

7) 冷水病生菌の各種動物血球に対する凝集活性

金辻宏明

【目的】

冷水病菌体の表面抗原を解析する場合、感染耐過魚血清との反応性で解析する他の手法として、冷水病菌体の動物血球との凝集活性を調べる方法がある。本法では6種類の動物血球を用いて冷水病生菌との凝集活性を調べたので報告する。

【方法】

供試菌には1999年3月2日に冷水病で死亡したアユの腎臓から分離した*F. psychrophilum* SG990302株および1995年に冷水病で死亡したアユの腎臓から分離された*F. psychrophilum* CS-1株を用いた。培養は改変サイトファーガ寒天培地を用いて4℃で継代したものを50mLの改変サイトファーガ液体培地(MCY)および0.85%塩化ナトリウムを含むMCYに接種して15℃で24時間振盪(100rpm)して行った。なお、菌液は供試直前に常法にしたがって生菌数を測定した。供試生菌の各種動物血球に対する凝集活性は次のようにして調べた。供試血液にはウマ、ヒツジ、ウサギ、モルモット、ガチョウ、ニワトリの各保存血液〔ジャンラム〕を用いた。保存血液は1,600×gで5分冷却遠心して上清を取り除き、0.1%クエン酸ナトリウムを含むリン酸(Na₂HPO₄-NaH₂PO₄)緩衝食塩(0.85%)水(PBS)pH7.0に再浮遊させ、同様に冷却遠心を行って洗浄した。これを2回繰り返し、PBSに再浮遊させて冷却遠心して洗浄後、PBSで血球が0.5%になるように浮遊させて血球浮遊液とした。次に、V底のマイクロタイタープレート〔Costar〕に50μLのPBSを加え、供試生菌50μLを加えて2倍段階希釈系列を作製した。この希釈系列に各種動物の血球浮遊液を50μL加えて4℃で16時間静置し、凝集の有無を判定した。

【結果】

供試菌液の生菌数を表1に、各種動物に対する凝集反応を調べた結果を表2に示した。試験に用いた菌液の生菌数は塩化ナトリウムを含まないMCYの方が含むMCYよりも2倍程度の増殖を示していた。この生菌の各種動物血球に対する凝集活性はウサギとヒツジで検出された。ウサギ血球に対しては塩化ナトリウムを含まないMCYではSG990302株とCS-1株でそれぞれ1:16および1:8とやや高く、塩化ナトリウムが含まれるMCYで培養すると凝集活性は低下した。この結果から、冷水病菌の動物に対する凝集活性はウサギ血球で検出可能で、さらにMCYへの塩化ナトリウム添加の有無で凝集活性が変化したことから培養条件と冷水病菌体表面の変化を調べるバロメーターになり得ることが明らかとなった。なお、この反応はレクチン活性ではないかと推察されるが、このことは糖阻害試験を行って明らかにする必要があると考えられる。

表1. MCYおよび0.85%NaClを含む培地で培養したときの冷水病菌体の生菌数

供試菌株	培地	生菌数
		× 10 ⁹ CFU/mL
SG990302	MCY	4.4
〃	NaCl-MCY	2.0
CS-1	MCY	4.3
〃	NaCl-MCY	2.5

表2. 冷水病生菌の各種動物に対する凝集反応性

供試菌株	培地	凝集活性(1:)					
		ウマ	ヒツジ	ウサギ	モルモット	ガチョウ	ニワトリ
SG990302	MCY	<2	2	16	<2	<2	<2
〃	NaCl-MCY	<2	<2	2	<2	<2	<2
CS-1	MCY	<2	<2	8	<2	<2	<2
〃	NaCl-MCY	<2	<2	2	<2	<2	<2