

1 1) アユ冷水病原因菌の間接蛍光抗体法による検出

金辻宏明

【目的】 *Flavobacterium psychrophilum* を原因菌とするアユ冷水病は近年、非常に問題となっており、早急に対策を講じる必要がある。しかし本菌は冷水病罹患アユから分離ができるものの、分離菌を用いて人為感染を試みるとその再現性は低いことが知られている。現在では本病病死魚を投入して成立させる水平感染法などによる攻撃手法で本病を再現している。しかしながらこの手法では攻撃時の菌量を測定する方法がなく、したがって感染強度を調整するなどの実験手段は講じられない。そこで本研究では冷水病被害の対策を確立する一環として、まずはアユ冷水病培養菌を間接蛍光抗体法で検出する方法を確立した。

【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*F. psychrophilum* SG990302株を用いた。供試菌は改変サイトファーガ寒天培地を用いて4°Cで継代したものを200mlの改変サイトファーガ液体培地(MCY)に接種して15°Cで振盪しながら24h種培養し、種菌液を10 lのMCYへ接種して攪拌しながら15°Cで24h本培養を行い、以後の実験に用いた。

冷水病菌を間接蛍光抗体法によって検出するため、まず*F. psychrophilum* SG990302株に対するウサギ抗血清(一次抗体)の希釈倍率を検討した。本菌の培養液をMCYで適当に希釈して塗末標本(スメア)を作製し、火炎固定して用いた。次に1%ウシ血清アルブミン【Sigma:A-7030】、0.765%NaClを含む10mMリン酸($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$)緩衝液(PBS : pH7.0)で50、100、500、1,000、5,000および10,000倍希釈したウサギ抗血清を湿潤箱に設置したスメア上に1ml上乘せし、室温で30min反応させた。次にPBSで5min、3回洗浄後、FITC標識抗ウサギIgGヤギIg【Sigma:F-0382】を指定緩衝液で指定倍率に希釈したものをスメア上に0.5ml上乘せして室温で30min反応させた。反応後PBSで5min、3回洗浄し、グリセリンで封入してB₂励起光下で蛍光強度を5段階(+++, ++, +, ±, -)で調べ、一次抗体の至適希釈倍率を求めた。次に、他の冷水病菌株および一般的な他の細菌に対する抗*F. psychrophilum* IgGの非特異反応を調べた。供試菌には*F. psychrophilum* SG010416株、同 CS1株、*Pseudomonas precoglossicida* FPC941株、*Bacillus cereus* ATCC11778株、*B. subtilis* ATCC6633株、*Micrococcus luteus* ATCC9341株、*Vibrio anguillallum* PT479株および*V. anguillallum* PT1027株を用いた。前述と同様にして各菌株のスメアを作製し、前実験で決定した希釈倍率の一次および二次抗体を反応させ、蛍光顕微鏡を用いB₂励起光下で蛍光強度を5段階評価した。

【結果】 冷水病菌スメアを蛍光抗体法で検出した結果は図1に、その感度は表1に示した。すなわち、本方法によって冷水病菌は鮮明に染色され、その感度は1,000倍希釈まで+++と有効であった。また、抗血清の希釈倍率が500倍以上で本法による他菌への非特異反応を調べたところ、すべて反応は認められなかった(表2)。さらに本抗血清の他の冷水病菌株に対する反応性も1,000倍希釈ではSG990302株で非常に強いがSG010416株およびCS1株も「++」と反応は強く、抗血清は1,000倍の希釈倍率で使用すると良いと判断された。以上の結果から、本抗血清は反応の強さ、非特異的な反応が生じにくいと考えられるという点から本疾病の迅速診断、組織学的研究、菌数測定等に応用可能であると推察された。

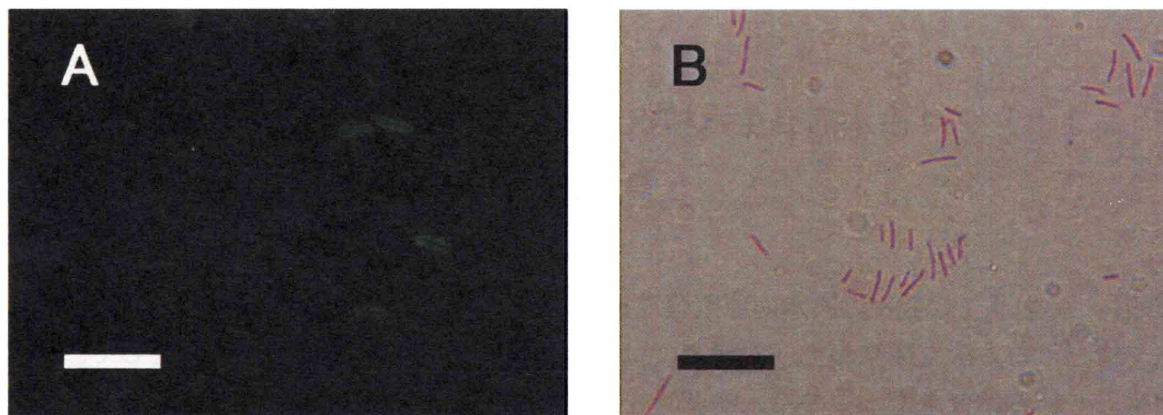


図1. 間接蛍光抗体法で検出される冷水病菌蛍光像.
A: 蛍光像, B: 単染色像. Bar: 10 μ m.

表1 間接蛍光抗体法によるウサギ抗*Flavobacterium psychrophilum* 血清を用いた本菌に対する反応性

菌株	抗血清の希釈倍率					
	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:5000	1:10000
SG990302	+++	+++	+++	+++	+	±

+++: intense fluorescence, ++: clear fluorescence, +: distinct fluorescence,
±: faint fluorescence, -: no definite fluorescence.

表2 間接蛍光抗体法によるウサギ抗*Flavobacterium psychrophilum* 血清を用いた数種の本菌株および他菌に対する反応性

菌株	抗血清の希釈倍率					
	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:5000	1:10000
<i>F. psychrophilum</i> SG990302	+++	+++	+++	+++	+	±
<i>F. psychrophilum</i> SG010416	+++	+++	+++	++	±	-
<i>F. psychrophilum</i> CS1	+++	+++	+++	++	±	-
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> FPC941	ND	ND	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC11778	ND	ND	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	ND	ND	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	ND	ND	-	-	-	-
<i>Vibrio anguillillum</i> PT479	ND	ND	-	-	-	-
<i>V. anguillillum</i> PT1027	ND	ND	-	-	-	-

+++: intense fluorescence, ++: clear fluorescence, +: distinct fluorescence,
±: faint fluorescence, -: no definite fluorescence. ND: not determined.