

9) 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 II

Tween 80およびブタ由来ゲラチン混合添加の影響

金辻宏明

【目的】 前報で冷水病菌の細胞表面由来の凝集活性がウサギ赤血球で調べられること、冷水病菌を改変サイトファーガ培地(MCY)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。本法では前報に引き続き、このTween80とブタゲラチンの混合がウサギ血球に対する凝集活性に影響するか、また感染耐過魚に対する抗原性に影響をおよぼすかどうかについて検討した。

【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。試験用培地にはTween 80〔Difco〕およびブタゲラチン〔和光純薬, 077-03155〕を用い、表1に示す濃度にしながらって単一もしくは2種類をMCY 50mLに加えて調製した。種培養および試験用培地での培養(培養直後の630nmの菌液濁度も測定)は前報^{*1)}と同様とし、0.3%量のホルマリンを加えて4℃で24時間固定(FKC)した。凝集活性測定は前報^{*1)}と同様にしてウサギ赤血球を用いて調べた。FKCの感染耐過アユ血清^{*3)}に対する反応性は、FKC液を50mM酢酸緩衝液pH4.5で1,000倍希釈して100 μ Lをマイクロタイタープレート〔Costar〕に加えて固相化し、前報^{*2)}と同様にして洗浄、ブロッキング、洗浄、感染耐過アユ血清と反応、洗浄、酵素標識抗体と反応、洗浄、発色、停止を行い、490nmの吸光度を測定した。また、本試験は固相化抗原の量が異なるため、図1に示すように補正式で補正して抗原性の変化を判断した。

【結果】 Tween 80およびゲラチンを添加した冷水病菌体のウサギ赤血球に対する凝集活性測定結果を表1に示した。その結果、Tween 80の濃度が増加するにしたがってウサギ赤血球に対する凝集活性も増加した。しかし、ゲラチンの添加で凝集活性は低下し、ゲラチンが1%になるとやや凝集活性は回復したがTween 80だけの時よりも低かった。次に、培養終了直後の菌液濁度を表2に、抗原性解析結果を表3に、抗原性の濁度結補正結果を図1に示した。濁度は前回^{*4)}と同様に通常MCY培地で培養したときよりやや高濃度を示した。冷水病感染耐過アユ血清との反応性をELISAで検討したところ、Tween 80濃度で0.001~0.002%、ゲラチンで0.01%程度をMCYに添加すると最も高くなった。また2種類の菌株間でも同様の結果であった。以上の結果から、冷水病菌のウサギ赤血球に対する凝集活性はTween 80やゲラチンを加えて培養すると上昇するが、両者の併用による凝集活性の増加は低くTween 80だけの添加の方が高くなることが明らかとなった。また、両者の培地成分の添加によるウサギ赤血球の凝集活性と抗原性の間には相関性はないと推察された。

※1) 金辻宏明：冷水病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).

※2) 金辻宏明：冷水病菌のELISA検出時の菌体抗原の固相化条件に伴う抗原性の低下，in press, (2004).

※3) 金辻宏明・二宮浩司・山本充孝・遠藤誠：冷水病耐過アユの抗病性，平成14年度滋賀水試事報，204-205, (2003).

※4) 金辻宏明：アユ冷水病菌の溶血物質産生におよぼす培地基材の影響III Tween80(脂質)，平成14年度滋賀水試事報，240-241, (2003).

表1. Tween 80 およびゲラチンを含む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:)

Tween 80濃度(%)	ゲラチン濃度(%)									
	0					1				
	0	0.01	0.1	0.5	1	0	0.01	0.1	0.5	1
	SG990302株					CS-1株				
0	4	16	16	64	64	4	4	16	128	128
0.001	16	8	8	16	16	8	4	8	16	16
0.01	16	4	4	8	8	8	4	8	16	32
0.1	256	16	16	16	32	256	32	32	32	32
0.2	512	16	32	64	128	256	16	32	64	128

表2. Tween 80 およびゲラチンを含むMCYで培養したときの冷水病菌体の菌液濁度(630nm)

Tween 80濃度(%)	ゲラチン濃度(%)									
	0					1				
	0	0.01	0.1	0.5	1	0	0.01	0.1	0.5	1
	SG990302株					CS-1株				
0	0.32	0.34	0.36	0.36	0.36	0.29	0.36	0.37	0.36	0.35
0.001	0.31	0.35	0.35	0.34	0.32	0.36	0.37	0.38	0.37	0.37
0.01	0.3	0.33	0.35	0.34	0.33	0.31	0.37	0.37	0.37	0.33
0.1	0.31	0.34	0.32	0.34	0.33	0.38	0.37	0.37	0.37	0.35
0.2	0.32	0.34	0.34	0.33	0.33	0.38	0.35	0.36	0.36	0.32

濁度は菌液200μLを96穴プレートに加えて測定.

表3. Tween 80 およびゲラチンを含むMCYで培養した冷水病菌体の感染耐過アユ血清に対する反応性(ELISAによる490nmの吸光度)

Tween 80濃度(%)	ゲラチン濃度(%)									
	0					1				
	0	0.01	0.1	0.5	1	0	0.01	0.1	0.5	1
	SG990302株					CS-1株				
0	0.18	0.17	0.14	0.12	0.11	0.08	0.12	0.10	0.07	0.09
0.001	0.26	0.26	0.24	0.20	0.20	0.23	0.24	0.20	0.16	0.18
0.01	0.23	0.24	0.21	0.18	0.18	0.20	0.22	0.21	0.18	0.18
0.1	0.11	0.11	0.10	0.10	0.10	0.15	0.14	0.14	0.14	0.13
0.2	0.09	0.09	0.09	0.08	0.08	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10

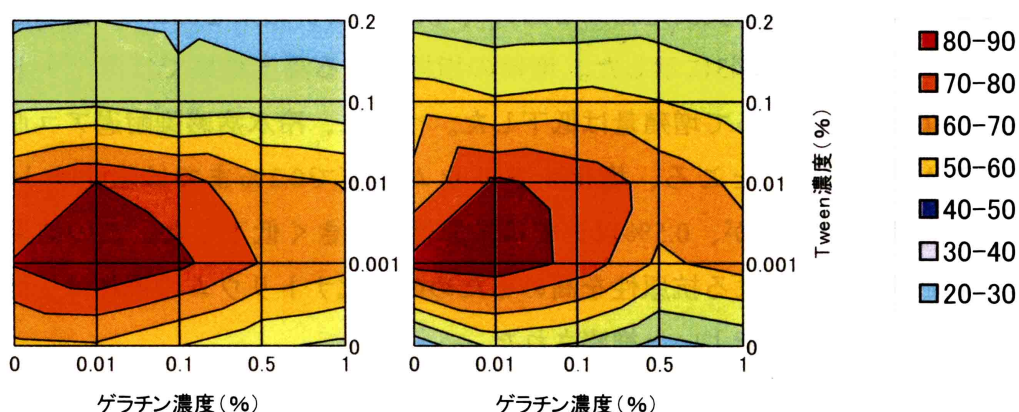


図1. 酵素抗体免疫測定法(ELISA)による菌株の異なる冷水病FKCと冷水病水平感染耐過アユ血清の反応性(補正後).

補正式: (ELISA490nm値/濁度630nm値) × 1000.