

### 1 3) 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 VI

#### いくつかのアミノ酸、糖類等添加の影響

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、冷水病菌の細胞表面由来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芳香族アミノ酸、糖類等の培養液への添加と添加濃度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L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-システイン、L-アルギニン、アユの表皮に存在するピペリジン〔Sigma, P-5881〕D-グルコース〔和光純薬, 特級〕、D-フラクトース〔Sigma, F-0127〕、D-ガラクトース〔Sigma, G-0750〕、D-マンノース〔Sigma, M-4625〕およびL-ラムノース〔Sigma, R-3875〕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100μL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、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】 培養終了直後の生菌数と濁度をそれぞれ表1および2に、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3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および生菌数を測定した結果、L-フェニルアラニン、L-システインおよびピペリジンで特に抑制されたが、そのほかはおおむね添加物不含MCYと同程度であった。感染耐過アユ血清を用いた抗原解析結果ではCS-1株をL-ラムノースを1%加えた区でやや抗原性が増加したが、いずれの濃度でも特に抗原性を上昇させるような効果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糖類等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).  
※ 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).

表1. アミノ酸、単糖などを添加したMCY培地で培養した冷水病菌体の生菌数(1×10<sup>9</sup>CFU/mL)

添加物	SG990302					CS-1				
	1%	0.1%	0.01%	0.001%	0%	1%	0.1%	0.01%	0.001%	0%
L-フェニルアラニン	NT	0.058	1.92	2.11	—	NT	0.21	3.23	3.14	—
チロシン	NT	1.6	2.66	3.5	—	NT	2.19	2.95	3.7	—
L-システイン	NT	<10 <sup>5</sup>	2.35	2.72	—	NT	<10 <sup>5</sup>	2.39	3.21	—
L-アルギニン	NT	2.46	2.36	2.58	—	NT	3.65	3.03	2.45	—
ピペリジン	NT	<10 <sup>4</sup>	<10 <sup>5</sup>	2.41	—	NT	<10 <sup>7</sup>	2.13	2.85	—
D-グルコース	0.04	2.45	2.24	NT	—	0.05	3.34	3.22	NT	—
D-フラクトース	0.4	1.6	2.4	NT	—	<10 <sup>5</sup>	2.13	2.85	NT	—
D-ガラクトース	0.01	2.45	2.35	NT	—	0.04	2.78	2.84	NT	—
D-マンノース	0.08	2.03	1.8	NT	—	0.17	3.27	2.97	NT	—
L-ラムノース	0.08	1.94	2.5	NT	—	0.31	3.23	3.19	NT	—
MCY	—	—	—	—	1.8	—	—	—	—	3.06

NT: not tested.

表2. アミノ酸、単糖などを添加したMCY培地で培養した冷水病菌液の濁度(630nm)

添加物	SG990302					CS-1				
	1%	0.1%	0.01%	0.001%	0%	1%	0.1%	0.01%	0.001%	0%
L-フェニルアラニン	NT	0.042	0.149	0.156	—	NT	0.056	0.18	0.188	—
チロシン	NT	0.146	0.155	0.15	—	NT	0.18	0.184	0.185	—
L-システイン	NT	0.033	0.135	0.154	—	NT	0.036	0.168	0.184	—
L-アルギニン	NT	0.153	0.155	0.168	—	NT	0.189	0.182	0.18	—
ピペリジン	NT	0.038	0.055	0.158	—	NT	0.039	0.064	0.179	—
D-グルコース	0.045	0.161	0.158	NT	—	0.044	0.183	0.178	NT	—
D-フラクトース	0.036	0.136	0.16	NT	—	0.035	0.159	0.184	NT	—
D-ガラクトース	0.045	0.161	0.157	NT	—	0.048	0.179	0.182	NT	—
D-マンノース	0.049	0.159	0.159	NT	—	0.051	0.177	0.184	NT	—
L-ラムノース	0.052	0.159	0.162	NT	—	0.064	0.176	0.177	NT	—
MCY	—	—	—	—	0.162	—	—	—	—	0.18

NT: not tested

表3. アミノ酸、単糖などを添加した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(ELISAによる490nmの吸光度)

添加物	SG990302					CS-1				
	1%	0.1%	0.01%	0.001%	0%	1%	0.1%	0.01%	0.001%	0%
L-フェニルアラニン	NT	0	0.074	0.08	—	NT	0.001	0.057	0.056	—
チロシン	NT	0.076	0.08	0.084	—	NT	0.043	0.054	0.056	—
L-システイン	NT	0.01	0.076	0.071	—	NT	0.008	0.049	0.042	—
L-アルギニン	NT	0.087	0.083	0.086	—	NT	0.079	0.061	0.065	—
ピペリジン	NT	0.014	0.018	0.086	—	NT	0.008	0.015	0.055	—
D-グルコース	0.009	0.069	0.075	NT	—	0.01	0.046	0.054	NT	—
D-フラクトース	0.008	0.068	0.074	NT	—	0.008	0.059	0.059	NT	—
D-ガラクトース	0.011	0.08	0.088	NT	—	0.012	0.053	0.062	NT	—
D-マンノース	0.01	0.07	0.079	NT	—	0.011	0.058	0.062	NT	—
L-ラムノース	0.015	0.077	0.079	NT	—	0.033	0.062	0.063	NT	—
MCY	—	—	—	—	0.078	—	—	—	—	0.064

NT: not tested

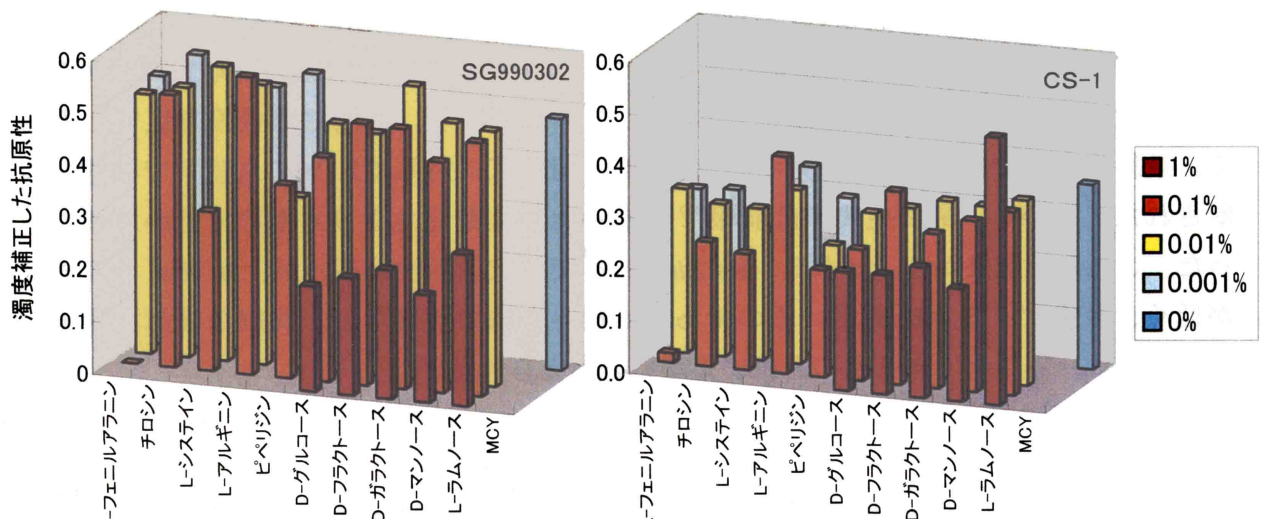


図1. アミノ酸、単糖などを添加したMCY培地で培養した冷水病菌体の感染耐過アユ血清に対する反応性(濁度補正後).

補正式: (ELISA490nm値/濁度630nm値) × 100.