

4 4) 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IV ゲラチン添加の影響

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)の産生におよぼすゲラチン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。試験培養液は改変サイトファーガ培地(MCY)に1.0、0.5、0.1、0.01および0%になるようにゲラチン【和光純薬】を添加して作製し、50mlの培養液を100mlの三角フラスコに加えて使用した。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24h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24h振盪培養した。培養後の菌濃度は480nmの吸光度を測定して調べた試験は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($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$)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 2.5×10^7 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°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】

冷水病菌の増殖におよぼすゲラチンの添加の影響を調べた結果を図1に示した。すなわち、添加量が0.5%で最高値を示し、対照区のMCYをわずかに上回る増殖を示した。1.0、0.1および0.01%の添加では対照区を下回った。つぎに、冷水病菌の溶血物質産生におよぼすゲラチン添加の影響を調べた結果を図2に示した。すなわち、0.01~1.0%の添加で溶血活性は対照区の2倍程度と大きく活性が上昇した。また、ゲラチン濃度の上昇にともなって溶血活性も平行してわずかに上昇した。以上の結果から、ゲラチンの添加は量によっては増殖を抑制するが、溶血活性を大きく上昇させることが明らかとなった。このことはゲラチンの添加がプロテアーゼの産生を誘導し、溶血活性の形で検出された可能性もあり、今後詳しく検討していく必要があると考えられた。

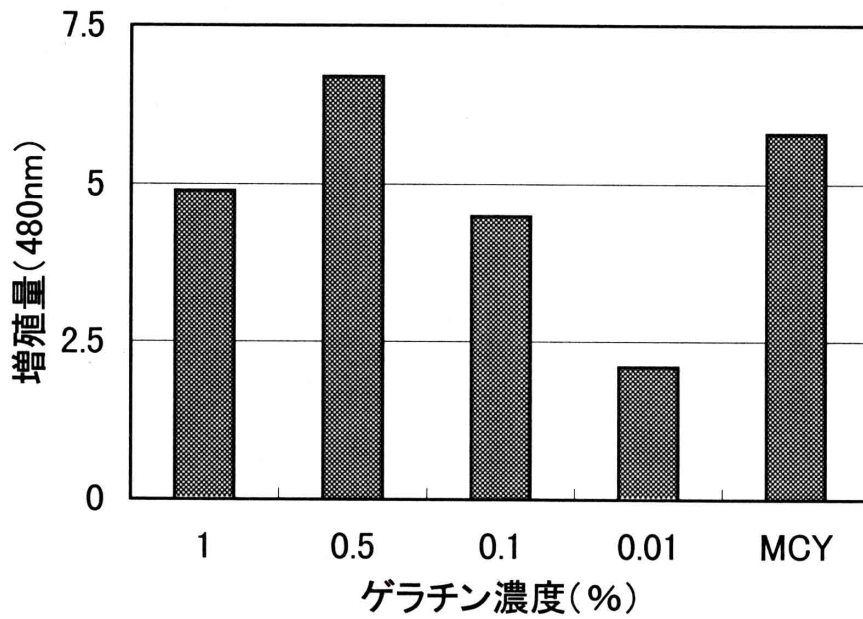


図1. 冷水病菌の増殖におよぼすゲラチン添加の影響.

※MCY: 改変サイトファーガ培地(ゲラチン不含).

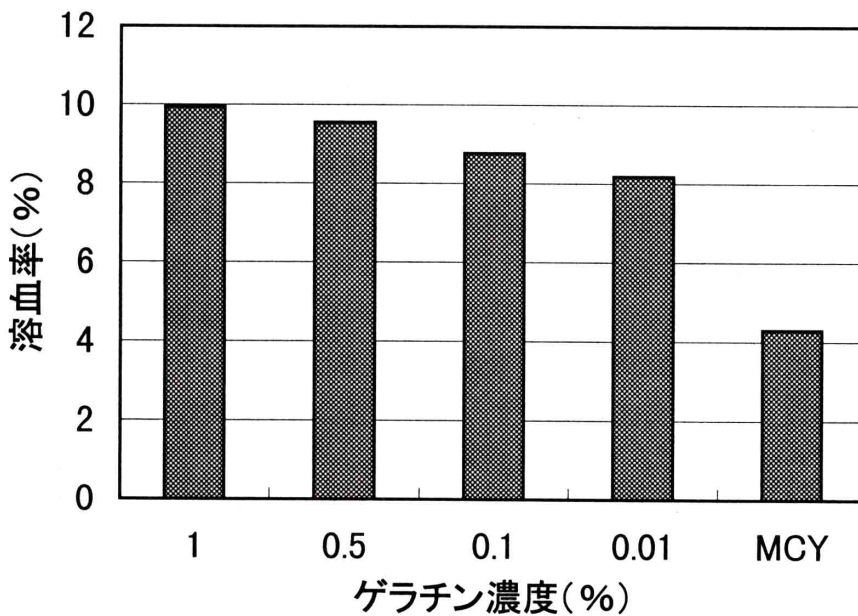


図2. 冷水病菌の溶血物質産生におよぼすゲラチン添加の影響.

※MCY: 改変サイトファーガ培地(ゲラチン不含).