似した性状を示した。すなわち、供試菌は卵形で大きさが $1.4 \times 0.7 \mu$ の連鎖状に配列した球菌である。運動性はなく、芽胞は形成しない。

生物学的性状 供試菌株および対照菌株はすべてグラム陽性で、MACCONKEY および BTB Teepol 寒天培地上には発育しない。PEA アザイド寒天培地にはすべて発育する。SS 寒天培地上では腸球菌の Sf-1, Sm-1 および Sd-1 株のみが発育するが、病魚由来株をふくむほかの菌は発育しない。荒川変法培地上では *S. faecalis* および Sd-1 株のみが発育する。遠藤寒天培地上では米国病魚由来の CDC 73-27759, EFDL #155 株および対照

*¹ 高知大学農学部栽培漁業学科 (Department of Cultural Fisheries, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nangoku, Kochi Pref., Japan).

*² (株) アドバンス開発室 (Fish Disease Laboratory, Advance Inc., Atsugi, Kanagawa Pref., Japan).

Table 1. Streptococcus strains used in this study

Strain	Date of isolation	Source	Organ of isolation
YT-3	Aug., 1, '74	Yellowtail, Kochi, Japan	Kidney
SK-7	Sep., 17, '74	Yellowtail, Kochi, Japan	Liver
SK-11	Sep., 19, '74	Yellowtail, Kochi, Japan	Liver
SK-12	Sep., 20, '74	Yellowtail, Kochi, Japan	Heart
SK-13	Sep., 27, '74	Yellowtail, Kochi, Japan	Heart
SK-14	Sep., 27, '74	Yellowtail, Kochi, Japan	Liver
SE-1	Sep., 27, '74	Yellowtail, Ehime, Japan	Kidney
SE-5	Sep., 24, '74	Yellowtail, Ehime, Japan	Kidney
SY-1	Oct., 29, '74	Yellowtail, Yamaguchi, Japan	Heart
SY-2	Oct., 29, '74	Yellowtail, Yamaguchi, Japan	Heart
AK-1	Apr., 19, '73	Eel, Kochi, Japan	Kidney
MA	Jun., 21, '73	Eel, Ehime, Japan	Kidney
SS-1012*	Sep., 1, '72	Ichthic, Arkansas, USA	—
SS-1014*	Sep., 1, '72	Ichthic, Alabama, USA	—
CDC 73-27759**	Nov., 27, '73	Sea catfish, Alabama, USA	—
EFDL # 155***	—	White bass, USA	—
Sf-1	<i>Streptococcus faecalis</i> RIMD 6783		
Sf-3	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 19433		
Sl-1	<i>S. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i> IFO 12964		
Sz-1	<i>S. faecalis</i> subsp. <i>zymogenes</i> IFO 3989		
Sm-1****	<i>Streptococcus faecium</i> H-32B		
Sd-1****	<i>Streptococcus durans</i> T-7- α		
Sa-1*	<i>Streptococcus agalactiae</i> CDC SS-1010		
Sa-2*	<i>Streptococcus agalactiae</i> CDC SS-1016		

* Supplied by Dr. R. R. FACKLAM, Center for Disease Control, U.S.A.

** Supplied by Dr. J. A. POUMS, Auburn University, U.S.A.

*** Supplied by Dr. G. L. BULLOCK, Eastern Fish Disease Laboratory, U.S.A.

**** Supplied by Dr. H. HASHIMOTO, Hiroshima University, Japan. These strains were placed in *S. faecium* in the 8th edition of Bergey's Manual.

の Sa-1 株は発育しないが、ほかの病魚由来菌および腸球菌は発育する。10% および 40% 胆汁加寒天培地上では米国病魚由来株および対照の *S. agalactiae* 2 株は発育しないか、微弱な発育しか示さないが、そのほかの病魚由来株および腸球菌はよく発育する。EF 寒天培地上では腸球菌の *S. faecalis* と *S. faecium* とはそれぞれ赤紫色と黄色の発育おう盛なコロニーを形成する。すべてのハマチ病魚由来株は微弱な赤紫色のコロニーを形成する。ウナギ病魚由来株、米国病魚由来株 および *S. agalactiae* はまったく発育しない。0.1% メチレンブルーミルクでの発育性および 10°C, 45°C, 食塩濃度 6.5%, pH 9.6 での発育性はハマチ病魚由来株、ウナギ病魚由来株および腸球菌がすべて陽性であるが、米国病魚由来株および *S. agalactiae* はすべて陰性である。各種の pH, 温度および塩分濃度における発育性はわが国の病魚由来株および腸球菌、米国の病魚由来株および *S. agalactiae* がそれぞれ類似した傾向を示した。

生化学的性状 Table 3 に示すとおりで、すべての供試菌および対照菌はカタラーゼおよびオキシダーゼ試験、インドールおよび硫化水素産生性、クエン酸塩利用

性、硝酸塩およびメチレンブルーの還元性が陰性で、OF 試験は発酵的である。メチレンレッド試験では SS-1012 株を、VP 反応では SS-1014 株を除きそれぞれ陽性である。リトマスミルクでは米国病魚由来株 および Sa-2 を除き、すべて酸を産生する。PT および TTC 試験は *S. faecalis* とその亜種が陽性で、わが国の病魚由来株が TTC 試験陽性のほかはすべての菌株が陰性である。グルコン酸塩酸化、胆汁溶解性およびデンプンの加水分解性についてはすべての菌が陰性である。ゼラチンの加水分解性は *S. faecalis* の亜種を除きすべて陰性である。馬尿酸塩の加水分解性は米国病魚由来株と Sf-3, Sz-1, Sl-1 および *S. agalactiae* が陽性で、ほかの菌株は陰性である。エスクリンの加水分解性は米国病魚由来株を、アルギニンの加水分解性は SS-1012 株を除き陽性である。LAO 試験は EFDL # 155 株が (---) であることを除き、ほかのすべての菌株は (-+-) である。LANCEFIELD の血清型はわが国の病魚由来株が使用した抗血清には反応せず、米国の病魚由来株が B 群に所属した。なお、対照の腸球菌はすべて D 群に、*S. agalactiae* は B 群に群別された。

Table 2. Morphological and cultural characters of the isolates, *S. faecalis*, *S. faecium* and *S. agalactiae*

Characters	Yellowtail (10)	Eel (2)	American strains (4)	<i>S. faecalis</i> (4)	<i>S. faecium</i> (2)	<i>S. agalactiae</i> (2)
Cell form	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci
Gram stain	+	+	+	+	+	+
Motility	—	—	—	—	—	—
Growth on:						
MacCONKEY agar	—	—	—	—	—	—
SS agar	—	—	—	1	+	—
BTB Teepol agar	—	—	—	—	—	—
ARAKAWA agar	—	—	—	+	1	—
ENDO agar	+	+	2	+	+	1
10% Bile agar	+	+	1	+	+	1
40% Bile agar	+	+	1	+	+	—
EF agar	wr	wr	—	r	y	—
PEA azide agar	+	+	+	+	+	+
Growth in:						
0.1% MB milk	R	R	—	R	R	—
Growth at:						
0°C	—	—	—	—	—	—
10°C	++	++	—	++	++	—
25°C	+++	+++	++	+++	+++	++
37°C	+++	+++	++	+++	+++	++
45°C	++	+	—	++	++	—
50°C	—	—	—	—	—	—
0% NaCl	+++	+	+	++	++	+
2% NaCl	+++	+++	+	+++	+++	+
4% NaCl	++	+++	±	+++	+++	±
6.5% NaCl	++	+	—	+	+	—
pH 4.5	+	+	—	+	+	—
pH 6.1	++	++	+	++	++	+
pH 7.6	+++	+++	++	+++	+++	++
pH 8.4	++	++	+	++	++	+
pH 9.0	++	++	±	++	++	±
pH 9.6	+	+	—	+	+	—

Key: wr, weak red colony; r, red colony; y, yellow colony; R, reduction.

炭水化物の分解性 Table 4 に示すとおりで、すべての菌株は供試した 25 種の糖からガスを産生しない。また、炭水化物の分解性はわが国の病魚由来株と腸球菌とはラクトース、ラフィノース、グリセロールで差異が認められ、シュクロース、ソルビトール、メレチトースの一部の菌株でも差異が認められるが、そのほかの 18 種の糖では一致した性状を示す。米国病魚由来株と *S. agalactiae* とはマルトース、ラクトース、シュクロース、デンプン、デキストリン、サリシンで差異が認められるが、そのほかの 19 種の糖とは一致した性状を示す。なお、わが国の病魚由来株と米国病魚由来株とは、10 種の糖で差異が認められる。

考 察

Bergey's Manual 第 8 版⁷⁾ によると *Streptococcus* 属は“二連または連鎖状のグラム陽性球菌で、グルコースを発酵的に利用し、カタラーゼ陰性である”。と定義されている。また、Cowan and Steel's Manual 第 2 版⁸⁾ には“二連または連鎖状のグラム陽性球菌で典型的には非運動性であるが、1 菌種ではときには運動性菌株がみられる。芽胞は存在せず、好気性あるいは通性嫌気性である。カタラーゼ反応およびオキシダーゼ反応はともに陰性である。また、糖を発酵的に分解する”。と定義されている。供試菌 16 株のすべてはこれらの定義を満足する。したがって、すべての供試菌は *Streptococcus* 属に同定してよいと考えられる。

Table 3. Biochemical characters of the isolates, *S. faecalis*, *S. faecium* and *S. agalactiae*

Characters	Yellowtail (10)	Eel (2)	American strains (4)	<i>S. faecalis</i> (4)	<i>S. faecium</i> (2)	<i>S. agalactiae</i> (2)
Catalase	—	—	—	—	—	—
Cytochrome oxidase	—	—	—	—	—	—
HUGH-LEIFSON test	F	F	F	F	F	F
Indole	—	—	—	—	—	—
MR test	+	+	3	+	+	+
VP reaction	+	+	3	+	+	1
Citrate utilization	—	—	—	—	—	—
H ₂ S	—	—	—	—	—	—
Casein digestion	—	—	—	2	—	1
Litmus milk	RA	RA	— ^R 3, 1	RAC	RA	RAC, R
Nitrate	—	—	—	—	—	—
MB reduction	—	—	—	—	—	—
PT test	—	—	—	+	—	—
TTC test	+	+	—	+	—	—
Gluconate	—	—	—	—	—	—
Bile dissolution	—	—	—	—	—	—
Ammonium	—	—	—	—	—	—
Hydrolysis of:						
Gelatin	—	—	—	2	—	—
Starch	—	—	—	—	—	—
Hippurate	—	—	+	3	—	+
Esculin	+	+	—	+	+	—
Arginine	+	+	3	+	+	+
Decarboxylation of:						
Lisine	—	—	—	—	—	—
Arginine	+	+	3	+	+	+
Ornithine	—	—	—	—	—	—
Group antigen (LANCEFIELD)	No group	No group	B	D	D	B

Key: F, fermentation; R, reduction; A, acid production; C, coagulation.

Bergey's Manual 第 8 版では *Streptococcus* 属を 10°C・45°C・NaCl 6.5%・pH 9.6 および 0.1% メチレンブルーミルクでの発育性、アルギニンからのアンモニア産生性、β 型溶血性および LANCEFIELD の血清型によつて 4 つに群別され、さらに 21 の種に分類されている。供試菌のうちでわが国のハマチとウナギ病魚由来の 12 株は 10°C および 45°C で発育するので、*S. faecalis*, *S. faecium*, *S. avium*, *S. uberis* の群に分類できる。この群は 6.5% NaCl, pH 9.6 および 0.1% メチレンブルーミルクでの発育性、アラビノースおよびソルビトールの発酵性、葉酸要求性、アルギニンからのアンモニア産生性および LANCEFIELD の血清型などによつてさらに 3 つに分けられている。ハマチおよびウナギ病魚由来の 12 株は 0.1% メチレンブルーミルク、NaCl 6.5% および pH 9.6 において発育する。したがって、*S. faecalis* および *S. faecium* に類縁の種と考えられる。しかし、Bergey's Manual 第 8 版および

Cowan and Steel's Manual 第 2 版に記載されている *S. faecalis* および *S. faecium* の主要な性状と比較すると重要な性状で相違がみられ、これらの中間型の性状を示す。すなわち、*S. faecalis* とは 10°C, 45°C, 50°C, NaCl 6.5%, pH 9.6, 0.1% メチレンブルーミルクおよび 40% 胆汁加寒天培地における発育性、0.01% TTC 還元性、ゼラチン、デンプン、エスクリンおよびアルギニンの加水分解性、ソルビトールおよびアラビノースからの酸産生性、アルギニンの脱炭酸およびカタラーゼ反応などの性状で一致し、0.04% PT での発育性、馬尿酸塩の加水分解性、グリセリンからの酸産生性で相違した性状を示す。*S. faecium* とは 10°C, 45°C, NaCl 6.5%, pH 9.6, 0.1% メチレンブルーミルク、0.04% PT および 40% 胆汁加寒天培地での発育性、ゼラチン、デンプン、エスクリンおよびアルギニンの加水分解性、グリセリンからの酸産性、クエン酸塩の利用性およびカタラーゼ反応などの性状で一致し、0.01% TTC 還元性で

Table 4. Utilization of carbohydrates of the isolates, *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. agalactiae*

Characters	Yellowtail (10)	Eel (2)	American strains (4)	<i>S. faecalis</i> (4)	<i>S. faecium</i> (2)	<i>S. agalactiae</i> (2)
Gas from carbohydrates	—	—	—	—	—	—
Acid from:						
Arabinose	—	—	—	—	—	—
Xylose	—	—	—	—	—	—
Rhamnose	—	—	—	—	—	—
Glucose	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Levulose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	3	+	+	+
Cellobiose	+	+	—	+	+	—
Lactose	—	1	—	+	+	1
Sucrose	—	1	3	3	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+
Starch	—	—	1	—	—	+
Raffinose	—	—	—	—	1	—
Glycogen	—	—	—	—	—	—
Dextrin	+	+	1	+	+	+
Mannitol	+	+	—	+	+	—
Glycerol	—	—	—	+	—	—
Inositol	—	—	—	—	—	—
Sorbitol	+	+	—	+	1	—
Salicin	+	+	1	+	+	+
Esculin	+	+	—	+	+	—
Melibiose	—	—	—	—	—	—
Melezitose	—	—	—	2	—	—
Adonitol	—	—	—	—	—	—

相違した性状を示す。また、EF 寒天培地の発育性では *S. faecalis* が赤紫色コロニー、*S. faecium* が黄色コロニーを形成するのに対して、わが国のハマチとウナギ病魚由来の 12 株は微弱な赤紫色コロニーを形成する。

以上のことから、わが国の病魚由来の 12 株は同一の種と考えられ、*S. faecalis* および *S. faecium* とは異なる *Streptococcus* sp.²⁾ であると思われる。

なお、HOSHINA ら¹⁾ がニジマス病魚から分離し、たぶん *S. faecalis* に同定できるとした菌株と供試 12 株とを比較すると糖の分解性、発育温度域およびアンモニアの産生性で差異がみられるほかは一致する性状を示す。したがって、ハマチおよびウナギ由来の 12 株は HOSHINA らの分離した菌とは同一な種か、あるいは近縁種と考えられる。しかし、HOSHINA 株は現存しないので詳細な比較はできない。PLUMB ら⁹⁾ が 1972 年に分離し、WILLKINSON ら¹⁰⁾ によつて検査され、*Streptococcus* 属 LANCEFIELD B Group Ib type とされた海産病魚由来の菌株とは発育温度域、0.1% メチレンブルーミルク、pH 9.6、NaCl 6.5% での発育性およびエスクリンの加水分解性などの同定上重要な性状で異な

る。したがって、わが国のハマチおよびウナギ由来の 12 株とは異なる種と考えられる。

米国の海産魚と white bass 病魚由来の 4 株の性状は 40% 胆汁加寒天培地上の発育性、アルギニンの脱炭酸および加水分解性、リトマスミルク培地での発育性で相違がみられるが、そのほかの主要な性状は一致する。これらの 4 株は 10°C、45°C、pH 9.6、0.1% メチレンブルーミルクおよび NaCl 6.5% では発育できず、LANCEFIELD の血清型 B 群に群別されるので第 I 群に分類できる。また、対照として用いた *S. agalactiae* とはほとんどの重要な性状で一致する。したがって、米国の sea catfish などの海産病魚由来 3 株、および white bass 病魚由来の 1 株は *S. agalactiae* に同定するのが妥当であると考えられる。

終わりにあたり、本研究に御協力いただいた豊嶋利雄氏に厚くお礼を申しあげる。なお、本研究の一部は昭和 52 年度文部省科学研究費によつておこなつた。

要 約

魚類の病原性連鎖球菌は、わが国と米国の淡水魚なら

びに海産魚から分離されているが、これらの菌株間の比較研究は行なわれていない。そこで、これらの病魚から分離された菌株の分譲をうけ、性状を詳細に比較するとともに、種の同定を試みた。

その結果、わが国のハマチとウナギ病魚由来の 12 株間、米国の海産魚と white bass 病魚由来の 4 株間の性状はそれぞれよく一致した。わが国の病魚由来株は *S. faecalis* と *S. faecium* によく類似するが、PT 試験が陰性で TTC 試験が陽性であり、LANCEFIELD の血清型 D 群に所属しないことから、両種とは異なる *Streptococcus* sp. であるとするのが妥当であると考えられた。米国の病魚由来株は LANCEFIELD の血清型 B 群に所属し、対照に用いた *S. agalactiae* CDC 株とほとんどの性状が一致するので *S. agalactiae* に同定した。

文 献

- 1) T. HOSHINA, T. SANO, and Y. MORIMOTO: *J. Tokyo Univ. Fisheries*, **44**, 57-68 (1958).
- 2) 楠田理一・川合研児・豊嶋利雄・小松 功: 日本水誌, **42**, 1345-1352 (1976).
- 3) R. KUSUDA, I. KOMATSU, and K. KAWAI: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **44**, 295 (1978).
- 4) J. A. ROBINSON and F. P. MEYER: *J. Bacteriol.*, **92**, 512 (1966).
- 5) H. W. WILKINSON, L. G. THACKER, and R. R. FACKLAM: *Infect. Immunity*, **7**, 496-498 (1973).
- 6) J. A. PLUMB, J. H. SCHACHTE, and J. L. GAINES: *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **2**, 358-361 (1974).
- 7) R. E. BUCHANAN and N. E. GIBBONS: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 1974, pp. 490-509.
- 8) S. T. COWAN: *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 2nd ed., Cambridge University Press, London, 1974, pp. 70-75.