

4 2) 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Ⅱ 基礎培地成分の高・低濃度化の影響

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)の産生におよぼすサイトファーガ培地中のトリプトン(Tryptone)およびイーストイストラクト(Yeast)濃度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。試験培養液は改変サイトファーガ培地(MCY)のTryptone【Difco】およびYeast【Difco】の濃度を次のように変更して作製した。すなわち、Yeast濃度が1リットルあたり0.5、1、5および10 g に対してTryptone濃度をそれぞれ2、5、10および20gに変更して作製した高濃度培地(16種)、同様にYeast濃度が1リットルあたり2、1、0.5および0.1gに対してTryptone濃度をそれぞれ0.5、0.25、0.1、0.01gに変更して作製した低濃度培地(16種)の合計32種類を作製した。なお通常のMCYのTryptoneおよびYeast濃度はそれぞれ2および0.5g/Lである。培養は、まず種培養として50mlのMCYに供試菌を接種して15℃で24 h 振盪培養し、培養液1mlを高および低濃度培地に接種して同様に15℃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。試験は3回行い、平均値を結果とした。培養液の溶血活性はウマ血液を用いて前述¹⁾と同様にして測定した。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】 冷水病菌の増殖におよぼすTryptoneおよびYeast濃度の影響を調べた結果のデータを表1にグラフを図1に示した。高濃度培地ではYeast濃度が0.5および1g/Lで増殖は良好であったが5g/L以上では増殖を強く抑制し、Tryptone濃度は20g/Lでやや抑制を示したが10g/L以下ではほとんど影響は認められなかった。低濃度培地ではYeast濃度よりTryptoneの濃度が増殖量に影響を及ぼしており、Tryptoneが低濃度になるにしたがって増殖量も低下傾向を示した。なお、Yeastが0.1g/L以下の時には増殖量は不安定であった。つぎに冷水病菌の溶血物質産生におよぼすTryptoneおよびYeast濃度の影響を調べた結果のデータを表2にグラフを図2に示した。高濃度培地のYeast濃度が5g/L以上では菌の増殖がほとんどなかったため、1g/L以下で溶血活性を調べると、Tryptoneの濃度が上昇するにしたがって溶血活性は低下した。低濃度培地ではTryptone濃度が低下するにしたがって溶血活性は上昇した。以上のことから、本菌株の増殖量は現行の改変サイトファーガ培地を用いるともっとも良好な増殖を示すが、溶血活性を上昇させるにはトリプトンの濃度を少なくする方が

表1 冷水病菌の増殖におよぼす改変サイトファーガ培地成分濃度の影響生データ(×10⁷CFU/ml)

		トリプトン濃度(g/l)				トリプトン濃度(g/l)					
		2	14	10	20	2	1	0.5	0.1		
イースト濃度 (g/l)	10	0.016	0.035	0.01	0.049	イースト濃度 (g/l)	0.5	49.0	21.2	11.5	5.8
	5	0.0084	0.014	0.061	0.15		0.25	47.0	21.0	36.0	29.0
	1	57	58	67	7.9		0.1	2.0	1.0	22.5	41.0
	0.5	84	67	78	20		0.01		2.0	23.0	21.5

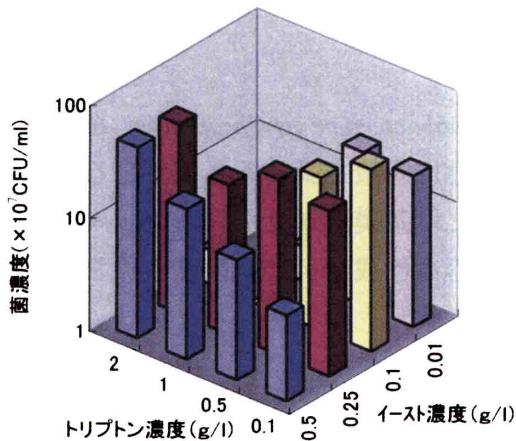
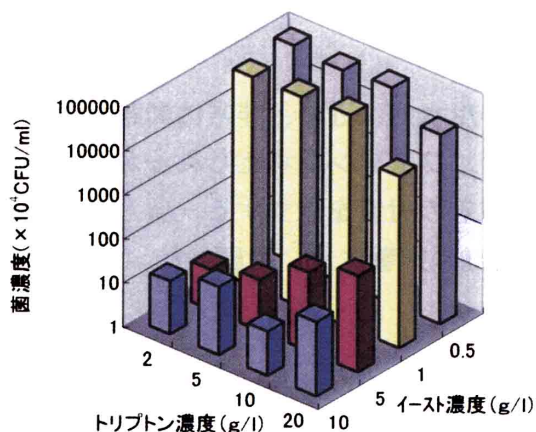


図1. 冷水病菌の増殖におよぼす改変サイトファーガ培地成分濃度の影響.

表2 冷水病菌の溶血物質産生におよぼす改変サイトファーガ培地成分濃度の影響生データ(溶血率: %)

		トリプトン濃度(g/l)				トリプトン濃度(g/l)					
		2	14	10	20	2	1	0.5	0.1		
イースト濃度 (g/l)	10					イースト濃度 (g/l)	0.5	5.7	6.1	7.2	8.9
	5						0.25	5.7	6.3	7.0	8.5
	1	9.3	8.9	4.9	2.0		0.1	5.6	6.9	8.1	8.3
	0.5	8.5	7.3	5.9	2.0		0.01	5.4	6.5	6.7	8.0

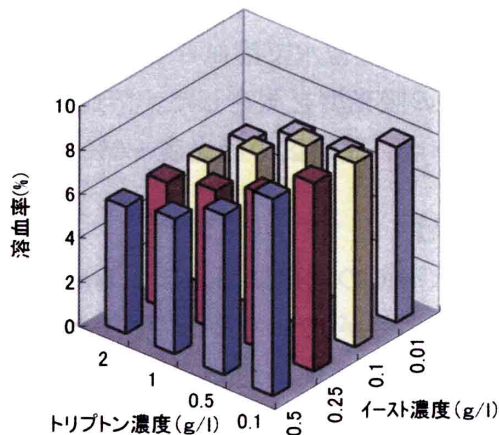
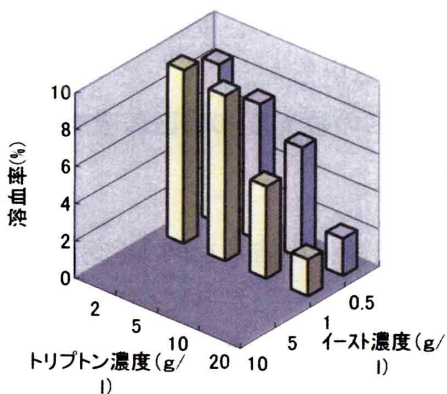


図2. 冷水病菌の溶血物質産生におよぼす改変サイトファーガ培地成分濃度の影響.