

1 6) 改変サイトファーガ培地に代わる アユ冷水病菌分離用平板培地の試作

金辻宏明

【目的】 これまで冷水病予防対策研究の一環として、冷水病原菌の分離株の培養方法を変更することによってウサギ赤血球に対する凝集反応や感染耐過魚血清との反応性に変化があることを報告した。本報ではワクチン至適株が改変サイトファーガ(MCY)寒天培地で増殖しないと仮定し、2、3の分離用培地を試作して原因菌の分離能について検討した。

【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株を用いた。培養は供試冷水病菌を50mLのMCY液体培地に接種して15°Cで24時間振盪(100rpm)して行い、MCY液体培地で10,000倍希釈して用いた。本研究ではまず、0.05~0.2%のBacto Agar [Difco] を加えた50mLのMCY液体培地に、供試冷水病培養菌を100 μ L加えて15°Cで24時間振盪(100rpm)培養後、MCY寒天培地を用いて生菌数を測定して冷水病菌の培養におよぼす寒天の影響を調べた。つぎに、冷水病菌の分離用試作培地として表1に示す種類で、次のようにして作製した。1/3ハンクス液培地、1/10ハンクス液培地、2/5MEM培地および1/10MEM培地はハンクス液② [Nissui] およびイーグルMEM③ [Nissui] を用い、所定の容量を処方濃度を1として希釈して1.5%量のBacto Agarを加えて作製した。全卵培地は生鶏卵2個(約100g)に滅菌MCY液体培地50mLを加え、90°Cで1h加熱して作製した。卵白培地は前述の全卵を卵白だけに変えて同様にして作製した。植物用ゲランガム培地はMCY液体培地にゲランガム [和光純薬] を0.7%、硫酸マグネシウムを0.1%加え、105°Cで1分間、蒸気高圧滅菌を施して作製した。冷水病菌の試作培地での増殖は次のようにして調べた。培養菌では供試培養菌液100 μ Lを試作培地に加え、コンラージ棒で塗布し、15°Cで培養してコロニー出現の有無で生育を調べた。また、冷水病罹患アユ^{※1)} では腎臓を用いて試作培地に白金耳で塗布し、罹患アユ飼育水^{※1)} ではその飼育水100 μ Lをコンラージ棒で塗布し、前述と同様に15°Cで培養して冷水病菌のコロニー出現の有無と抗血清^{※2)} との凝集によって調べた。

【結果】 MCY液体培地中に寒天を加えて増殖におよぼす影響を調べた結果を図1に示した。すなわち、寒天の濃度が高くなるにしたがって増殖量は低下し、液体培地のゾル化の影響または毒性とも考えられ、今後詳細な検討を要すると考えられる。次に、試作培地の冷水病菌の増殖能を調べた結果を表1に示した。その結果、希釈した株化細胞用培地、鶏卵を用いた全卵培地および卵白培地では冷水病菌の生育は全く認められず、ゲランガム培地およびMCY培地で認められた。このことから、ワクチン至適冷水病菌株の分離に寒天が影響すると判断された場合、ゲランガムを寒天の代替品として使用すると良いのではないかと推察される。

※1) 金辻宏明：ハプテン化および免疫原性強化した冷水病菌体ワクチンの有効性，平成14年度滋賀水試事報，188-189(2003).
※2) 金辻宏明：アユ抗体および冷水病菌体に対するウサギ抗血清の作製と酵素標識，平成14年度滋賀水試事報，216-217(2003).

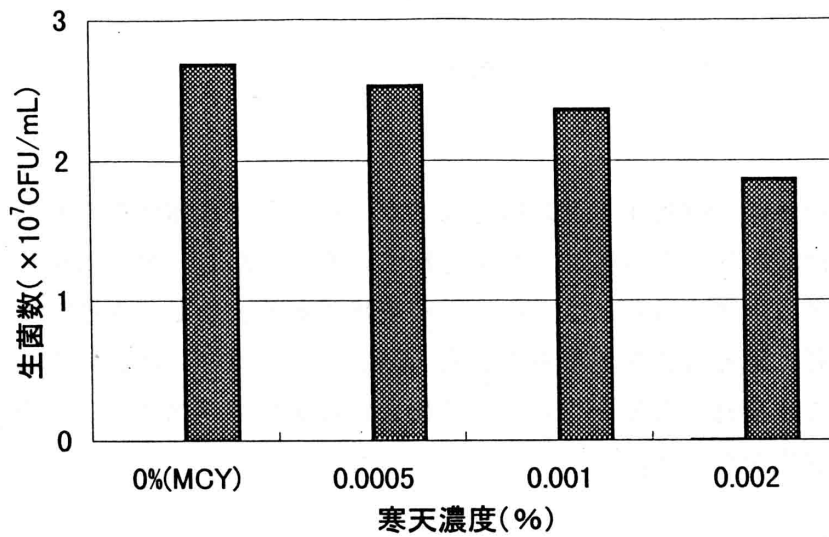


図1. 冷水病菌の液体培養における増殖におよぼす寒天添加の影響.

MCY: 改変サイトファーガ液体培地.

表1. 試作培地の冷水病培養菌の増殖の有無、冷水病菌の分離試験結果

試作培地	培養菌の増殖	罹患魚の腎臓からの冷水病菌分離	冷水病発生水からの冷水病菌の分離
1/3 ハンクス寒天培地	—	—	—
1/10 ハンクス寒天培地	—	—	—
2/5MEM寒天培地	—	—	—
1/10MEM寒天培地	—	—	—
全卵培地	—	—	—
卵白培地	—	—	—
ゲランガムMCY	+	+	+
MCY寒天培地	+	+	+