

エドワジエラ・イクタルリの検出における前培養用SS培地濃度の影響

金辻宏明

1. 目的

エドワジエラ・イクタルリは日本では平成19年に天然河川のアユで初めて確認され、滋賀県においても本菌の浸潤状況調査を行っている。手法はエドワジエラ・イクタルリ保菌検査マニュアル(増養殖研究所)によりSS培地で前培養(増菌)後にPCRで検出している。このSS培地は強い選択培地であるため、検出感度に影響をおよぼしている可能性がある。このため、SS培地の濃度と検出感度について検討した。

2. 方法

供試魚は滋賀県内の河川で平成28年9月7日、9月20日および10月13日に採捕したアユを用い、1採捕日の1試験にはそれぞれ40尾を使用した。

試験区の前培養SS培地は1.5倍希釈区、2倍希釈区および2%胆汁SS区(通常SS培地より雑菌繁殖抑制作用が高い)の3試験区を設けた。

希釈には滅菌蒸留水を、2%胆汁SS区には胆汁酸(No. 3, DIFCO)を後述のように添加した。

各試験区の培養原液は、供試魚を無菌的に開腹し、腎臓から滅菌綿棒により組織を掻き取り、その先端を通常濃度のSS培地1.2mLを加えた2mLチューブに入れて30秒間ボルテックスで攪拌処理したものを用いた。次に、綿棒の先端を取り出して0.5mLを試験区と対照区用にそれぞれ2mLチューブ2本に分注し、試験区用チューブの1.5倍希釈区(9/7採捕魚使用)および2倍希釈区(9/20採捕魚使用)には滅菌蒸留水を加えて希釈した。また、試験区用の2%

胆汁添加SS培地区(10/13採捕魚使用)のチューブには原液0.5mL(胆汁酸0.85%含)に3.15%胆汁酸水溶液0.5mLを混合した。対照区は原液0.5mLに通常濃度のSS培地0.5mLと混合した。

各サンプルはエドワジエラ・イクタルリ保菌検査マニュアル(増養殖研究所)に従い、25℃で16時間静置培養後、PCRで本菌を検出した。

3. 結果

1.5倍希釈区、2倍希釈区、2%胆汁SS区および対照区(通常濃度SS培地)で前培養を行い、PCRで検出した結果を表に示す。

各採捕日の対照区の陽性個体は1~25尾で、それぞれ比較できるサンプルが得られた。対照区の陽性尾数と各試験区との差は1.5倍希釈区では対照区陽性魚より2尾多く検出され、2倍希釈区では1尾多く検出されたが、対照区の陽性魚3尾が検出できなかった。2%胆汁SS区では対照区の陽性魚が1尾検出できなかった。

これらの結果から、前培養には、通常濃度のSS培地より薄い1.5倍希釈区の方が検出感度が上がると考えられた。しかし、2倍希釈区は対照区で陽性であった供試魚が雑菌の繁殖等により検出できない事例が出現したため、今回の試験では1.5倍希釈培地の方が至適であると考えられた。

今後、前培養で雑菌が抑制され、本菌の増殖感度が低下しない希釈率や成分を特定する等、前培養の改良でさらに検出感度を上げることができると考えられる。

表 エドワジエラ・イクタルリのPCR法による検出時における前培養用SS培地の濃度の影響

	1.5倍希釈SS		2倍希釈SS		2%胆汁SS	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
対照区	1	39	16	24	25	15
9/7 採捕アユ	3(+2)	37(±0)				
9/20 採捕アユ			18(+1)	22(-3)		
10/13 採捕アユ					24(-1)	16(±0)

※ カッコ内は対照区の陽性が試験区で陰性になった、または陰性が陽性になった尾数