

4 1) アユ冷水病菌の溶血物質の産生におよぼす培地基材の影響 I カツオ肉エキス添加の影響

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)の産生におよぼすカツオ肉エキス添加の影響について調べた。

【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。試験培養液はトリプトンをのぞく改変サイトファーガ液体培地(MCY)にカツオ肉エキス【和光純薬】を1リットルあたり1、2、5または10g加えて作製し、100mlの三角フラスコに50ml加えて用いた。対照培地にはMCYを用いた。培養は、まず種培養として50mlのMCYに供試菌を接種して15°Cで24 h 振盪培養し、培養液1mlを試験培養液に接種して同様に15°Cで24 h 振盪培養した。培養後の菌濃度は培養液をMCYで希釈し、MCY寒天平板培地に塗末して調べた。培養液の溶血活性は培養液の10,000 rpm(11,300 × g)で10min遠心して得た上清をウマ血液を用いて次に示す方法で調べた。血球浮遊液はウマ保存血を0.765% NaClを含む10mMリン酸(Na₂HPO₄-NaH₂PO₄)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 × 10⁷ 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°C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。

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

【結果】

冷水病菌の培養におよぼすカツオ肉エキス添加の影響を調べた結果を図1に示した。その結果、カツオ肉エキスの添加は対照区MCY培養の8.4 × 10⁸ CFU/mlと比較して濃度が濃くなるにしたがって増殖が抑制傾向を示し、菌濃度は6.6~0.8 × 10⁸ CFU/mlであった。また培養上清中のウマ血球に対する溶血活性を調べると、カツオ肉エキス濃度が1と2g/L区でそれぞれ7.9と7.7%と対照区MCY培養の6.7%をわずかに上回った。1と2g/L区ではそれぞれ4.2および1.1%と対照区を下回った。以上の結果から、カツオ肉エキスの添加は冷水病菌の増殖に抑制的に働き、溶血素の産生促進にはほとんど効果がないと推察された。

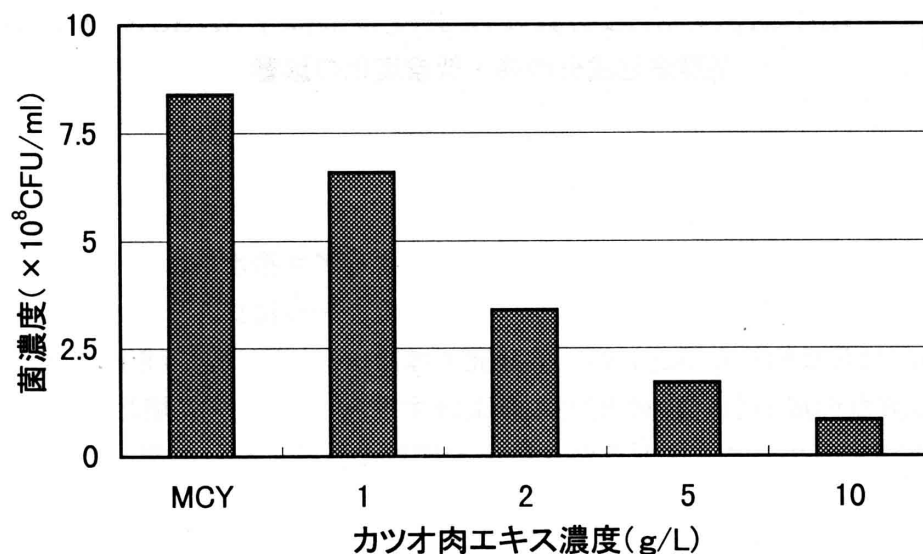


図1. 冷水病菌の増殖におよぼすカツオ肉エキス添加の影響.

※基礎培地はトリプトン不含の改変サイトファーガ培地.
MCY: 改変サイトファーガ培地

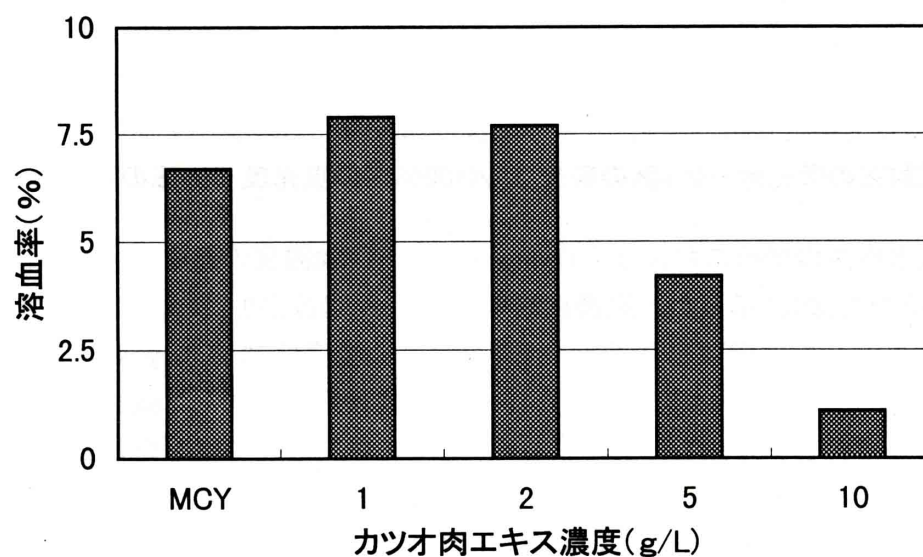


図2. 冷水病菌のカツオ肉エキス添加培地での培養上清中の溶血活性.

※基礎培地はトリプトン不含の改変サイトファーガ培地.
MCY: 改変サイトファーガ培地.