

1 3) 蛍光抗体法と培養法によるアユ冷水病菌培養菌の菌数測定の比較

金辻宏明

【目的】 これまでに我々は冷水病発生水槽水中の*Flavobacterium psychrophilum* を間接蛍光抗体法で検出、計数する方法を開発した。しかしながら蛍光抗体法では生菌死菌の区別はできない。また現在のところ本病発生水槽水中の冷水病菌を培養法で分離、計数する手段は確立されつつあるが簡易な方法ではない。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冷水病培養液中の冷水病菌数の測定を蛍光抗体法と培養法で比較した。

【方法】 供試菌株には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50mlの改変サイトファーガ液体培地(MCY)に接種して15°Cで振盪して24h培養した。蛍光抗体法による冷水病菌の検出は以下のようにして行った。まず、培養液をMCYで適当量に希釈し、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)で濾過した。フィルターを室温で乾燥後、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1,000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。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てスメア上に0.5ml上乘せし、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視野の平均値から求めた。次に、培養法による菌数の測定は以下のようにして行った。培養液を次に示す10種類の希釈液で希釈後、MCY寒天培地2枚に塗末して15°Cで4dayの間培養して菌数を求めた。希釈液には蒸留水、MCY培地、トリプトン・ペプトン・肉エキスを除くMCY培地、地下水、琵琶湖水、0.1、0.25、0.5、0.85または1.0%塩化ナトリウムを含む蒸留水を高圧蒸気滅菌したものをを用いた。

【結果】 冷水病培養菌液の濃度を蛍光抗体法および培養法で測定した生データを表1に、グラフを図1に示した。その結果、蛍光抗体法では 1.4×10^{10} cells/mlと測定された。一方、培養法ではMCYを用いた希釈が一番多く、 1.2×10^9 CFU/mlと測定された。蒸留水、地下水および湖水ではMCYを下回るものの検出結果にほとんど差はなく、約 8×10^8 CFU/mlであった。また、数種の濃度の塩化ナトリウム水溶液で希釈すると $7.8 \sim 4.9 \times 10^8$ CFU/mlとMCYで希釈したときより低く測定された。さらに、トリプトン・ペプトン・肉エキスを除くMCY培地で検出すると最低値の 3.8×10^8 CFU/mlと測定された。したがって、培養法で菌液を希釈して菌数を測定する場合、MCYを用いると希釈液の中では一番多く検出されると考えられた。ゆえに希釈液はMCYを用いると良いと考えられた。MCYで希釈して測定した結果と蛍光抗体法で測定した結果を比較すると、蛍光抗体法の方が12.2倍多く計数された。この差が培養液中の菌の生残率との差を示すものかMCY培地では分離検出が十分にできないのかは判断できなかったが、菌数測定の差が大きいことが明らかとなった。

表1 冷水病菌培養菌の濃度測定における蛍光抗体法と培養法の比較

希釈液	菌数(×10 ⁷ CFU/ml)		
	データ I	データ II	平均
DW	67.0	100.0	83.5
MCY	108.0	128.0	118.0
MCY(塩類のみ)	41.0	35.0	38.0
地下水	69.0	84.0	76.5
湖水	79.0	92.0	85.5
0.1% NaCl	64.0	78.0	71.0
0.25% NaCl	87.0	68.0	77.5
0.5% NaCl	51.0	55.0	53.0
0.85% NaCl	53.0	50.0	51.5
1% NaCl	49.0	48.0	48.5
直接検鏡(蛍光抗体法)	1430.0	1450.0	1440.0

※ 直接検鏡した結果は総菌数(cells/ml)となる.

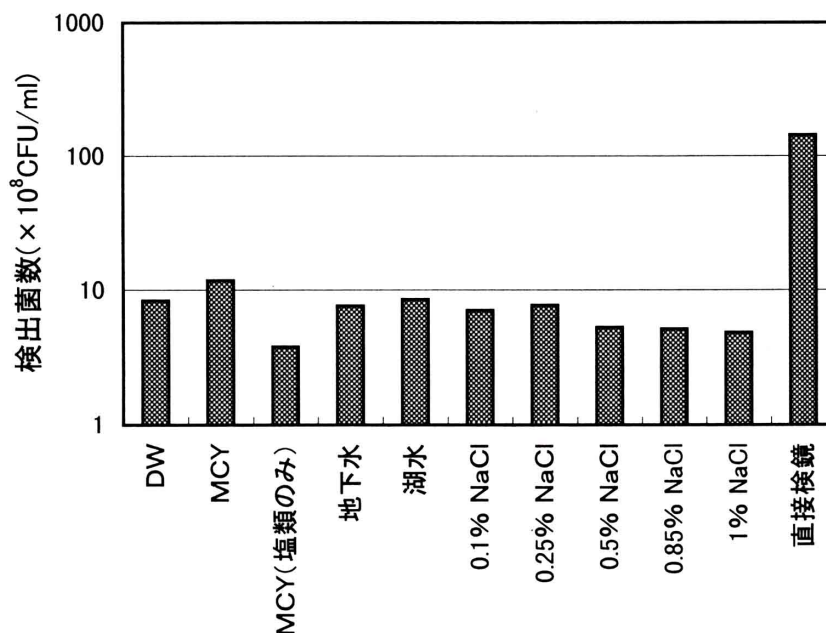


図1. 冷水病菌培養菌の濃度測定における蛍光抗体法と培養法の比較.
直接検鏡した結果はcells/mlとなる.