

牛胎児血清添加培地における *Flavobacterium psychrophilum* の増殖

今 西 裕 一

細菌性冷水病の原因菌、*Flavobacterium psychrophilum* の増殖に及ぼす牛胎児血清の影響について検討した。TYE 寒天、血清不含 KDM-2 および KDM-2 (pH 7.2) における AK-0206 株の増殖は、前培養に用いた KDM-2 (pH 6.5) に比べて著しく抑制された。また、KDM-2 上で発育したコロニーは、血清を含まない培地上に発育したものよりも粘稠だった。さらに、KDM-2 (pH 7.2) および TYE 寒天 (pH 7.2) で培養した AK-0206 株の抗 FPC840 株血清に対する凝集抗体価は、互いに異なる値を示した。

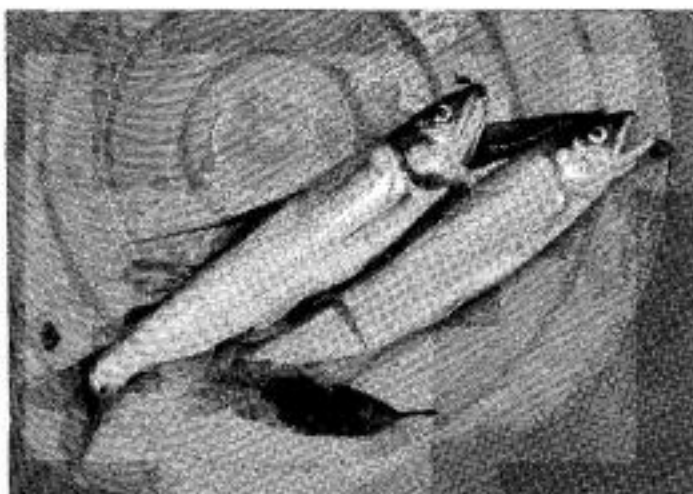
Flavobacterium psychrophilum は、我が国養殖業におけるギンザケ *Oncorhynchus kisutch* 稚魚およびアユ *Plecoglossus altivelis altivelis* の細菌性冷水病の原因菌としてよく知られている。また、国内の河川においては、近年、アユおよびオイカワ *Zacco platypus* で冷水病の発生が確認された (IDA and MIZOKAMI, 1996) ほか、採捕したヤマメ *Oncorhynchus masou masou*, ウグイ *Tribolodon hakonensis*, ウキゴリ *Chaenogobius urotaenia* およびヨシノボリ *Rhinogobius brunneus* の鰓から *F. psychrophilum* が検出されており (網田ほか, 2000), 河川における冷水病の蔓延が懸念されている。

F. psychrophilum を病魚から分離したり、実験室内で培養する場合には、一般的に改変サイトファーガ寒天培地およびトリプトンイーストエキストラクト寒天培地が用いられている (IDA and MIZOKAMI, 1996; IZUMI and WAKABAYASHI, 1997)。しかし、これらの培地における菌の増殖は遅く、コロニーが肉眼的に観察できるまでに数日間を要するため、迅速な対応が求められる魚病診断の現場では *F. psychrophilum* の分離、培養条件の改良が望まれている。

筆者は今回、河川で採捕された衰弱アユから、牛胎児血清 (fetal bovine serum; 以下 FBS という) を添加した培地により *F. psychrophilum* を分離する機会を得た。そして、この分離菌株の増殖に及ぼす FBS 添加の影響について検討したところ、本菌の培養条件に関していくつかの興味深い知見を得たので報告する。

材料と方法

供試菌株 2002年6月、府内の河川で採捕した衰弱アユ1尾 (尾叉長 13.4 cm, 体重 28.4 g) の腎臓から、KDM-2 (ネオペプトン: Difco 1%, イーストエキストラクト: Difco 0.05%, 塩酸システイン 0.1% 寒天: OXOID 1.5%, FBS: GIBCO 20%, pH 6.5) を用いて分離した



AK-0206 株を使用した。本菌株はグラム染色および顕微鏡観察によりグラム陰性長桿菌であることを確認し、TOYAMA *et al.* (1994) の方法に準拠した PCR 法で *F. psychrophilum* と査定した。

また、分離に際しては、NaCl を0.5%添加した BHI 寒天培地 (OXOID) および改変サイトファーガ寒天培地 (ポリペプトンペプトン : BBL 0.5%, イーストエキストラクト : Difco 0.125%, ラブレムコパウダー : OXOID 0.025%, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, 寒天 : OXOID 1.5%, pH 7.2) を併用したが、これらの培地では菌の分離はできなかった。

なお、以下の実験に供するまでの間、本菌株は KDM-2 (ネオペプトンの代わりにトリプトン : Difco を使用, pH 6.5 ; 以下, KDM-2 は本培地の略称として使用する) を用いて 18°C で継代培養した。

培地組成と菌の増殖およびコロニーの特徴 KDM-2 (pH 6.5) 上に発育した AK-0206 株の単一コロニーから滅菌燐酸緩衝食塩水 (Ca, Mg 不含) を用いて菌体懸濁液の10倍段階希釈液を調製した。この 20 μl を pH 6.5 および 7.2 に調整した3種類の培地, すなわち KDM-2, 改変 KDM-2 (FBS を含まない KDM-2; 以下 mKDM-2 という) およびトリプトンイーストエキストラクト寒天培地 (トリプトン : Difco 0.4%, イーストエキストラクト : Difco 0.05%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 寒天 : OXOID 1.5% ; 以下 TYEA という) に接種し, 接種6日後にコロニー形成単位 (colony forming unit, 以下 CFU という) を計数した。また, 形成されたコロニーについては, その特徴を観察した。

培地組成および培養時間と凝集抗体価の変化 上記実験において, KDM-2 (pH 7.2) および TYEA (pH 7.2) に発育した AK-0206 株の単一コロニーを, それぞれの培地に接種し, 24時間ごとに抗 *F. psychrophilum* 血清の凝集抗体価を測定した。なお血清は, 徳島県内のアユから分離された *F. psychrophilum* FPC840 株 (WAKABAYASHI *et al.*, 1994) に対する家兎血清 (社団法人日本水産資源保護協会配布) を使用した。

結果

培地組成と菌の増殖およびコロニーの特徴 菌体懸濁液 1 ml あたりの CFU は, KDM-2 (pH 6.5) で 4.5×10^6 と最も高く, 以下 KDM-2 (pH 7.2), TYEA (pH 7.2) そして TYEA (pH 6.5) と低下した (Table 1)。mKDM-2 では, 菌体懸濁液原液を接種した場合にのみ菌の増殖が観察

Table 1. Growth of *F. psychrophilum* strain AK-0206 on several different culture media (CFU/ ml^{*1})

pH	Culture medium		
	KDM-2	mKDM-2	TYEA
6.5	4.5×10^6	NC ^{*2}	6.8×10^2
7.2	5.0×10^3	NC ^{*2}	8.0×10^2

*¹ colony forming units per 1 ml of bacterial suspension.

*² Not counted; Single colony was not formed, though bacterium grew weakly.

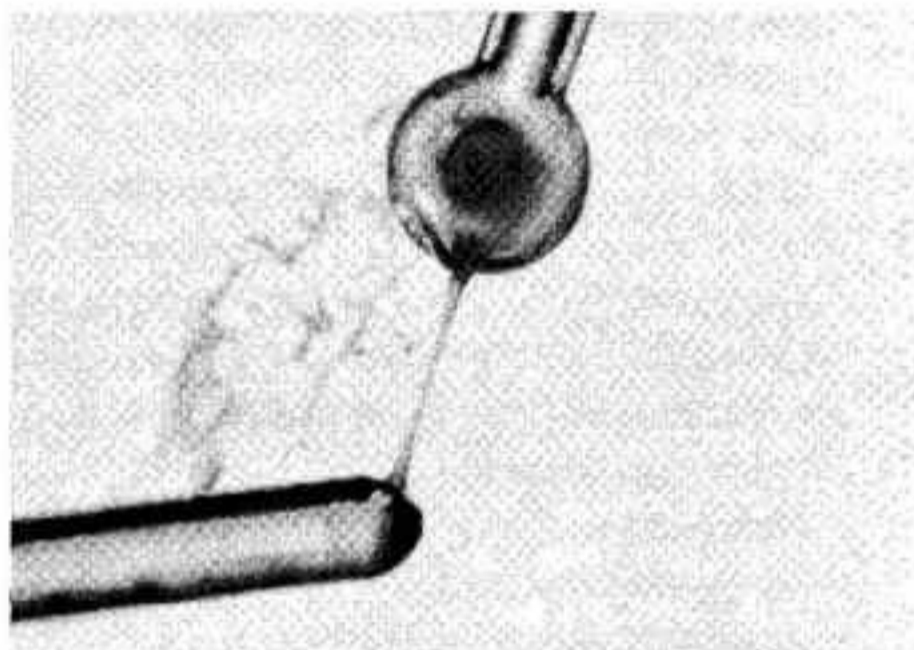


Fig. 1. The picture showing the viscosity of the colony of *F. psychrophilum* strain AK-0206 on KDM-2. The colony was very viscous.

されたが, 単独コロニーが形成されなかったため CFU を計数出来なかった。また, KDM-2 上に発育したコロニーは, 他の培地に発育したものと比較して, 色調および形状においては同等であったが, 著しく粘稠であった (Fig. 1)。

培地組成および培養時間と凝集抗体価の変化 KDM-2 (pH 7.2) で培養した AK-0206 株に対する凝集抗体価は, 接種48, 72および96時間後のいずれの時点においても64であった (Table 2)。一方, TYEA (pH 7.2) で培養した場

Table 2. Agglutinin titer of anti-*F. psychrophilum* strain FPC840 serum.

Culture medium (pH)	Length of culture after inoculation (hours)			
	24	48	72	96
KDM-2 (7.2)	NT*	64	64	64
TYEA (7.2)	NT*	256	128	256

* Not tested; Bacterium did not grow sufficiently.

合、その値は48時間後に256であったが、72時間後には128に下降し、96時間後には再び256に上昇した。このようにKDM-2 (pH 7.2) および TYEA (pH 7.2) で培養したAK-0206株は、互いに異なる凝集性を示し、後者では培養時間の長さによって凝集性が変化した。

考察

AK-0206株の増殖は、継代培養に用いたFBS添加のKDM-2 (pH 6.5) と比較して、FBS無添加のmKDM-2およびTYEAでは著しく低下したことから、FBS添加の有無が同株の増殖を左右することが明らかになった。また、KDM-2では、他の培地と比べ、AK-0206株のコロニーが著しく粘稠であったことから、FBS添加が同菌株のコロニーの粘稠度にも影響を及ぼすものと考えられる。

培地への血清添加には、酸化ペプトン等の増殖阻害物質を吸着する効果のほか、ビタミンとしての増殖促進効果、さらに蛋白質の栄養添加効果があると言われている(坂崎ほか, 1986)。今回の実験結果からは、FBSの添加により培地中のどの阻害成分が吸着されるのか、あるいはFBSに含まれるどの成分が*F. psychrophilum*の増殖およびコロニーの粘稠度に影響するのかわからないが、培地へのFBS添加が本菌株の増殖を促進することは明らかである。また、FBS添加の同じKDM-2であっても、pH 6.5の培地とpH 7.2のそれではAK-0206株のCFUが顕著に異なったことから、培地のpHによってFBSの*F. psychrophilum*に対する増殖促進効果が変わることが示唆される。

一方、KDM-2 (pH 7.2) とTYEA (pH 7.2) の培養菌体間で観察された凝集性の差異は、菌体表面の抗原性が培地組成によって変化することを示している。冷水病診断の現場で一般的に使用される改変サイトファーガ寒天培地は、ワクチン開発における*F. psychrophilum*菌体調製用培地としても使用されている(RAHMAN *et al.*, 2000)が、使用菌体表面の抗原性は、有効性の高いワクチン開発におけ

る重要な要素と考えられ、もし菌体表面の抗原性が培地組成の影響を受けるとすれば、培養条件の改良は魚病診断のみならずワクチン開発においても重要な課題と言えるだろう。

今回凝集性の比較に使用した2種類の培地は、FBS添加の有無に加えて、ペプトン濃度および塩酸システインの有無についても組成が異なる。このため、単純にFBS添加と凝集性の関係を論じることは出来ない。しかし、培地中のFBSが*F. psychrophilum*の増殖に影響を及ぼすことはすでに述べたとおりであり、今後は、病魚からの分離効率および培養時間の短縮等、実用性向上の観点からFBS添加培地の有効性を検討する必要があるだろう。

参考文献

- 網田健次郎・星野正邦・本間智晴・若林久嗣. 2000. 河川における*Flavobacterium psychrophilum*の分布調査. 魚病研究, **35**: 193-197.
- IDA, Y. and MIZOKAMI, A.. 1996. Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. *Fish Pathol.*, **31**: 157-164.
- IZUMI, S. and WAKABAYASHI, H.. 1997. Use of PCR to detect *Cytophaga psychrophila* from apparently healthy juvenile ayu and coho salmon eggs. *Fish Pathol.*, **32**: 169-173.
- 坂崎利一・吉崎悦郎・三木寛二. 1986. 新細菌培地学講座・上. 150-153, 近代出版, 東京.
- TOYAMA, T., KITA-TSUKAMOTO, K. and WAKABAYASHI, H.. 1994. Identification of *Cytophaga psychrophila* by PCR targeted 16S ribosomal RNA. *Fish Pathol.*, **29**: 271-275.
- RHAMAN, M.H., OTOTAKE, M., IIDA, Y., YOKOMIZO, Y. and NAKANISHI, T.. 2000. Efficacy of oil-adjuvanted vaccine for coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, **35**: 199-203.

Synopsis

Growth of *Flavobacterium psychrophilum* on the Medium Supplemented with Fetal Bovine Serum

Yuichi IMANISHI

The effects of fetal bovine serum on the growth of *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of bacterial cold-water disease were examined. Growth of the strain AK-0206 was remarkably reduced on TYE agar, KDM-2 without serum, and KDM-2 (pH 7.2) compared with KDM-2 (pH 6.5) which was used to pre-culture. And the colonies on KDM-2 were more viscous than those on media without serum.

Moreover the strain AK-0206 cultured on KDM-2 (pH 7.2) was different from that cultured on TYE agar (pH 7.2) in agglutinin titer of anti-*F. psychrophilum* strain FPC840 serum.