

# 1 1) 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 IV 金属イオン添加の影響

金辻宏明

## 【目的】

前報で脂質やタンパク質を培地に添加すると冷水病水平感染耐過アユ血清との反応性は上昇するが、冷水病菌のウサギ赤血球に対する凝集活性と相関しないことを報告した。本報では冷水病菌の抗原性におよぼす金属イオン添加の影響について検討した。

## 【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。試験用培地には表1に示す濃度で硫酸コバルト(Co)、硫酸亜鉛(Zn)、ピロリン酸鉄(ピロFe)、硫酸第一鉄(Fe)、硫酸マンガン(Mn)および硫酸マグネシウム(Mg)を改変サイトファーガ培地(MCY)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<sup>\*1)</sup>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。FKCの感染耐過アユ血清<sup>\*2)</sup>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 μLをマイクロタイタープレート〔Costar〕に加えて固相化し、前報<sup>\*3)</sup>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、表3に示すように補正式で補正して抗原性を判断した。

## 【結果】

培養終了直後の菌液濁度測定結果を表1に、抗原性解析結果を表2に、抗原性結果を濁度結果で補正した結果を表3におよび図1に示した。増殖の指標となる濁度結果では硫酸マグネシウムおよび硫酸マンガンの濃度が高くなると冷水病菌の増殖に影響を及ぼしたが、そのほかは影響はなかった。つぎに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、無添加のMCYで培養したときの抗原性を大きく超える添加物は認められなかった。ゆえに、感染耐過アユの認識による抗原性を高めるために金属イオンを添加しても特に付与効果は認められないと考えられた。

---

※1) 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).  
※2) 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).  
※3) 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).

表1. 金属イオンを添加したMCY培地で培養した冷水病菌体の菌液濁度(630nm)

添加金属	添加濃度(%)							
	0.001	0.0005	0.0001	0	0.001	0.0005	0.0001	0
	SG990302株				CS-1株			
Co	0.175	0.157	0.166	—	0.196	0.182	0.184	—
Zn	0.161	0.166	0.161	—	0.189	0.187	0.183	—
Li <sup>+</sup> Fe	0.165	0.168	0.163	—	0.195	0.195	0.197	—
FeSO <sub>4</sub>	0.166	0.166	0.170	—	0.193	0.187	0.191	—
Mn	0.056	0.085	0.175	—	0.040	0.073	0.200	—
Mg	0.056	0.186	0.175	—	0.036	0.193	0.189	—
MCY				0.171				0.183

表2. 金属イオンを添加したMCY培地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)

添加金属	添加濃度(%)							
	0.001	0.0005	0.0001	0	0.001	0.0005	0.0001	0
	SG990302株				CS-1株			
Co	0.072	0.077	0.069	—	0.041	0.058	0.055	—
Zn	0.053	0.063	0.068	—	0.042	0.048	0.056	—
Li <sup>+</sup> Fe	0.060	0.063	0.065	—	0.033	0.043	0.031	—
FeSO <sub>4</sub>	0.063	0.067	0.069	—	0.028	0.032	0.039	—
Mn	0.027	0.039	0.080	—	0.016	0.029	0.063	—
Mg	0.016	0.081	0.076	—	0.011	0.035	0.047	—
MCY				0.077				0.054

表3. 金属イオンを添加したMCY培地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(濁度補正後)

添加金属	添加濃度(%)							
	0.001	0.0005	0.0001	0	0.001	0.0005	0.0001	0
	SG990302株				CS-1株			
Co	41.1	49.0	41.6	—	20.9	31.9	29.9	—
Zn	32.6	37.7	41.9	—	22.0	25.7	30.3	—
Li <sup>+</sup> Fe	36.1	37.2	39.9	—	16.9	21.8	15.7	—
FeSO <sub>4</sub>	37.7	40.4	40.6	—	14.5	17.1	20.2	—
Mn	47.3	45.9	45.4	—	40.0	39.0	31.3	—
Mg	28.6	43.3	43.4	—	29.2	18.1	24.9	—
MCY				44.7				29.5

補正式: (ELISA490nm値/濁度630nm値) × 100.

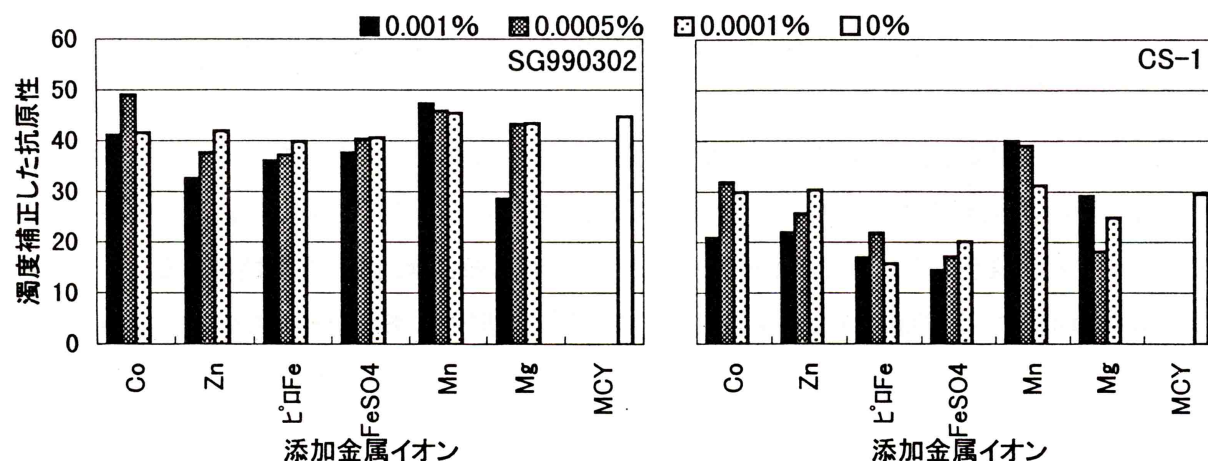


図1. 金属イオンを添加したMCY培地で培養した冷水病菌体の感染耐過アユ血清に対する反応性(濁度補正後).

補正式: (ELISA490nm値/濁度630nm値) × 100.