

1 2) 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 V

いくつかのアミノ酸、ビタミン添加の影響

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及ぼすアミノ酸、ビタミン等の添加の影響を検討した。

【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株を用いた。試験用培地には表1に示す濃度でL-システイン、グリシン、L-リシン、L-グルタミン酸マグネシウム、L-フェニルアラニン、クレアチン、葉酸、ビタミンB₁、ビタミンB₂、ビタミンC(L-アスコルビン酸)、ビタミンK₃(メナジオン) [Sigma, M5750]、胆汁末 [和光純薬, 073-00092]、ウシ血清アルブミン [Sigma, A-3803]、ヘモグロビン [和光純薬] および亜硫酸ナトリウム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^{*1)}と同様とし、0.3%量のホルマリンを加えて4°Cで24時間固定(FKC)した。FKCの感染耐過アユ血清^{*2)}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^{*3)}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を判断した。

【結果】 培養液調製時のpH、培養直後の濁度、生菌数および感染耐過魚血清と反応させたときの抗原性解析結果を表1に示し、抗原性結果を濁度結果で補正した結果を図1に示した。増殖の指標となる濁度結果、生菌の検出ではL-システイン、L-フェニルアラニン、ビタミンK₃および亜硫酸ナトリウムで特に抑制され、ビタミンK₃と亜硫酸ナトリウムでは生菌は全く検出されなかった。その他はやや抑制されるものもあるが、グリシン含MCYを除きおおむね 1×10^9 CFU/mL以上の濃度に増殖した。また、感染耐過アユ血清を用いた抗原解析結果ではグリシンとヘモグロビンを添加したMCYで抗原性が増加傾向を示した。グリシンの添加で抗原性が大きく上昇していることから抗原性のあるタンパク質合成に必須である可能性もあり、今後詳細に検討する必要がある。ヘモグロビンの添加は前報^{*4)}と同様にタンパク質としての作用で抗原性に影響を与えたのではないかと推察された。なお、ビタミン類の添加は生育を抑制し、抗原性の付与には効果がないと考えられた。

※ 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)。

※ 4) 金辻宏明：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 およびブタ由来グラチン混合添加の影響，平成15年度滋賀水試事報，in press，(2004)。

表1. アミノ酸、ビタミンなどを添加したMCY培地で培養した冷水病菌体の菌液濁度、生菌数および感染耐過アユに対する反応性(ELISAによる490nmの吸光度)

添加物	添加量	培地調整時pH	濁度		生菌数	ELISA値
			630nm	490nm	× 10 ⁹ CFU/mL	490nm
L-システイン	1mg/mL	3.93	0.007	0.00000002		
グリシン	1mg/mL	7.14	0.052	0.3	0.083	
L-リシン	1mg/mL	7.04	0.131	1.77	0.133	
L-グルタミン酸Na	1mg/mL	7.16	0.137	2.35	0.107	
フェニルアラニン	1mg/mL	7.13	0.007	0.00001		
クレアチン	1mg/mL	7.17	0.103	1.8	0.127	
葉酸	20 μg/mL	7.13	0.129	1.94	0.127	
ビタミンB1	20 μg/mL	7.15	0.132	1.77	0.119	
ビタミンB2	20 μg/mL	7.22	0.035	0.308		
ビタミンC	20 μg/mL	7.20	0.145	2.72	0.075	
ビタミンK3	20 μg/mL	7.16	0.006	0		
胆汁末(0.0001%)	2 μg/mL	7.21	0.141	2.36	0.121	
胆汁末(0.001%)	20 μg/mL	7.21	0.137	2.39	0.131	
ウシ血清アルブミン	1mg/mL	7.07	0.104	1.39	0.111	
ヘモグロビン	0.1mg/mL	7.20	0.098	1.14	0.130	
亜硫酸Na	1mg/mL	6.07	0.005	0		
MCY	—	7.20	0.143	3.52	0.133	

使用菌株: SG990302株

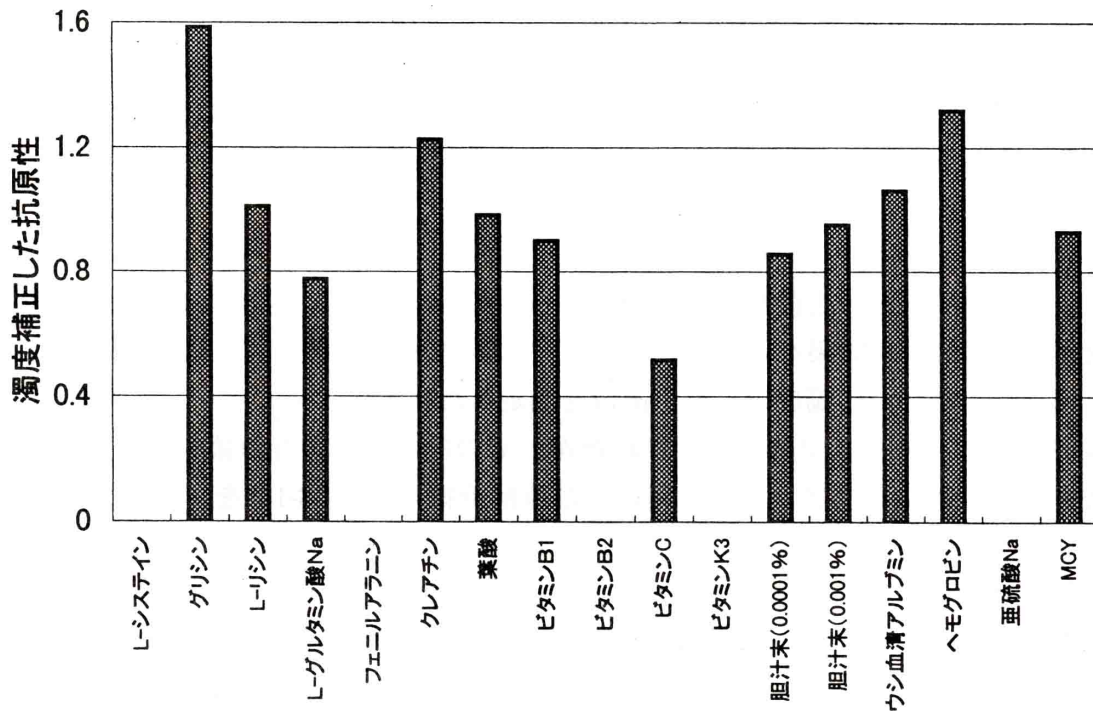


図1. アミノ酸、ビタミンなどを添加したMCY培地で培養した冷水病菌体の感染耐過アユ血清に対する反応性(濁度補正後).

補正式: (ELISA490nm値/濁度630nm値) × 100.