

## 40) アユ冷水病菌の産生する溶血物質の各動物血球に対する感受性

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。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溶血性成分(毒素)を各動物とアユの血球に対する感受性を測定して調べた。

**【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。培養は供試菌を改変サイトファーガ寒天培地を用いて4℃で継代したものを50mlの改変サイトファーガ液体培地に接種して15℃で24h振盪して行った。溶血活性は以下のようにして調べた。動物血球に対する溶血活性の測定にはニワトリ、ガチョウ、モルモット、ウマおよびヒツジの保存血を用いて行った。血球浮遊液は保存血を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)を用いて2,500 rpm (1,350×g)、5minの遠心分離で3回洗浄し、血球数を $2.5 \times 10^7$  cells/mlになるようPBSに浮遊させて調製した。溶血反応は培養液を10,000rpm (11,300×g)で10min遠心分離して得た上清1mlと各動物の血球浮遊液2mlを混合し、15℃で4hインキュベートして行った。反応後、2,500rpm (1,350×g)で5min遠心し、上清の575nmの吸光度を測定した。対照区にはPBS 1mlを血球浮遊液2mlに加えた0%溶血コントロールと血球浮遊液2mlを遠心(2,500 rpm:1,350×g, 5min)後、3mlの蒸留水で溶血させた100%溶血コントロールを設定し、同様に反応させて上清の575nmの吸光度を測定した。溶血率(%)は次の式から算出した。

**溶血率** =  $\{(\text{試験区の吸光度} - 0\% \text{区の吸光度}) / (100\% \text{区の吸光度} - 0\% \text{区の吸光度})\} \times 100$

アユの個体別血球浮遊液に対する培養液の溶血活性は次に示す血球浮遊液を作製して上記と同様にして測定した。すなわち、0.2%クエン酸ナトリウムを含むPBS 5mlに尾断した供試アユ(平均体重32.1gの正常魚)から血液を滴下して採血した血球浮遊液をPBSで3回洗浄(2500rpm : 1,350×g, 5min)し、血球数を $2.5 \times 10^7$  cells/mlになるようPBSに浮遊させて試験用の血球浮遊液とした。なお、試験尾数は212個体とし、4回に分けて測定した。

**【結果】** ニワトリ、ガチョウ、モルモット、ウマおよびヒツジ血球に対する溶血活性を図1に示した。その結果、それぞれ3.6、1.2、4.2、21.2および27.6%と測定され、ウマおよびヒツジで高かった。アユ血球に対する溶血活性を調べると、試験ごとに結果がばらばらついていたため、個体ごとにその活性を調べたところ、図2に示すように4~16%の溶血を示す個体が全体の約80%を占めていた。20%以上の溶血を示す個体は16%で、その活性は25%の溶血率にピークを示した。以上の結果から、冷水病菌の産生する溶血活性は動物ではヒツジおよびウマ血液を利用して測定できると判断された。本菌の罹病種であるアユの血球に対する溶血活性は個体ごとに差が認められたことから、アユ血球の血液型等の個体差との因果関係、病原性との関係を詳しく検討する必要があると考えられた。また、アユに対する溶血活性を測定する場合、少なくとも50尾程度を用いて個体ごとに調べる必要があると推察された。なお、本試験の再現性は各動物血球に対する溶血比は変わらないものの溶血率には実験毎に差が認められたため、比較的高位に検出されたデータを使用した。

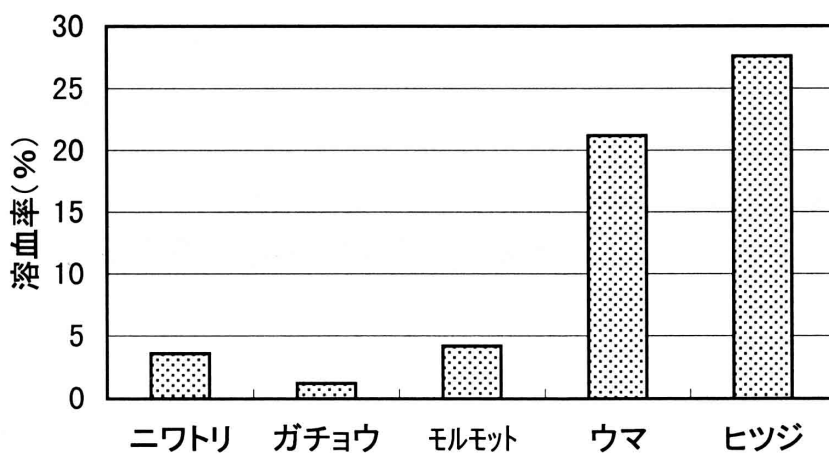


図1. 冷水菌体の産生する溶血毒素の各種動物血球に対する感受性.

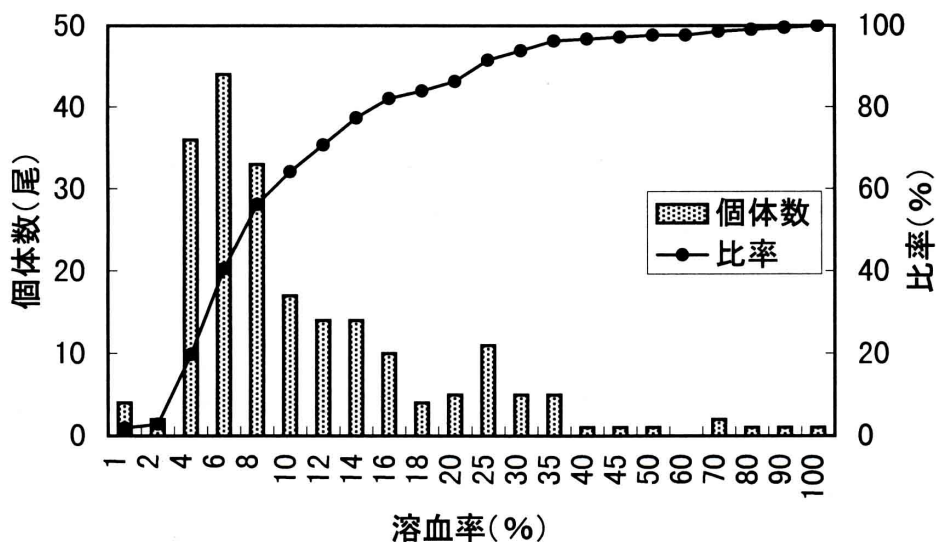


図2. 冷水菌体の産生する溶血毒素の個体別のアユ血球に対する感受性(ヒストグラム).