

39) アユ冷水病菌の継代による2・3の生化学的性状の長期的変化の有無

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。この対策の一つにワクチンが考えられるが、開発を行うためには基礎的知見が乏しい。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、冷水病菌の長期継代による2・3の生化学的性状の変化の有無について調べた。

【方法】

供試菌には凍結保存していた*F. psychrophilum* SG990302株を用い、改変サイトファーガ(MCY)寒天培地を用いて15℃で培養し、継代を7日間に1回行った。継代期間は約1年間(371日：52回継代)とし、次に示す項目を継代開始および終了時に調べて長期継代の影響について検討した。性状は糖分解試験、ゲラチン分解試験、オキシダーゼ試験、カタラーゼ試験、菌体とコロニーの形態変化および培養菌液の酵素活性について調べた。糖分解試験は糖分解能判定用基礎培地(0.2%トリプトン、0.05%ペプトン、0.3%寒天および0.00002%ブロムクレゾールパープルを含む;pH7.4)に表1に示す13種類の糖または糖アルコールをそれぞれ1%添加し、小試験管に3ml分注し、滅菌後に供試菌を穿刺して15℃で培養して黄変の有無で判定した。ゲラチン分解能はMCYに3%量のゲラチンを加えて作製した平板培地に供試菌を接種して15℃で2週間培養した後の状態を観察して調べた。オキシダーゼ試験、カタラーゼ試験は常法に従って調べた。培養液(50mlMCY液体培地で24h培養)の酵素活性はAPI-ZYM【BIOMÉRIEUX】を用い、表2に示す19種類について調べた。

【結果】

糖分解試験、ゲラチン分解試験、オキシダーゼ試験、カタラーゼ試験および菌体根形態の長期的変化を調べた結果を表1に示した。その結果、糖分解能はすべて陰性、ゲラチン分解、オキシダーゼ試験およびカタラーゼ試験はすべて陽性で、継代による変化は無かった。またこれら項目は参考文献の結果と一致した。しかし、コロニーの色調は図1に示すように保存株ではやや透明がかった黄色のみのコロニーであったが、継代後は保存株と同色調のものと、やや濁りと白濁を伴う黄色のコロニーがおおよそ40%出現した。またAPI-ZYMで培養液の酵素活性の長期的変化を調べたところ、表2に示すようにほとんど変化は認められなかった。この結果は参考文献と一致した。以上の結果から、冷水病菌の継代培養に伴う長期的な生化学的変化は検出されなかったが、コロニー色の変化が認められたため、データは示さないが白色変化コロニー由来と非変化株を用いて今回の試験を全く同様に行ったところ、コロニー色以外の変化は認められなかった。このことは供試株の完全な純培養ができていなかった可能性があるものの、黄色コロニー形成株の色調の変化は微生物学的な何らかの変化を意味している。したがって、色調の変化と性状の関係、病原性との関係等に興味もたれ、今後詳細に検討しなければならないと考えられた。

表1 冷水病菌の糖分解能と2, 3の微生物学的性状検査結果と他の報告との比較

	継代前	継代1年後	参考文献※
デキストリン	-	-	
グルコース	-	-	-
L(+)-ラムノース	-	-	-
D-ラクトース	-	-	
L-ソルボース	-	-	
D-キシロース	-	-	
マンノース	-	-	
D-マンニト	-	-	-
イノシット	-	-	-
meso-エリスリトール	-	-	
レブロース	-	-	
アドニット	-	-	
D(+)-ガラクトース	-	-	-
スクロース	-	-	-
セロビオース	-	-	-
マルトース	-	-	-
メリビオース	-	-	-
ラフィノース	-	-	-
イヌリン	-	-	-
ソルビトール	-	-	-
ゼラチン分解	+	+	+
オキシダーゼ	+	+	+
カタラーゼ	+	+	+
菌体の形状	桿菌	桿菌	

※Iida Y, Mizokami A. Outbreaks of cold water disease in wild Ayu and Pale Chub. *Fish Pathol.* 1996; 31: 157-164.

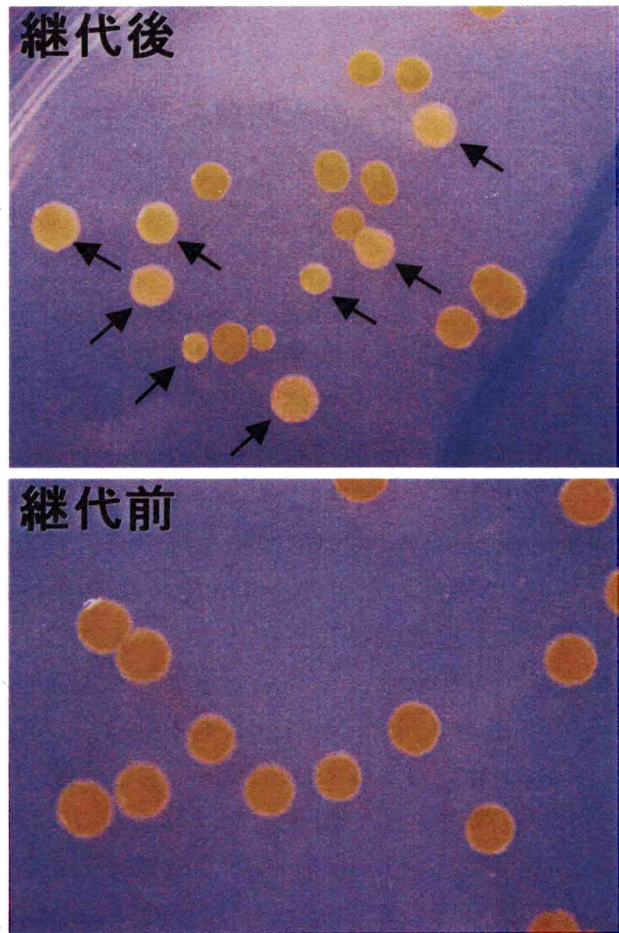


図1. 冷水病菌SG990302株の長期継代によるコロニー色変異株の出現。

※矢印は変異色コロニーを示す。

表2 冷水病菌体培養液の各種酵素活性の経時変化と他の報告との比較

	継代前	継代1年後	参考文献※
アルカリフォスファターゼ	4	5	5
エステラーゼ(C4)	2	3	0-3
エステラーゼリパーゼ(C8)	3	4	3~4
リパーゼ(C14)	1	1	1
ロイシンアリラミダーゼ	3	5	5
バリンアリラミダーゼ	2	2	1
シスチンアリラミダーゼ	1	1	1~2
トリプシン	0	0	0
α-キモトリプシン	0	0	0
酸フォスファターゼ	4	5	4~5
α-ナフトールAS-BI-ホスホヒドラーゼ	4	5	3~4
α-ガラクトシダーゼ	0	0	0
β-ガラクトシダーゼ	0	0	0
β-グルクロニダーゼ	0	0	0
α-グルコシダーゼ	0	0	0
β-グルコシダーゼ	0	0	0
N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ	0	0	0
α-マンノシダーゼ	0	0	0
α-フコシダーゼ	0	0	0

* 結果の数値は発色強度 (5が最大で0は無色) を示す。

※Iida Y, Mizokami A. Outbreaks of cold water disease in wild Ayu and Pale Chub. *Fish Pathol.* 1996; 31: 157-164.