

## 1 2) アユ冷水病発生水槽水中の冷水病菌数測定方法の確立

金辻宏明

【目的】 これまでに我々は冷水病原因菌*Flavobacterium psychrophilum* の培養菌を間接蛍光抗体法で検出する方法を開発した。本研究では冷水病被害の対策を確立する一環として、本病の発生している飼育水槽水中の冷水病菌数を蛍光抗体法によって測定する方法を開発した。

【方法】 供試魚には平均体重2.8 g の冷水病経験のない湖産アユ200尾を用い、90×45×45cmの亚克力水槽で地下水(17.5℃)を通水(約0.5/min : 5回転/day)して飼育した。冷水病は本病と診断されたアユの-85℃凍結保存魚(0.66 g ×5尾)を3day間投入して発生させた。冷水病菌を含む供試飼育水は凍結病魚投入10day後にサンプリングしたものを用いた。なお対照として冷水病の発生していないアユ飼育水槽水を用いた。冷水病菌の検出は以下のようにして行った。まず供試飼育水25mlを直径25mm、0.2μmのポアサイズのポリカーボネートフィルター【ADVANTEC : K020A025A】(PCMと省略)で濾過し、PCMを室温で乾燥させた。乾燥後、PCMをメタノールで1min固定して再び乾燥させた。乾燥後、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1000倍希釈したウサギ抗*F. psychrophilum*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B<sub>2</sub>励起光下で検鏡した。なお計数は接眼レンズの視野面積をマイクロメーターで測定し、50視野の平均値から次項に示す計算式により求めた。

【結果】 PCM上の冷水病菌を検出した結果は図1に示すとおりである。すなわち、蛍光抗体法によって冷水病菌と確定できる桿菌が強く明瞭に染色された。しかし図1の矢印や図1Bに示すように2~7μmの球形の非特異染色物もまれに観察された。ゆえに、染色された桿菌が冷水病菌であると確定するため、*in situ* ハイブリダイゼーションによる2重染色等を行って非特異の有無を確認する必要があると考えられた。しかしながら対照区では桿菌状の細胞は検出されなかった(表1)ことから今回の試験で染色された桿菌は冷水病菌であると推察された。なおこの菌数測定法では生菌、死菌の区別なく染色、計数されるため、生菌死菌の比率を今後別途検討する必要性があると考えられた。

次に、PCM上の冷水病菌を検出する数式を図2に示した。本研究で用いた顕微鏡の接眼レンズの有効視野の直径は143.0μm、PCMの有効濾過面直径は22.18mmであったことから1ml中の菌数は図2の式より1視野の平均菌数の24057倍/サンプル水量(ml)と規定された。この計算式より冷水病病死魚を投入して攻撃した10day後の水槽水中の菌数を計算した結果を表1に示した。なお、試験は2回繰り返して行った。その結果、冷水病菌数はそれぞれ21,300cells/mlおよび1,300cells/mlと求められ、実際に菌数測定が可能であった。なお、非特異的に染色される球形細胞も28~125cells/mlの範囲で認められた。以上のことから、冷水病菌の濃度はPCMを用いた間接蛍光抗体法で測定可能であると判断された。今後、様々な環境中に生息する細菌との非特異反応を詳細に検討する必要性があると考えられる。

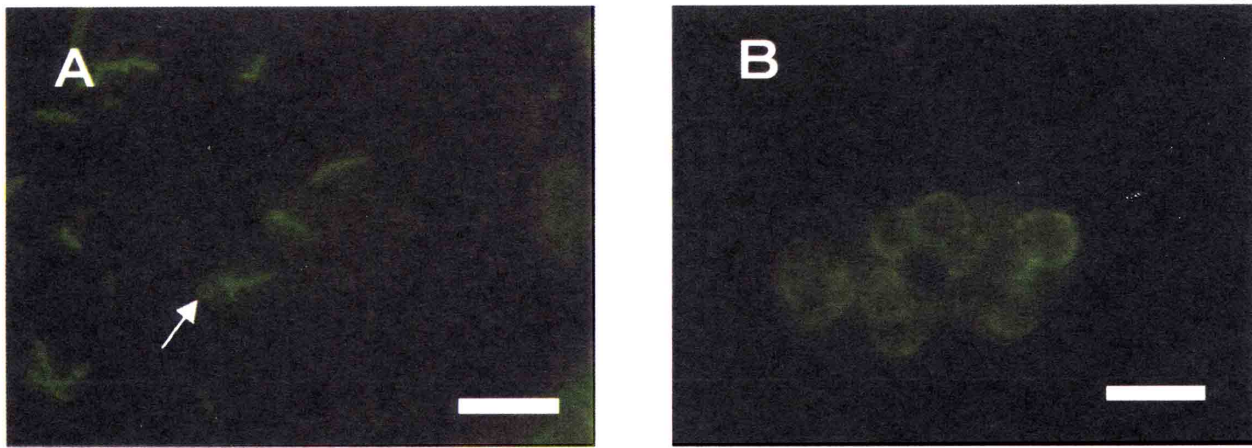


図1. メンブレン上の冷水病菌の蛍光像および非特異染色物.  
A: 検出された冷水病菌. Bおよび矢印: 非特異染色物. Bar: 10  $\mu$ m.

$$\text{菌数} = \frac{\text{メンブレンフィルターの有効濾過面積}}{\text{接眼レンズの視野面積}} \times \frac{\text{1視野中の平均菌数}}{\text{サンプリング量(ml)}}$$

図2. 蛍光抗体法で染色した冷水病菌の1視野平均菌数からの濃度計算式.

表1 間接蛍光抗体法で検出したアユ冷水病発生水槽水中の菌数測定結果

	試験1		試験2	
	試験区	対照区	試験区	対照区
冷水病菌濃度(cells/ml)	21300	0	1300	0
非特異染色される球形細胞(cells/ml)	125	29	62	28