

36) リン酸、クエン酸およびトリス塩酸緩衝液による 冷水病水平感染阻止の可能性

金辻宏明・二宮浩司・山本充孝・遠藤 誠

【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。しかしその対策は設備の必要な加温処理、抗菌薬剤の投薬以外には見あたらない。そこで、本研究では冷水病菌の水平感染を防ぐ方法を開発する一環として代表的な緩衝液の冷水病菌に対する抗菌作用および水平感染阻止の可能性について検討した。

【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*F. psychrophilum* SG990302株を用いた。培養は種菌液を50mlの改変サイトファーガ液体培地(MCY)に供試菌を接種し、15°Cで24h振盪培養して作製した。抗菌試験用の緩衝液はpHの間隔を1.0としたリン酸緩衝液pH5~8、クエン酸緩衝液pH4~7およびトリス塩酸緩衝液pH6~9を用い、20mMになるよう50mlのMCYに加えて作製した。各緩衝液を用いた抗菌試験は次のようにして行った。各緩衝液を含むMCYに種菌液100 μ lを接種して15°Cで4(リン酸緩衝液)または7dayの間(クエン酸・トリス塩酸緩衝液)振盪培養を行い、最初の4h後および24h間隔で菌数を測定した。次に、クエン酸緩衝液を用いてアユ冷水病の水平感染阻止試験を次のようにして行った。供試魚には11月に琵琶湖で採捕され、冷水病経験のない平均体重2.96 gの湖産アユを用いた。まず、供試魚25尾を60×30×36cm(54 l)の亚克力製水槽に収容し、地下水(17.5°C)に馴致させた。次にpHを4.0に調整した100mMまたは20mMクエン酸緩衝液を4.5ml/minの速度で定量ポンプを用いて試験水槽に注入し、水槽内の緩衝液濃度を1mMまたは0.2mMとした。その後、冷水病発生水を50ml/minの速度で100mMまたは20mMクエン酸緩衝液を0.5ml/minの速度で注入し、21dayの間飼育した。なお実験期間中は無給餌で試験を行った。

【結果】 冷水病菌に対するリン酸緩衝液の影響を調べた結果を図1に示した。4h後ではすべてのpHでコントロールを下回り、24h後にはpH5で生菌が認められなくなった。また、3day後にはpH8でも生菌は消失した。その他のpHではコントロールより下位傾向にあるものの菌数は維持または増加した。次に、本菌に対するクエン酸およびトリス塩酸緩衝液の影響を調べた結果を図2に示した。クエン酸緩衝液ではpH4~6では24h後には生菌が消失し、pH7でも4day後には消失した。トリス塩酸緩衝液では培養期間中はすべてコントロールの菌数を上回った。これら結果から、クエン酸緩衝液で静菌効果が非常に高いと判断された。なお、リン酸緩衝液およびトリス塩酸緩衝液の冷水病菌に対する静菌能はクエン酸緩衝液の効果と比較して非常に低いと推察された。この結果から、実際にクエン酸緩衝液をアユ飼育水中に加えて攻撃試験を行った結果を図3に示した。その結果、1mMの濃度では2day後から亜急性毒性による死亡個体が出現し、5day後には生残率が16%に低下した。0.1mMでは15day後までコントロールとほぼ同様のへい死状況を示し、その後はコントロールをやや上回ったものの最終生残率は16%であった。以上の結果から、クエン酸緩衝液の冷水病菌に対する殺菌、静菌効果は高く、有効であると考えられたが、アユに対する毒性もまた高いことが明らかとなった。したがって、今回の試験で用いた緩衝液ではアユに無害でなおかつ水平感染を阻止できるものは認められなかった。

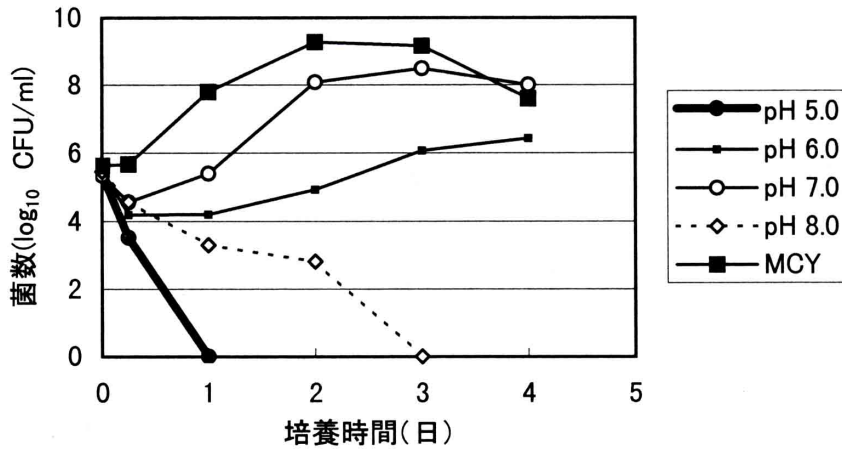


図1. リン酸緩衝液を含む改変サイトファーガ培地中での冷水病菌の消長.

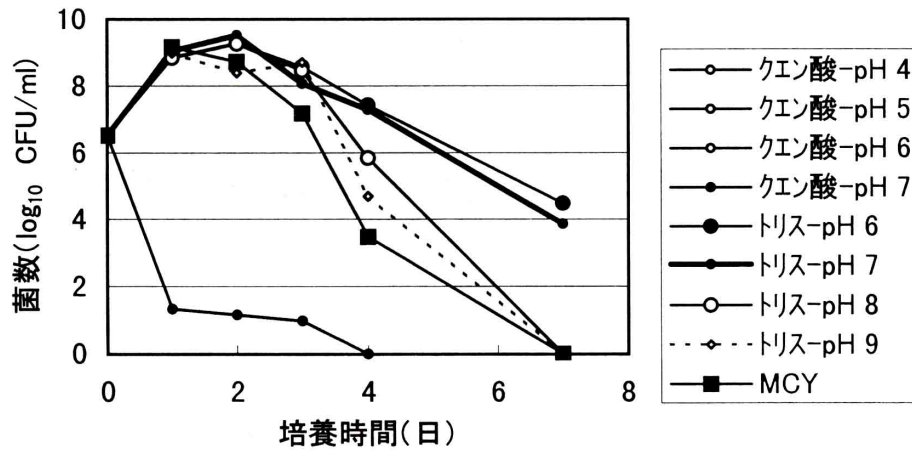


図2. クエン酸、トリス塩酸緩衝液を含む改変サイトファーガ培地中での冷水病菌の消長.

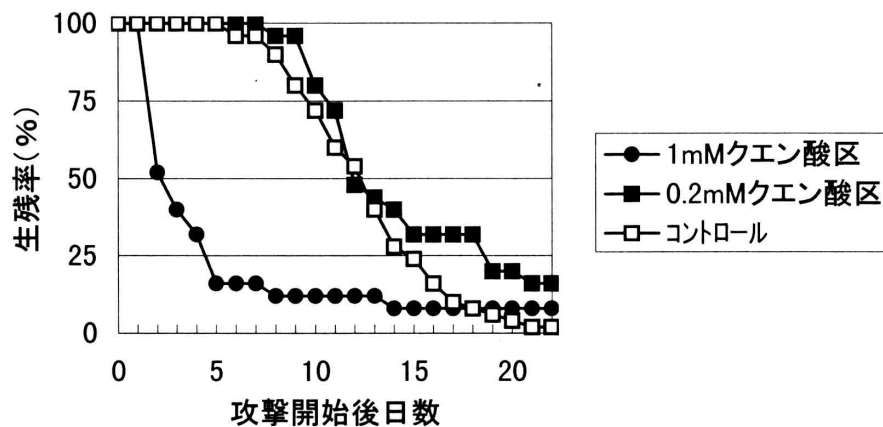


図3. アユ飼育水中にpH4のクエン酸緩衝液を常時注入したときの冷水病発生水導入攻撃後の生残率.