

## 8) 冷水病菌の培養方法の違いによる抗原性の変化について I

### Tween80、ブタゲラチンまたはフィッシュゲラチン添加の影響

金辻宏明

#### 【目的】

前報で冷水病菌の有する凝集活性がウサギ赤血球で調べられることを報告した。また筆者はこれまでに冷水病菌を改変サイトファーガ培地に脂質(Tween80)やタンパク質(ブタゲラチン)を添加すると増殖量が増加することを報告した。本報ではこの培地添加剤の併用によるウサギ血球に対する凝集活性への影響および感染耐過魚血清との反応性の変化について検討した。

#### 【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*Flavobacterium 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。種菌液の培養は改変サイトファーガ寒天培地を用いて4°Cで継代した供試菌株を50mLの改変サイトファーガ液体培地(MCY)に接種して15°Cで24時間振盪(100rpm)して行った。試験用培地は表1に示すようにTween80〔Difco〕、硬骨魚類由来ゲラチンTypeA〔Sigma, G-7041〕およびブタゲラチン〔和光純薬, 077-03155〕を用い、表1に示す濃度になるようにMCY 50mLに加えて調製した。試験培養は試験用培地50mLに培養種菌液500  $\mu$ Lを加え、15°Cで24時間振盪(100rpm)して行った。凝集活性にはこの培養生菌液および0.3%量のホルマリン(150  $\mu$ L/50mL MCY)を加えて4°Cで24時間固定したホルマリン不活化死菌(FKC)を用い、前報<sup>\*)</sup>と同様にしてウサギ赤血球〔ジャパンラム〕に対する凝集活性を調べた。

#### 【結果】

試験培養時の生菌数を表1に、ウサギ赤血球に対する生菌およびFKCの凝集活性を表2に示した。試験培養後の生菌数測定結果から、高濃度になるとやや増殖に影響を及ぼした。つぎに、試験培養液およびそのFKCのウサギ赤血球に対する凝集活性を調べたところ、Tween80を0.1%以上添加すると凝集活性は1:8から1:256~512に大きく上昇した。また、凝集におよぼすホルマリン固定の影響は認められなかった。またブタゲラチンの添加でも0.1%以上の添加で凝集活性は上昇し、凝集におよぼすホルマリンの影響も認められなかった。硬骨魚類由来ゲラチンの添加では凝集活性の変化は認められなかった。

以上の結果から、冷水病菌は培養時の脂質やタンパク質の添加によってウサギ赤血球に対する凝集活性が大きく変化する、すなわち表面抗原を容易に変化させることが明らかとなった。また、ゲラチンの種類によっては全く変化を示さないことも明らかとなり、この菌体表面の変化を今後詳細に検討する必要があると考えられる。

※) 金辻宏明：冷水病生菌の各種動物血球に対する凝集活性，平成15年度滋賀水試事報，in press, (2004).

表1. Tween 80 またはゲラチンを含むMCYで培養した冷水病菌体のウサギ赤血球に対する凝集活性測定時の菌数(CFU/mL)

培地添加成分	濃度(%)	Strain	
		SG990302	CS-1
		× 10 <sup>9</sup> CFU/mL	× 10 <sup>9</sup> CFU/mL
Tween 80	0.001	2.1	3.3
	0.01	2.0	3.7
	0.1	2.1	3.1
	0.2	1.7	3.1
Fish Gelatin	0.01	2.3	3.2
	0.1	2.4	3.1
	0.5	1.7	2.4
Porcine Gelatin	0.01	2.8	2.8
	0.1	2.4	2.8
	0.5	2.0	2.7
	1	2.6	2.6
MCY	—	2.4	3.3

表2. Tween 80 またはゲラチンを含むMCYで培養した冷水病菌体のウサギ赤血球に対する凝集活性(1: )

培地添加成分	濃度(%)	Strain			
		SG990302		CS-1	
		Live cell	FKC	Live cell	FKC
Tween 80	0.001	8	16	8	8
	0.01	8	16	8	8
	0.1	256	256	256	512
	0.2	256	512	256	512
Fish Gelatin	0.01	8	8	8	8
	0.1	8	16	8	8
	0.5	8	8	8	8
Porcine Gelatin	0.01	8	16	8	4
	0.1	16	16	16	16
	0.5	64	64	128	128
	1	64	64	128	128
MCY	—	8	8	8	8
	—	8	8	8	8