

ビブリオ病原菌の分類学的研究 (2)

数値分類法による検討

誌名	北海道大学水産学部研究彙報
ISSN	00183458
著者名	田島, 研一 絵面, 良男 木村, 喬久
発行元	北海道大学水産学部
巻/号	36巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 231-247
発行年月	1985年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ビブリオ病原菌の分類学的研究-II
数値分類法による検討

田島 研一*・絵面 良男*・木村 喬久*

Studies on the Taxonomy of Causative Organisms of Fish Vibriosis-II
Examination of the representative strains by means
of numerical taxonomy

Kenichi TAJIMA*, Yoshio EZURA* and Takahisa KIMURA*

Abstract

To clarify the relationship among the strains identified as being in the genus *Vibrio* in a previous report (Tajima et al., 1985), numerical taxonomy was carried out on 103 strains consisting of 74 representative strains out of 219 isolates from fish affected by vibriosis and 29 reference strains.

Eighty-nine of 103 strains used were classified into five taxons (phenon I-V) with mean similarities of more than 85%. Phenon I was comprised of 64 strains identified as *V. anguillarum* according to Bergey's manual in previous report (Tajima et al., 1985), and was further classified into five subgroups with similarities of more than 90%. Phenon II contained 16 *Vibrio* sp., all of which were isolated from salmonidae reared in fresh water as mentioned in a previous report (Tajima et al., 1985). In this phenon two strains of *V. ordalii*, strain MSC-275 and strain V-1669, were included. Phenons III and IV consisted of two reference strains of *V. metschnikovii* and five of *V. parahaemolyticus* respectively. Phenon V contained two strains which isolated from the anchovy (*Engraulis japonica*) and the yellowtail (*Seriola quinqueradiola*). Fourteen single member-clusters belonged to other species and genera. From comparison of mean similarity values between each phenon, phenon I had a similarity of 69% to phenon III, but similarities to phenons II, IV, and V were lower. Phenon II had relatively low similarities when compared with all other phenons and only a 57% similarity to phenon I.

緒 言

前報(田島ら, 1985)においてビブリオ病原菌として国内で分離された菌株を Bergey's manual 8th ed. に従って同定を行った結果, *V. anguillarum* をはじめ, *V. anguillarum* 近縁菌, *V. parahaemolyticus* 類似菌等多くの菌種にまたがるものが推察された。そこで本報ではそれぞれの菌群について類縁関係をより明らかにするために, 前述の国内分離株から代表株を選び, *V. anguillarum* 他, *Vibrio* 属細菌等の対照菌株を加えて, さらに多くの性状を詳細に調べ, Sneath (1957b) の方法に準拠して数値分類を行ない, 分類学上の類縁関係の解明を試みた。

* 北海道大学水産学部微生物学講座
(Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University Hokodate, 041, Japan.)

実 験 方 法

1. 供試菌株

前報 (田島ら, 1985) で供試したビブリオ病原菌国内分離株 219 株から可能な限り由来の異なる菌株 74 株 (Table 1) を選び, 前報 (田島ら, 1985) で供試したものと同一の対照菌 29 株 (Table 2) を加えた計 103 株を供試した。

2. 形態学的, 生物学および生化学的性状検査

前報 (田島ら, 1985) において実施した形態学的, 生物学および生化学的検査性状に加えて以下の性状を, 主として培地学各論 (1) (坂崎 1967) を参照して検査した。また各種検査のための基礎培地, 検査用培地の食塩濃度および培養温度は前報 (田島ら, 1985) 同様である。

1) 集落の性状

基礎平板培地で 4 日間養後, 発生集落についてその大きさ, 形状および辺縁の形態を肉眼的に

Table 1. Represetative strains of isolates employed in this study

Strain No.	Source	Strain No.	Source	Strain No.	Source
<i>V. anguillarum</i>		<i>V. anguillarum</i> like		<i>Vibrio</i> sp.	
V-17	ayu	V-16	ayu	V-10	rainbow trout
V-40	"	V-34	"	V-91	amago
V-63	"	V-55	"	V-201	rainbow trout
V-66	"	V-95	"	V-202	"
V-67	"	V-109	"	V-203	"
V-76	"	V-151	"	V-204	"
V-81	"	V-156	yellowtail	V-205	"
V-85	"	V-160	ayu	V-206	yamabe
V-88	"	V-178	"	V-207	"
V-100	"	V-179	"	V-234	amago
V-102	"	V-181	"	V-235	yamabe
V-106	coho salmon	V-183	"	V-236	rainbow trout
V-119	ayu	V-184	"	V-249	"
V-123	"	V-188	"	V-252	"
V-125	"	V-190	"		
V-148	yellowtail	V-197	eel		
V-170	ayu	V-199	yellowtail	<i>Vibrio</i> spp.	
V-171	"	V-200	"	V-13	ayu
V-196	eel	V-231	"	V-134	anchovy
V-198	"	V-239	coho salmon	V-141	"
V-208	mojako			V-224	mojako
V-211	"			V-228	yellowtail
V-213	amberjack			V-233	red sea bream
V-214	mojako				
V-220	"				
V-221	"				
V-227	"			<i>Aeromonas</i> sp.	
V-229	yellowtail			V-25	rainbow trout
V-230	"				
V-241	coho salmon				
V-243	"				
V-244	ayu				
V-246	"				

Table 2. Reference strains employed

Strain No.	Species name	Source
V-7 NCMB 6	<i>V. anguillarum</i>	NCMB* ¹
V-8 NCMB 828	"	"
V-9 NCMB 829	"	"
V-117 NCMB 571	<i>V. piscium</i> var. <i>japonicus</i>	"
V-116 NCMB 407	<i>V. ichthyodermis</i>	"
V-5 TUF	<i>V. piscium</i> var. <i>japonicus</i>	rainbow trout 1957 TUF* ²
V-104 NOAA V-775	<i>V. anguillarum</i> biovar I	coho salmon 1973 U.S.A. NOAA* ³
V-105 NOAA V-1669	" biovar II	" 1975 " "
	(<i>V. ordalii</i> sp. nov.)	
V-194 LS-174	<i>V. anguillarum</i>	coho salmon 1975 U.S.A.
V-195 MSC-275	<i>V. anguillarum</i> biovar II	" " "
V-254 VA- 6	<i>V. anguillarum</i>	rainbow trout 1971 England
V-255 VA- 8	"	" 1973 Norway
V-256 VA-15	"	" 1976 Italy
V-257 VA-25	"	Atlantic salmon 1975 Norway
HO5	<i>V. parahaemolyticus</i>	
T-77-5	"	
K-5	"	
K-7	"	
V-447	<i>V. alginolyticus</i>	
V-1 IAM 1039	<i>V. metschnikovii</i>	IAM* ⁴
V-2 IAM 1080	<i>V. tyrogenes</i>	"
ATCC 7744	<i>V. fischeri</i>	ATCC* ⁵
ATCC 25920	<i>Benecke campbellii</i>	"
NCMB 391	<i>Photobacterium mandapamensis</i>	NCMB
NCMB 1280	<i>Lucibacterium harveyi</i>	"
NCMB 1326	<i>Aeromonas proteolytica</i>	"
NCMB 86	<i>Aeromonas hydrophila</i>	"
NCMB 74	<i>Aeromonas punctata</i>	"
Es 1	<i>Escherichia coli</i>	

*¹: National Collection of Marine Bacteria, Aberdeen, Scotland*²: Tokyo University of Fisheries, Tokyo, Japan*³: Northwest and Alaska Fisheries Center, NOAA, Washington, U.S.A.*⁴: Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Tokyo, Japan*⁵: American Type Culture Collection, Maryland, U.S.A.

観察した。

2) 細胞形態

細胞の長さ・幅・形状および配列について顕微鏡下で観察した。

3) カタラーゼ

基礎培地斜面に培養後、集落上に3% 過酸化水素水を適量注加して、ガスの発生の有無を観察した。

4) 抗菌性物質感受性試験

基礎培地平板上に供試菌を塗抹後、培地面にペニシリン(20 I.U.), クロラムフェニコール(100 μ g), テトラサイクリン(200 μ g) およびポリミキシン B(100 I.U.) の各濃度のディスク(昭和薬品化工)を置き、48時間培養後ディスク周囲の発育阻止帯の有無により判定した。

5) ブタンジオール脱水素反応

ペプトン 0.5%, 酵母エキス 0.5%, リン酸 2 水素カリウム 0.5% および 2,3-ブチレングリコール 0.5% の組成の培地に供試菌を接種し, 48 時間培養後, Barrit 法によりアセトイン産生の有無を観察した。

6) ブタンジオール産生

0.5% の割合にリン酸 1 水素カリウムを加えた基礎液体培地に, 別に滅菌した 15% グルコース溶液を最終濃度 1.5% となるように加えた培地で 72 時間培養後, 2~3% 過ヨウ素酸, piperasine 溶液と 4% sodium nitroprusside 溶液を添加して 2 分間以内に明らかな緑色を呈したものを陽性と判定した。

7) グルコン酸酸化

Shaw and Clack の培地に 72 時間培養後, Benedict 試薬により 2-ケトグルコン酸産生の有無を観察した。

8) エスクリンの水解

基礎液体培地に 0.1% になるようにエスクリンを加えた培地に 4 日間培養後, 7% 塩化第 2 鉄溶液を添加して濃い褐色沈澱が生じたものを陽性と判定した。

9) キチン分解

Benton 法 (柳沢 1964) により泥状にしたキチンを約 1% の割合に加えた基礎培地平板に 4 日間培養後, 集落周囲の透明帯の有無により判定した。

10) ツーエン 20 の分解

ツーエン 20 を 1% になるように加えた基礎培地平板に 4 日間培養後, 分解による集落周囲の不溶性 oleate の沈着の有無により判定した。

11) ゼラチンの水解

ゼラチンを 0.4% の割合に加えた基礎培地平板で 72 時間培養後, 15% 塩酸酸性昇汞水を注加して集落周囲の透明帯の有無により判定した。

12) アルギン酸の分解

アルギン酸ソーダを 0.5% の割合に加えた基礎培地平板に 4 日間培養後, 70% エタノールを注加して集落周囲の透明帯の有無により判定した。

13) 寒天の分解

基礎平板培地に 14 日間培養後, 集落下の陥没溶解部の有無により判定した。

14) セルロースの分解

基礎液体培地に 3~4% の割合に carboxymethyl cellulose を加えた培地で 14 日培養し, 液化の有無により判定した。

15) 硝酸塩の還元

硝酸カリ加ペプトン水に 4 日間培養後, 2-naphthylamine 酢酸液および sulphanilic acid 酢酸溶液により亜硝酸の検出を行った。

16) 亜硝酸塩の還元

ペプトン水に 0.05% の割合に亜硝酸カリを加えた培地で 4 日間培養後, 上記 (15) の試薬により残存亜硝酸塩の検出を行なった。

17) トリメチルアミンオキシド (TMAO) の還元

Wood an Baird の改変培地を用い 4 日間培養後, Wood and Baird の方法によって TMA を検出した。

18) アンモニア産生

ペプトン水に 4 日間培養後, Nessler 試薬により生成アンモニアの検出を行なった。

19) リトマスミルク

リトマスミルク培地で14日間培養し、その間における培地の変化を観察した。

20) ウレアーゼ

Christensen の培地に供試菌を多量に接種し、2時間、4時間、12～18時間後に観察し、なお陰性のものは4日間培養を続け、培地のアルカリ化を観察した。

21) ホスファターゼ

基礎固型培地 100 ml に 1% phenolphthaleine diphosphate 水溶液 1 ml を加えて平板とし、これに画線培養した菌の発育が認められた後、平板面にアンモニア蒸気をかけ、遊離フェノールフタレンを発色させて判定した。

22) 発育温度

前報(田島ら, 1985)で記載した温度に加え、0℃, 5℃, 25℃ および 30℃ での発育の有無を観察した。

23) 食塩耐性

前報(田島ら, 1985)で記載した食塩濃度に加え、0.5% および 5% の割合に食塩を加えたペプトン水でそれぞれ7日間培養後、発育の有無を観察した。

24) BTB ティボール寒天培地での発育

BTB ティボール寒天培地(日本製薬)平板上での発育の有無と集落の色調を観察した。

25) マッコンキー寒天培地での発育

マッコンキー寒天培地(栄研化学)平板上での発育の有無と集落の色調の観察を行なった。

26) 炭水化物からの酸産生

前報(田島ら, 1985)で記載の炭水化物に加え Difco-OF 基礎培地でのラクトース、ソルビトール、トレハロース、マルトース、ガラクトース、フラクトース、リボースおよびキシロースからの酸の産生をみた。

27) 海水主要無機塩の要求性

日高(1964)の方法に準拠し、発育に対する無機塩の要求性を調べ、MHT 3 型の型別を行なった。

28) 色素産生能

基礎斜面培地で培養後、水溶性ならびに非水溶性色素産生の有無を観察した。

29) KCN 試験

0.5% の割合に KCN を加えた Edwards and Fife の培地に供試菌を接種後、ゴム栓を施し、4日間培養後、発育の有無を観察した。

30) 蛍光色素の産生

基礎斜面培地で4日間培養し、その間暗室中紫外線(365 nm)下で蛍光色素産生能を観察した。

31) 炭素源としてのグルコースの利用試験

Simmons の培地を改変し、クエン酸ナトリウムの代りに同量のグルコースを加えた培地における発育の有無を観察した。

32) 窒素源としてのカザミノ酸の利用

ビタミン不含カザミノ酸を1%の割合に添加した1%食塩溶液における発育の有無を観察した。

33) 炭素源としての基質利用性

Simmons の培地を改変した、リン酸2水素アンモニウム0.1%、リン酸1水素カリウム0.1%、硫酸マグネシウム0.02%、食塩1.0%および寒天1.5% (pH 7.4) の組成の培地にそれぞれ D-キシロース(和光純薬)、D-リボース(〃)、D-アラビノース(〃)、グルコース(〃)、フラクトース(〃)、

ガラクトース(〃), マルトース(〃), シュクロース(〃), マニトール(〃), トレハロース(〃), ソルビトール(〃), ラクトース(〃), イノシトール(〃), サリシン(〃), マンノース(〃), ビルビン酸(〃), フマル酸(〃), 乳酸(〃), 酢酸ナトリウム(〃), マロン酸ナトリウム(〃), コハク酸ナトリウム(〃), グルコン酸カリウム(〃), グリセロール(〃), デンブリン(〃), n-セタン(半井化学), L-グリシン(和光純薬), L-トリプトファン(〃), L-プロリン(〃), L-ロイシン(〃), L-アルギニン(〃), L-ヒスチジン(〃)およびL-グルタミン酸(〃)を0.1% また DL-3-オキシ-n-酪酸(和光純薬), DL-スレオニン(〃), DL-フェニルアラニン(〃), DL-アスパラギン(〃), DL-セリン(〃)およびDL- α -アラニン(〃)を0.2%, また安息香酸(和光純薬), p-オキシ安息香酸(〃)およびフェノール(〃)を0.01% になるように添加した平板培地に, 1/6 濃度人工海水に懸濁し, 20°C に一夜放置した供試菌をレプリカ法により接種し, 7日間培養後, 発育の有無を観察してそれぞれの基質利用性の有無を判定した。

3. 数値分類法

供試菌 103 株について, 前報(田島ら, 1985)において実施した検査項目を加えた計 162 項目の検査結果について, Sneath (1957 b) の式により 2 菌株間の相似度 (Similarity value, S 値) を計算し, それを%で示した。

$$S \text{ value } (\%) = \frac{N_s}{N_s + N_d} \times 100$$

N_s : 両菌株とも陽性の結果を示す項目数

N_d : 両菌株間で異なる結果を示す項目数

この S 値を基に, いわゆる相似度マトリックス (Similarity matrix) を作製し, マトリックス内で平均 S 値が 80% 以上を示す菌株群を phenon とし, 各 phenon 内および各 phenon 間の S 値の平均を求め, phenon 間の関係を検討した。さらに S 値 90% を基準として phenon 内を細群別し, それらについても相互の関係を比較した。

結果および考察

国内分離ビブリオ病原菌 74 株ならびに対照菌 29 株, 総計 103 株の供試菌の性状検査結果について数値分類を行なった。まず平均 S 値を求めて菌株の配列を決定し, S 値マトリックスを作製した (Fig. 1)。また単純連結法により成群操作を行ないそれを樹状図に示したのが Fig. 2 である。Fig. 1 および Fig. 2 にみられるように供試菌 103 株中 89 株は平均 S 値 80% 以上で phenon I ~ V の 5 群に群別された。

phenon I に包含された 64 株は, 前報(田島ら, 1985)で Bergey's manual 8th ed. に基づく同定結果から *V. anguillarum* と同定された菌株で, これらは *V. anguillarum* 標準株・対照株 12 株およびビブリオ病由来国内分離株 52 株から構成され *V. anguillarum* からなる group であることが確認された。phenon II は対照菌 NOAA V-1669 および MSC-275 を含む淡水サケ科魚類由来の *Vibrio* sp. 16 株, phenon III は対照菌 *V. metschnikovii* および *V. tyrogenes* の 2 株, phenon IV は対照菌の *V. parahaemolyticus* 4 株と *V. alginolyticus* 1 株の計 5 株, さらに phenon V はカタクチイワンおよびハマチ由来の 2 株から構成された。群を形成し得なかった 14 株中 6 株は国内分離株で, 前報(田島ら, 1985)の同定結果では 1 株が *V. anguillarum* 類似菌, 4 株は *V. anguillarum* と関連性のない *Vibrio* spp. 1 株は *Aeromonas* としたものであり, フェおよび海産魚由来のもので

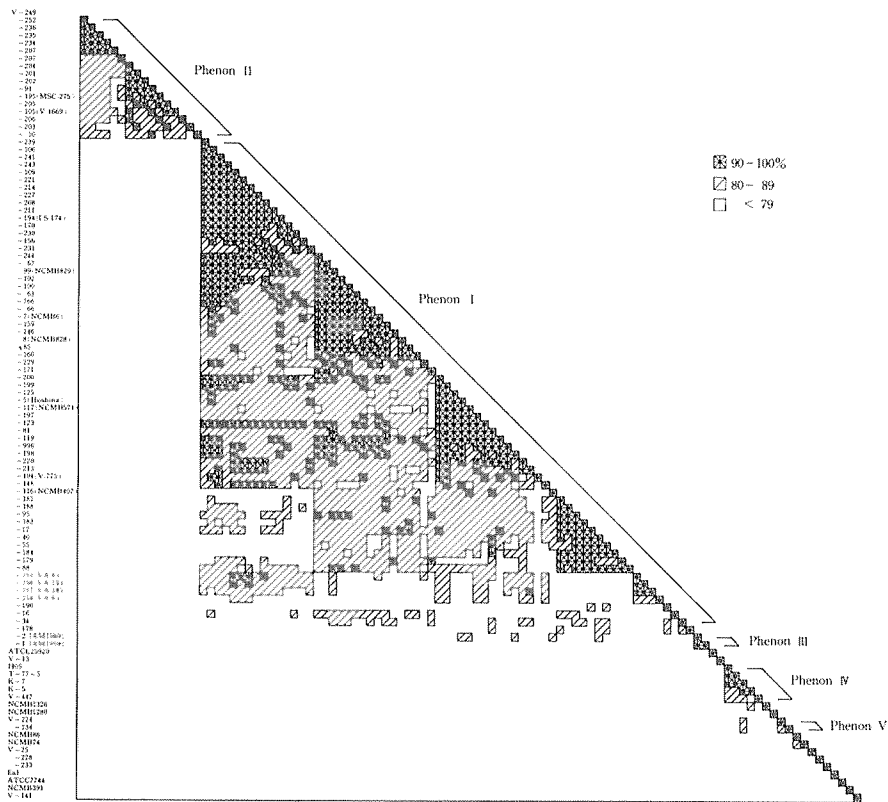


Fig. 1. Diagrammatic representation of S-value of 103 strains employed.

あった。また他の 8 株はビブリオ病魚由来以外の対照菌株であった。なお各 phenon および群非形成菌株の性状を Table 3 に示した。

次に 5 つの phenon 間の関係を知るために phenon 内および phenon 間の平均 S 値を、群を形成しなかった 14 株をも含めて Table 4 に示した。各 phenon とも phenon 内では 84% 以上の S 値を示しそれぞれの phenon は明らかに近縁の菌株から構成されていることが分った。phenon 間の関係についてみると、*V. anguillarum* で構成される phenon I は phenon III との間で S 値 69% と僅かに高い値を示すが、他の phenon との間では S 値はさらに低いものであった。phenon II は他の phenon との関連性が少なく、phenon I との間でも 57% にすぎなかった。一方 phenon IV と phenon V との間での S 値が 76% と比較的高い値を示した。このことは phenon V の 2 株は前報 (田島ら, 1985) で述べたように畑井ら (1975) がハマチから分離した *V. parahaemolyticus* に近似の性状を示した菌株であることを考えると当然のことと思われる。また群を形成しなかった 14 菌株と各 phenon との関連性においては、前報 (田島ら, 1985) で *V. anguillarum* 類似株と考えられた V-178 株が当然のことながら phenon I と 70% と比較的高い値を示した。他の V-13 株は phenon III と 72%, V-233 株は phenon V と 70% の S 値を示した。他の菌株には高い S 値を示す phenon は認められなかった。ビブリオ病魚由来以外の対照菌と各 phenon では、*B. campbellii* が phenon I, III および V と 70% 近い S 値を示し、また *A. proteolytica*, *L. harveyi* および *A. hydrophila* が phenon IV とそれぞれ 77%, 76% および 73% と比較的高い S 値を、さらに *L. harveyi* は phenon

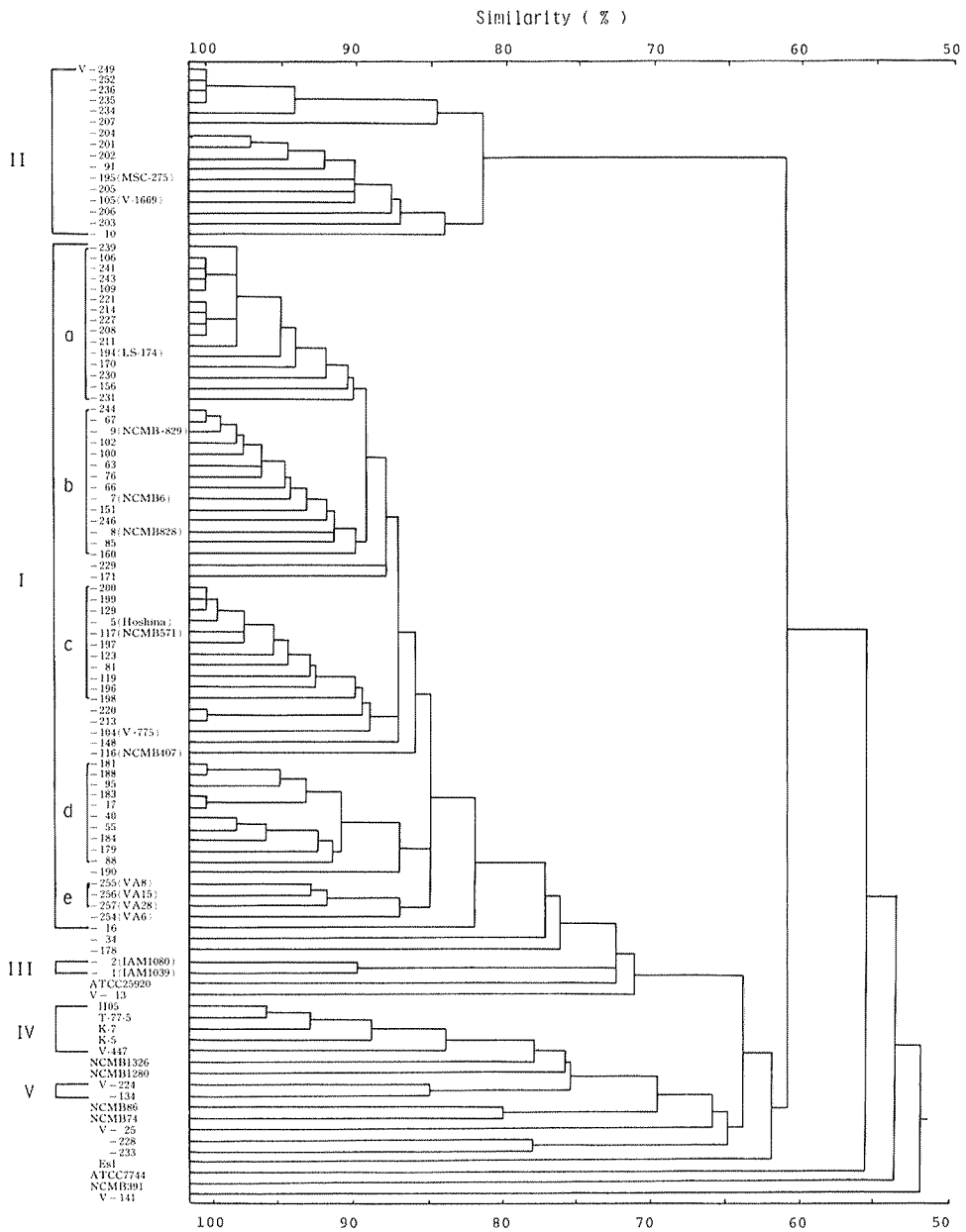


Fig. 2. Dendrogram based on average linkage of 103 strains employed.

Vとも76%の比較的高いS値を示した。他の菌株については特に相互に高いS値を示すものはみられず、各 phenon との類縁関係は低いものと思われる。なお対照菌株間では *B. campbellii* と *V. fischeri* が75%のS値を、また *A. hydrophila* と *A. punctata* とは当然のことながらS値80%と高い値を示した。

Table 3. Characteristics of the strains in each phenon and the strains not forming phenon

	No. of strains	phenon I	II	III	IV	V	V-178	V-13	V-25	V-228	V-233	V-141	<i>B. campbellii</i>	<i>A. proteolytica</i>	<i>L. harveyi</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. punctata</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. fischeri</i>	<i>P. mandapamensis</i>
		64	16	2	5	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Gram stain		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Motility		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole production		+	—	+	d	+	+	+	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	—	—
Hydrogen sulfide		—	—	—	+	+	—	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	—	—	—
Gelatin liquefaction		+	d	+	+	—	—	—	+	+	+	—	—	+	—	+	+	—	—	—
VP reaction		+	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—
MR test		+	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0/129 sensitivity		+	+	+	d	+	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+
Novobiocin	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+
Penicillin	"	+	d	+	—	—	+	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Chloramphenicol	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tetracycline	"	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Polymixin B	"	d	—	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+
Butanediol production		+	—	d	—	—	—	—	+	—	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—
" dehydrogenase		+	—	d	+	d	—	+	+	—	—	+	—	+	+	+	—	+	—	+
Gluconate oxidation		+	—	d	d	—	—	+	+	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—
Gelatin hydrolysis		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch	"	+	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Esculin	"	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	+	+	+	+	—
Chitin	"	d	+	+	+	d	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+	—	—	+
Casein	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
Tween 20	"	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80	"	+	—	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+
Alginate	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Agar	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cellulose	"	d	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
Citrate (Simmons.)		+	—	d	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
Nitrate reduction		+	d	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrite	"	—	—	—	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	—
TMAO	"	d	—	d	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ammonia production		—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Litmus milk (peptonize)		+	—	—	+	d	—	—	+	—	—	+	+	+	—	+	—	—	—	—
Urease		—	—	—	—	d	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
Phosphatase		—	—	—	+	+	—	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	+
Hemolysis		+	—	+	—	—	+	+	—	—	—	—	+	+	—	+	+	—	—	—
MHT type		H	H	H	H	H	H	H	T	H	H	M	H	H	H	T	T	T	H	H
KCN, growth in		—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—
Arginine decarboxylase		+	—	d	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	—	—	+
Lysine decarboxylase		—	—	—	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+
Ornithine decarboxylase		—	—	—	+	d	—	—	—	+	+	—	—	—	+	—	—	+	—	—
Luminescence		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+
Fluorescence		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pigment (insol.)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pigment (sol.)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Table 3. continued

		phenon I	II	III	IV	V	V-178	V-13	V-25	V-228	V-233	V-141	<i>B. campbellii</i>	<i>A. proteolytica</i>	<i>L. haregi</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. punctata</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. fischeri</i>	<i>P. mandapamensis</i>
No. of strains		64	16	2	5	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Growth at	0°C	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	5°C	+	d	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	37°C	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
	42°C	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
Growth in	0 % NaCl	-	-	-	-	d	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
	0.5% "	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	5 % "	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
	7 % "	-	-	d	+	d	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
	10 % "	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	BTB teepol agar	+	d	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	MacConky agar	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	Acid from arabinose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	lactose	-	-	d	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	sorbitol	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	sucrose	+	+	+	-	d	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
	inositol	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	salicin	-	d	-	-	d	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	trehalose	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	mannose	+	d	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	maltose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	fructose	+	+	d	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	OF test	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	O
	Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
	Utilization of																			
	xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
	arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	glucose	-	-	-	d	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	fructose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	galactose	-	-	-	d	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
	maltose	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
	sucrose	d	-	-	d	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
	mannitol	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	trehalose	-	-	-	d	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	sorbitol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 3. continued

	phenon I	II	III	IV	V	V-178	V-13	V-25	V-228	V-233	V-141	<i>B. campbellii</i>	<i>A. proteolytica</i>	<i>L. harveyi</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. punctata</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. fischeri</i>	<i>P. mandapamensis</i>
No. of strains	64	16	2	5	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
salicin	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
mannose	—	—	—	d	d	—	—	+	—	+	—	—	+	—	—	—	+	—	—
pyruvate	—	—	—	d	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
fumarate	—	—	—	+	d	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	+	+	—	—
lactate	—	—	—	d	d	—	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—
malonate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
succinate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
glycerol	—	—	—	+	+	—	—	+	—	—	—	—	+	—	+	+	+	—	—
ethanol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
gluconate	—	—	—	+	+	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—
starch	—	—	—	d	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	—	—
n-cetan	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
benzoate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
p-oxybenzoate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DL-3-oxy-n-butyrate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L-glycine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
L-tryptophan	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L-proline	—	—	d	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	+	—	—
L-leucin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L-arginine	—	—	—	d	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
L-histidine	—	—	—	+	d	—	—	+	—	—	—	—	+	—	+	+	+	—	—
L-glutamic acid	—	—	—	d	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	+	+	—	—
DL-threonine	—	—	—	d	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
DL-phenylalanine	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DL-aspartic acid	—	—	—	d	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—
DL-serine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DL- α -alanine	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—
phenol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
acetate	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—

+ or — : 80% positive or negative

d : different reaction given by different strain

M : Marine

H : Halophilic

T : Terrestrial

O : Oxidative

F : Fermentative

次に各 phenon 間の相違性状を Table 5 に示した。*V. anguillarum* で構成される phenon I に対する他 phenon との相違性状としては、phenon II とは主にインドール産生、アルギニンのアルカリ化反応およびツィーン 80 の分解、ソルビトールからの酸産生等の性状で、phenon III とはリジンの脱炭酸試験、アルギニンのアルカリ化反応および 42℃ での発育で、phenon IV とは III との相違性状に加えてオルニチンの脱炭酸試験、5℃ での発育および KCN 試験の性状で、さらに

Table 4. Intra- and inter-phenon mean similarities among each phenon and the strains not forming phenon

		phenon I	II	III	IV	V	V-178	<i>B. campbellii</i>	V-13	<i>A. proteolytica</i>	<i>L. harveyi</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. punctata</i>	V-25	V-288	V-233	<i>E. coli</i>	<i>V. fischeri</i>	<i>P. mandapamensis</i>	V-141
No. of strains		64	16	2	5	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
phenon	I	84																		
	II	57	87																	
	III	69	59	90																
	IV	58	39	53	89															
	V	62	47	52	76	85														
	V-178	70	65	68	46	58	100													
	<i>B. campbellii</i>	67	56	69	63	67	72	100												
	V-13	65	59	72	61	62	66	73	100											
	<i>A. proteolytica</i>	57	29	46	77	63	39	53	49	100										
	<i>L. harveyi</i>	57	42	53	76	76	50	64	62	56	100									
	<i>A. hydrophila</i>	60	33	53	73	63	55	56	59	65	61	100								
	<i>A. punctata</i>	49	30	46	66	60	38	51	51	56	64	80	100							
	V-25	47	28	41	62	52	33	37	40	59	47	67	57	100						
	V-288	57	53	56	54	61	58	70	57	41	60	47	46	33	100					
	V-233	56	56	57	59	70	60	60	57	41	63	47	48	38	78	100				
	<i>E. coli</i>	42	30	37	61	56	35	40	48	59	51	63	62	62	36	39	100			
	<i>V. fischeri</i>	49	56	58	43	50	60	75	54	30	50	37	32	27	55	56	31	100		
	<i>P. mandapamensis</i>	51	50	53	42	49	50	63	50	36	57	37	35	25	51	53	28	55	100	
	V-141	46	42	47	49	52	47	67	55	36	50	41	35	33	54	50	26	49	48	100

phenon V とはリジン・オルニチンの脱炭酸試験および5℃での発育等の性状で明らかに区別し得た。また他の phenon 間も Table 5 に示した性状で明確に区別し得た。

次に phenon I の構成菌株についてさらに詳細に検討するために平均 S 値 90% 以上で細区分を試み、Table 6 に示した。phenon I は I-a(15 株), I-b (NCMB 6, NCMB 828 および NCMB 829 を含む 14 株), I-c (NCMB 571 を含む 11 株), I-d (10 株) および I-e(外国分離対照菌 3 株) の 5 つの subgroup に細分された。 *V. ichthyoderms* 標準株 NCMB 407 を含む残りの 9 株はどの subgroup にも包含されなかった (Fig. 2)。これら subgroup について subgroup 内および subgroup 間の関係をみると各 subgroup 内では 92% 以上の S 値を示し、より近縁な菌群で構成されていることが窺われた。また各 subgroup 間については I-a, I-b, I-c の 3 者間にはほぼ同レベルの関係にあるが、I-d も I-b と I-c に近く、I-e は I-a に 84% の S 値を示したが、I-d と I-e の間では 62% と関連性が低かった。

次に供試菌のうち対照菌株を除く国内分離 74 株について各 phenon および subgroup に群別された菌株の由来魚種別について整理すると Table 7 に示す通りである。ビブリオ病原菌国内分離株で構成される phenon は phenon I, II および V で、subgroup では phenon I の I-a, I-b, I-c および I-d である。なお I-e に属す菌株はすべて国外分離の対照株で、ここでは除外した。同表に明らかな様に phenon I は淡水飼育のサケ科魚類を除く多くの魚種から分離されており、その中で

Table 5. Differential characteristics of phenons I-V

phenon	I	II	III	IV	V
No. of strains	64	16	2	5	2
Indol production	63/64*	—	+	+	+
Lysine decarboxylase	—	—	+	+	+
Arginine decarboxylase	57/64	—	—	—	—
Ornithine decarboxylase	—	—	—	+	+
Tween 80 hydrolysis	45/64	—	+	+	+
Nitrite reduction	—	—	—	+	+
Acid from					
inositol	5/64	—	+	—	—
sorbitol	61/64	—	—	—	+
Growth at 5°C	+	10/16	1/2	—	—
42°C	—	—	+	+	—
Growth in 7% NaCl	1/64	—	1/2	+	—
KCN, growth in	—	—	+	+	—

* ; No. of positive strains/No. of strains

Table 6. Intra- and inter-subgroup mean similarities in phenon I

Subgroup	I-a	I-b	I-c	I-d	I-e
No. of strains	15	14	11	10	3
I-a	94				
I-b	88	94			
I-c	87	87	94		
I-d	76	85	84	92	
I-e	84	73	78	62	92

I-a のアユの 1 株を除くとギンマス、モジャコおよびハマチ等海産魚由来株が構成の主体をなした。I-b および I-d はアユ由来の菌株でのみ構成されており、これら各菌株の由来するアユの飼育環境(淡水・海水)についてみると、淡水飼育魚由来の菌株が多い傾向がみられた。I-c はアユ、ウナギおよびハマチ由来株で構成されていた。また phenon II はニジマス、ヤマベおよびアマゴ等すべて淡水飼育のサケ科魚類由来株であったが、phenon V はモジャコおよびカタクチイワシ等の海産魚由来の菌株であった。

ところで前報(田島ら, 1985)において国内分離株で *V. anguillarum* あるいは *V. anguillarum* 類似菌と同定された菌株との関連性について数値分類の結果を基に整理したのが Table 8 である。phenon I の 52 株の構成をみると、*V. anguillarum* と同定されたものが 31 株、*V. anguillarum* 類似菌としたものが 21 株で、さらに subgroup における両者の分布をみると、*V. anguillarum* 類似菌は subgroup I-c および I-d に多く含まれる傾向がみられるものの I-a および I-b にも含まれ、一方 *V. anguillarum* としたものは I-c および I-d にも多数含まれた。すなわち前報(田島ら, 1985)において Bergey's manual 8th ed. 記載の *V. anguillarum* との性状の比較において、若干の性状

Table 7. Origine of the isolates classified to phenon I, II and V

Subgroup	I-a	I-b	I-c	I-d	I-o*	II	V	None	Total
No. of strains	14	11	9	10	8	14	2	6	74
Yamabe						3			3
Rainbow trout						10		1	11
Amago						1			1
Coho salmon	5								5
Ayu	1	11	4	10	4			2	32
Eel			3						3
Yellowtail	3		2		2			1	8
Mojako	5				1		1		7
Amberjack					1				1
Red sea bream								1	1
Anchovy							1	1	2

*: strains not include any subgroup

Table 8. Distribution of the strains *V. anguillarum* and *V. anguillarum* like isolated from fish vibriosis in subgroup I-a~I-e

	No. of strains 52	<i>V. anguillarum</i> 31	<i>V. anguillarum</i> like 21
I-a	14	10	4
I-b	11	9	2
	2*	2	0
I-c	9	5	4
	3	2	1
I-d	10	3	7
	1*	0	1
I-e	0	0	0
	2*	0	2

*: strains not include any subgroup

の相違から *V. anguillarum* と *V. anguillarum* 類似菌に群別したが、本報の数値分類においては両菌群は分別されないことから、類似菌とした菌群は *V. anguillarum* に包含され得るものと考ええる。ただ前報(田島ら, 1985)において *V. anguillarum* 類似菌とした V-178 株については、5℃, 37℃での発育、アルギニンのアルカリ化反応等 9 種の性状検査結果で phenon I. *V. anguillarum* と相違したことから数値分類では phenon I に包含されなかったが、前述した様に群を形成しなかった菌株の中では phenon I に対し S 値 70% と比較的高い値を示した。

Harrell ら(1976)や Schiewe ら(1977)はサケ科のビブリオ病魚由来株について血清学および DNA 相同性 (DNA-DNA homology) の検討から、従来の *V. anguillarum*, すなわち著者らの phenon I に相当する菌群ならびにこれらと一般性状、DNA 相同性等で若干異なるが血清学的には一致する菌群(著者らの phenon II に相当)に 2 分し、前者を *V. anguillarum* biotype 1 とし、後者を biotype 2 とすることを提案した。Schiewe ら(1981)はさらに plasmid DNA による DNA 相同性からも両者の違いを報告した。そして同年 Schiewe ら(1981)は *V. anguillarum* biotype 2 を *V. ordalii* なる新種として提案している。この両者の関係は Fig. 1 および Fig. 2 にみられるよう

Table 9. Comparison of characteristics of phenon I (*V. anguillarum*) and phenon II (*Vibrio* sp.)

Characteristics	phenon I	phenon II
Gram stain	—	—
Single polar flagellum	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
OF test	F	F
Gas from glucose	—	—
Sensitivity to 0/129	+	+
" penicillin	—	d
Acid from fructose	+	+
galactose	+	+
mannose	+	d
maltose	+	+
mannitol	+	+
sucrose	+	+
ribose	+	+
lactose	—	—
xylose	—	—
salicin	—	d
Gelatin hydrolysis	+	d
Casein "	+	+
Tween 80 "	+	—
Starch "	+	—
Esculin "	—	—
NO ₃ reduction	+	d
Indol production	+	—
VP reaction	+	—
Citrate utilization	+	—
2, 3 butanediol	+	—
Arginine decarboxylase	+	—
Lysine decarboxylase	—	—
Ornithine decarboxylase	—	—
Hydrogen sulfide	—	—
MHT type	H	H
Growth in 7% NaCl	—	—
Growth at 42°C	—	—

+ or — : 80% positive or negative

d : different reaction given by different strain

F : Fermentative

H : Halophilic type

に、本報の数値分類の結果においても両者は明らかに独立した群を形成し、両菌群は Schiewe ら (1981) の提案のように別種とも思われる。そこで両菌群の関連性についてさらに著者らの検査性状から検討を試みた。Table 9 に phenon I (64 株) および phenon II (16 株) の主なる性状を示した。両菌群は、ツーン 80 の分解、デンプンの分解、インドール産生、VP 反応、クエン酸塩の利用、2, 3-ブタンジオールの産生およびアルギニンのアルカリ化反応等の性状で相違した。ここで注目すべき点は両菌群のこれら相違性状はすべて phenon I が陽性で、phenon II が陰性を示すことであり、phenon II は phenon I の変異株か、あるいはプラスミッドの関与した変化とも考えられる。従って Schiewe ら (1981) の提案を肯定するためにはさらに検討が必要と思われる。なお前述の *V. anguillarum* biotype 1 および biotype 2 は Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 1 (1984) では *V. anguillarum* biovar I および biovar II として記載されている。

要 約

前報 (田島ら, 1985) の結果に基づいて、ビブリオ病原菌国内分離株 219 株から可能な限り由来の異なる菌株 74 株を選び、これに対照菌株 29 株を加え数値分類を試み、以下の結果を得た。

1. 供試菌 103 株中 89 株は S 値 80% 以上で phenon I~V の 5 群に群別され、phenon I はさらに S 値 90% 以上で I-a~I-e の 5 群に細群別された。

2. phenon I は前報 (田島ら, 1985) の分類で *V. anguillarum* に同定された 64 株からなり、phenon II は淡水飼育のサケ科魚類由来の 16 株、phenon III は対照株の *V. metschnikovii* と *V. tyrogenes* の 2 株、phenon IV は対照株の *V. parahaemolyticus* と *V. alginolyticus* の 5 株、phenon V はカタクタイワシ、ハマチ由来の 2 株から形成された。群を形成しない 14 株中 6 株はアユおよび海産魚由来のものであり、8 株はビブリオ病魚以外の対照株であった。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費補助金ならびに日本学術振興会の日米科学協力共同研究によってなされたことを付記し謝意を表する。

文 献

- Harrell, L.W., A.J. Novotny, M.H. Schiewe and H.O. Hodgins (1976): Isolation and description of two vibrios pathogenic to Pacific salmon in Puget Sound, Washington. *Fish Bull.* (U.S.), **74**, 447-449.
- 畑井喜司雄, 岩橋義人, 江草周三 (1975): 養殖ハマチ病魚より分離した腸炎ビブリオについて, 魚病研究, **10**, 31-37.
- 日高富男 (1964): 海洋細菌に関する研究-I. 無機塩要求について陸棲細菌との比較, 鹿大水産学部紀要, **12**, 135-152.
- Krieg, N.R. and J.G. Holt (1984): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology volume 1. Williams and Wilkins Co. Baltimore/London.
- 坂崎利一 (1967): 培地学各論(1), 232 p. 納谷書店, 東京.
- Schiewe M.H., J.H. Crosa and E.J. Ordal (1977): Deoxyribonucleic acid relationships among marine vibrios pathogenic to fish. *Can. J. Microbiol.*, **23**, 954-958.
- Schiewe, M.H. and J.H. Crosa (1981): Molecular characterization of *Vibrio anguillarum* biotype 2. *Can. J. Microbiol.*, **27**, 1011-1018.
- Schiewe, M.H., T.J. Trust and J.H. Crosa (1981): *Vibrio ordalii* sp. nov.: A causative agent of

- vibriosis in fish. *Current. Microbiol.*, **6**, 343-348.
- Sneath, P.H.A. (1957a): Some thoughts on bacterial classification. *J. gen. Microbiol.*, **17**, 184-200.
- Sneath, P.H.A. (1957b): The application of computers to taxonomy. *J. gen. Microbiol.*, **17**, 201-226.
- 田島研一, 絵面良男, 木村喬久(1985): ビブリオ病原菌の分類学的研究-I. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th ed. (1974) による分類上の位置の検討, 北大水産彙報, **36**(4), 216-230.
- 柳沢文徳 (1964): キチナーゼについて, 『腸炎ビブリオ』藤野恒三郎・福見秀雄編 445 p. 一成堂, 東京.