

4 6) 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Ⅱ グラチン添加培養における溶血・タンパク分解活性と生菌攻撃の強度

金辻宏明・二宮浩司・山本充孝・遠藤 誠

【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。これまでに、基礎的知見としてグラチンを基礎培地に添加して冷水病菌を培養したところ、増殖量および溶血活性が上昇することを見いだした。そこで本研究では冷水病被害の対策を確立する一環としてグラチンを基礎培地に添加したときの溶血活性およびタンパク分解活性について培養規模を変えて比較し、さらに本培養液を用いた攻撃試験を行って感染強度要因の検索を試みた。

【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グ培地(MCY)およびMCYにグラチン【和光純薬】を0.1%添加したGMCYを用い、その容積は100ml(200mlの三角フラスコ使用)および10ℓ(10ℓの三角フラスコ使用)とした。培養は本培養培地の100mlおよび10ℓで供試菌をそれぞれ50ml(100ml三角フラスコ)および200ml(500ml三角フラスコ)に接種して15℃で振盪して24h培養し、本培養培地にそれぞれ2および200mlを加えて15℃で攪拌して24h行った。培養液(上清)の溶血活性はウマ血液を用いて前述と同様の方法¹⁾で行った。タンパク分解活性は次のようにして測定した。すなわち培養上清100μl、1%グラチン水溶液500μl、100mM塩化カルシウム50μlを混合して25℃で0(試験前ブランク)および30min静置後、10%トリクロロ酢酸を3ml加えて反応を停止させ、630nmの吸光度を測定した。なお、酵素活性の標準物質には100mMトリス塩酸緩衝液pH7.2に溶解したトリプシン(1:250)【Sigma】を用い、0.1~10μg/mlの濃度に調整して用いた。なお、活性は1μg/mlのトリプシンが1hにグラチンを分解する量を1ユニット(U)とした。攻撃は培養液を菌量がおおむね 1×10^7 CFU/mlになるように地下水で5ℓに希釈し、供試アユ(平均体重4.8gの琵琶湖産アユ、各区30尾)を15min浸漬して行い、60cm水槽で17.5℃で飼育した。

【結果】 冷水病菌を2種類の容積のグラチン含または不含の培地で培養し、各種活性を測定した結果を図1に示した。その結果、グラチン分解活性は培養規模で差が認められ、10L MCY、10L GMCY、100ml MCYおよび100ml GMCYでそれぞれ0.6、0.6、3.96および4.04Uと100ml培養の方が高い値を示した。溶血活性はそれぞれ1.3、2.6、0.9および1.0%と10ℓ培養でやや高い値を示した。増殖量は630nmの吸光度がそれぞれ0.18、0.18、0.90および0.94、生菌数で2.3、2.2、4.9および 6.4×10^8 CFU/mlであった。つぎに、上記培養液でアユを攻撃した結果および攻撃時の生菌数を図2および表1に示した。すなわち、攻撃時の菌濃度がおおむね同じとすると培養液の種類では生残率にほとんど差はなく、培養規模で差が認められ、10ℓと100mlで生残率はそれぞれ約30および47%であった。

以上の結果から、攻撃時の感染の程度は培養規模が大きい方が強いと判断された。その要因についてははっきりとしたデータは得られなかったため、今後、検討する必要があると考えられた。

文献 1) 金辻宏明：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，平成14年度滋養水試事報，in press (2003)。

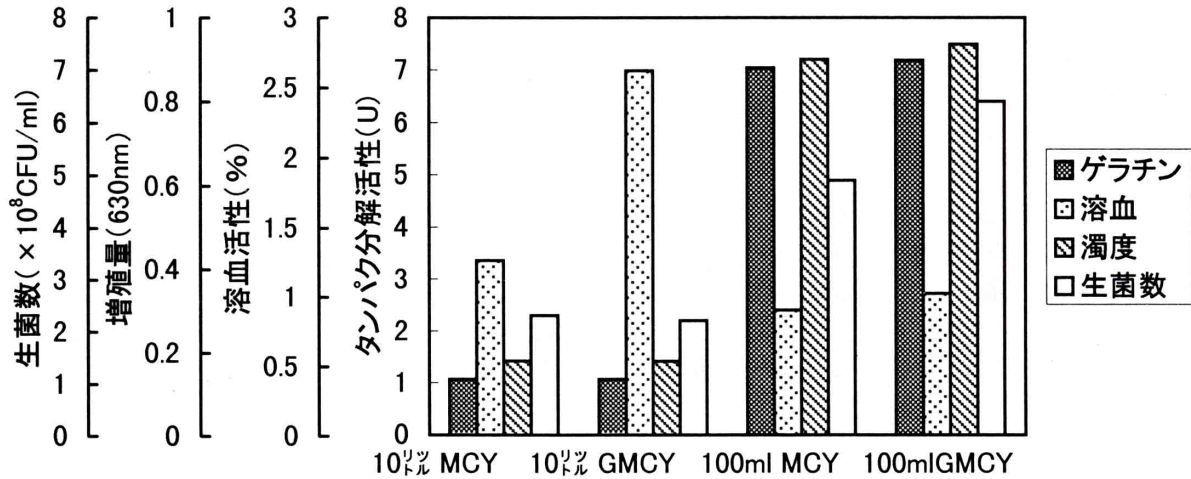


図1. 冷水病菌を通常培地(MCY)とゲラチン添加培地(GMCY)で培養したときの各種活性と培養規模の関係.

※MCY: 改変サイトファーガ培地, GMCY: 0.1%ゲラチン含MCY.

表1 浸漬攻撃時の生菌数

	使用培地	
	MCY	GMCY
10L	2.3×10^7 CFU/ml	2.2×10^7 CFU/ml
100ml	0.98×10^7 CFU/ml	1.18×10^7 CFU/ml

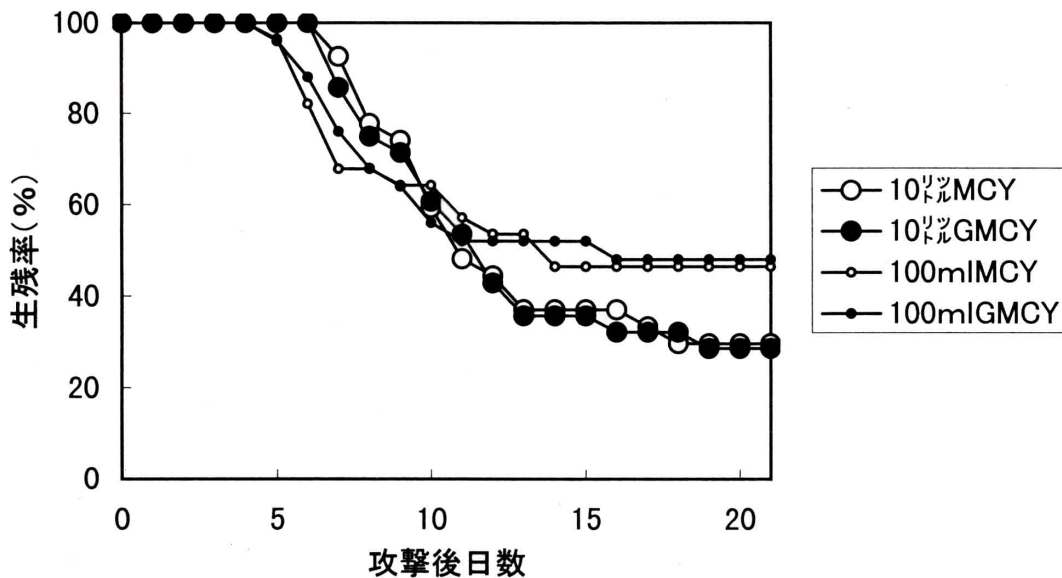


図2. 冷水病菌を通常培地(MCY)とゲラチン添加培地(GMCY)で培養したときの培養規模と攻撃強度の関係.

※MCY: 改変サイトファーガ培地, GMCY: 0.1%ゲラチン含MCY.