

45) 冷水病菌の溶血物質等の産生におよぼす培養条件の影響 I 培養規模の影響

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)の産生におよぼす培養規模(容積)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)を用い、容量を1000、500、250、100、50および25mlとし、容器にはそれぞれ2000、1000、500、200、100および50mlの三角フラスコを用いた。培養は、まず種培養として50mlのMCYに供試菌を接種して15℃で24h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℃で4hインキュベートして行った。反応後、2,500 rpm(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培養規模の影響を調べた結果を図1に示した。すなわち、50～250mlの培養液規模で増殖はやや低位を示した。1000、500および25mlでは良好な発育を示していた。この結果だけでは培養規模が増殖におよぼす影響に規則性があるかどうかは判断できないが、差が生じることが明らかとなった。

つぎに、冷水病菌の溶血物質産生におよぼす培養規模の影響を調べた結果を図2に示した。すなわち、1000mlから250mlに培養規模を縮小するにしたがって溶血活性は6.5～8.9%とわずかに上昇し、250ml以下に縮小しても活性に変化は認められなかった。以上の結果から、培養規模は増殖に影響を及ぼすが溶血活性に大きく影響することは少ないと判断された。

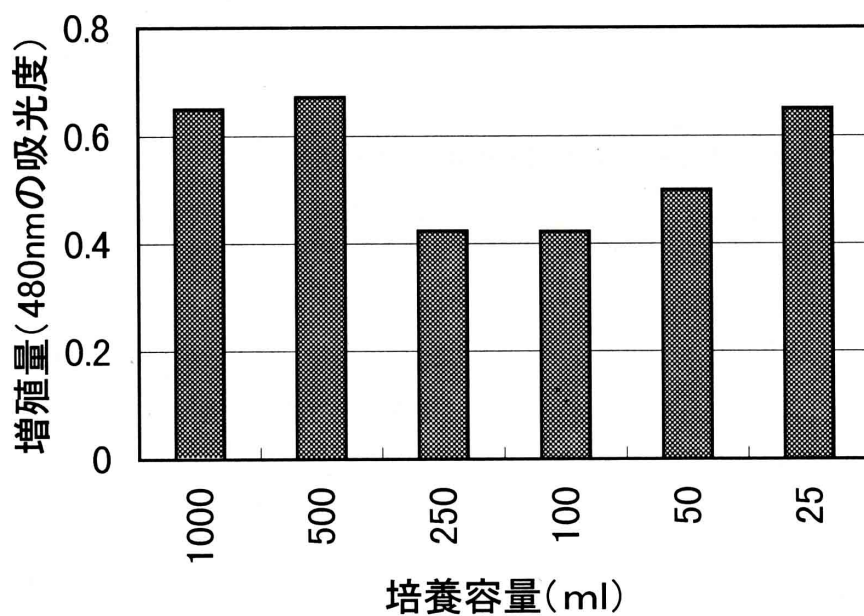


図1. 冷水病菌の増殖におよぼす培養規模の影響.

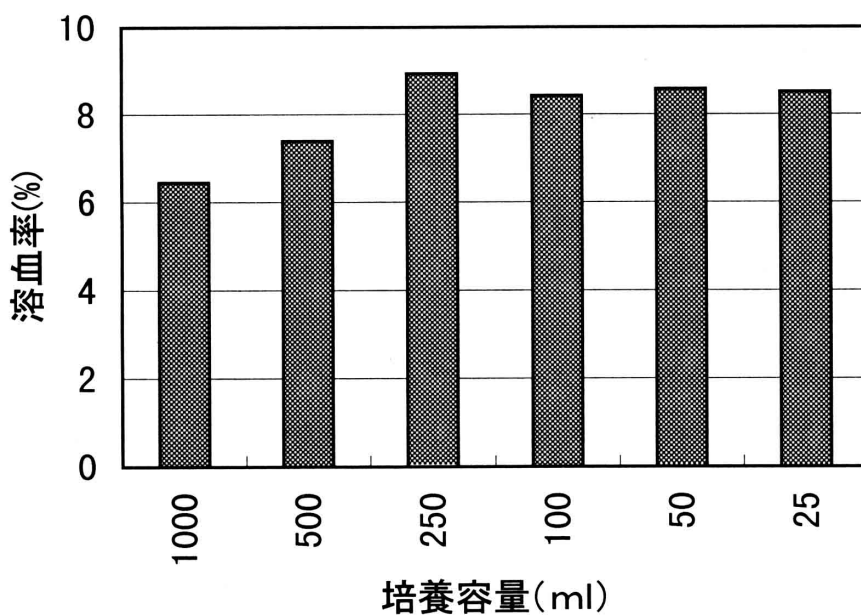


図2. 冷水病菌の溶血物質産生におよぼす培養規模の影響.