

Flavobacterium psychrophilum のための新しい分離用培地

中津川俊雄, 今西裕一, 新井 肇*¹
永井崇裕*², 泉 庄太郎*¹

A Newly Designed Culture Medium for *Flavobacterium psychrophilum*

Toshio Nakatsugawa, Yuichi Imanishi, Hajime Arai*¹,
Takahiro Nagai*² and Shotarou Izumi*¹

A strain of *Flavobacterium psychrophilum* was isolated on KDM-2 agar, the medium for BKD (bacterial kidney disease) agent, from ayu *Plecoglossus altivelis* infected with bacterial coldwater disease (BCWD) in Kyoto Prefecture, but it could not grow on modified *Cytophaga* agar, which has been recommended for the isolation of BCWD agent from ayu. Therefore, a new culture medium for this strain (AK-0206) was designed by modifying KDM-2. As a result, tryptone yeast extract fetal bovine serum (TYFBS) medium consisting of 0.05% tryptone, 0.02% yeast extract and 5% FBS was developed. The TYFBS agar (agar 2%) proved to provide a higher detection rate of *F. psychrophilum* from non-diseased and diseased ayu than modified *Cytophaga* and another commonly used medium, tryptone yeast extract salts (TYES) medium.

キーワード: *Flavobacterium psychrophilum*, 培養培地, 細菌性冷水病, アユ *Plecoglossus altivelis*

一般に, 冷水病原因菌の分離培養には, サイトファーガ寒天培地, 改変サイトファーガ寒天培地および TYES 寒天培地 (若林, 2004a) あるいは AOAЕ 培地 (Lorenzen, Karas, 1992) が使用される。また, トブラマイシンを添加した AOAЕ 培地は, 冷水病原因菌の分離選択培地として有効とされた (Kumagai *et al.*, 2004)。一方, 我が国における冷水病の検査マニュアル*³では改変サイトファーガ寒天培地が推奨されている。

著者らは, 2002年6月に京都府北桑田郡 (現: 南丹市) 内の由良川本流域で採取した冷水病罹病魚と疑われるアユ *Plecoglossus altivelis* 2尾 (死魚) の腎臓から, 改変サイトファーガ寒天培地および細菌性腎臓病原因菌 *Renibacterium salmoninarum* の分離培地である KDM-2 培地を用いて細菌分離を試みたところ, *Flavobacterium psychrophilum* が KDM-2 培地でのみ分離された。KDM-2 培地は改変サイトファーガ寒天培地と異なり, 牛胎児血清 (Fetal bovine serum: FBS と略記) および塩酸システインを含んでいるうえ, 塩類が添加されていない。

今回の由良川での *F. psychrophilum* 分離事例から, 従来推奨されてきた培地では分離できない *F. psychrophilum* 株の存在が示されたため, KDM-2 培地を基礎として新しい冷水病原因菌分離用培地を作成した。そ

の有用性を寒天培地の性能比較で検証した。

材料および方法

培地組成の検討 培地組成を検討するため, 寒天を除いた KDM-2 培地 (ペプトン 1%, 酵母エキス 0.05%, 塩酸システイン 0.1%, FBS 20%) (若林, 2004b) を基本培地とし, 順次塩酸システイン, FBS, 酵母エキスおよびトリプトンの濃度を変えて, 以下の試験 1~4 を実施した。いずれの試験においても, 培地の pH は 10% Na₂CO₃ で 7.0~7.2 になるよう調整し, 培地は濾過滅菌した。なお, 順次実施した試験結果を受けて各成分の添加濃度を決定して, 以下の試験に供した。

試験 1. 塩酸システインの濃度 この試験では, 塩酸システインを 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.05, 0.1, 0.15, 0.25, 0.35% および 0.5% となるよう添加した。

試験 2. FBS の濃度 この試験では, 塩酸システインを添加しない KDM-2 培地を基本培地とし, FBS (Gibco) を 0, 0.5, 1, 2.5, 3.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15% および 20% となるよう添加した。

試験 3. 酵母エキスの濃度 この試験では, 塩酸システイン 0%, FBS 5% とした培地を基本培地とし, 酵母エキス (Difco) を 0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.1% および 0.2% 添加した。

*¹ 群馬県水産試験場 群馬県前橋市敷島町13 (Gunma Prefectural Fisheries Experiment Station, Shikishima 13, Maebashi, Gunma 371 0036, Japan)

*² 広島県立水産海洋技術センター 広島県呉市音戸町波多見6-21-1 (Hiroshima Prefectural Fisheries and Marine Technology Center, Hatami 6-21-1, Ondo, Kure, Hiroshima 737-1207, Japan)

*³ アユ冷水病対策協議会, 2004. アユ冷水病防疫に関する指針. 資料1 培養によるアユ冷水病菌の検出

試験4. トリプトンの濃度 この試験では、塩酸システイン0%, FBS 5%, 酵母エキス0.02%とした培地を基本培地とし、トリプトン (Difco) を0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.75, 1, 1.5% および3%添加した。

供試菌は、KDM-2 (由良川での事例では、ペプトンとしてネオペプトン (Difco) を使用) で分離培養された AK-0206 株とした。AK-0206 株は、黄色コロニーを形成するグラム陰性の長桿菌であり、Toyama *et al.* (1994) の方法に準拠した PCR 法で、*F. psychrophilum* であることを確認した。5% FBS 添加 TYES 培地で前培養した供試菌株を、滅菌 PBS (-) を用いて10倍階段希釈 ($10^1 \sim 10^6$ あるいは 10^7) し、接種材料とした。

24穴マルチプレート (Falcon) に1穴あたり上記の供試培地 1 mL を分注し、その中に各希釈菌液 10 μ L を接種して 18°C で7~12日間培養した。接種後は、各穴中の供試菌の発育を実体顕微鏡により観察し、濁りが認められた最も高い希釈段階での各成分の添加濃度を最適添加濃度とした。なお、濁りが本菌株の増殖によるものかどうかは、培養の一部を高倍率で鏡検し、単一の *F. psychrophilum* 様の長桿菌であることにより確認した。

試験培地の性能比較

試験1. 液体培地における性能比較 上記の KDM-2 培地を基本培地とした培地組成の検討結果をもとに作製した培地 (試験培地と略記: トリプトン0.05%, 酵母エキス0.02%, FBS 5%), 改変サイトファーガ培地および TYES 培地の3種の液体培地について性能比較を行った。

供試菌株として先の AK-0206 株以外に、Table 1 に示したアユ、オイカワおよびヤマメから分離された冷水病原菌11株を用い、 $10^1 \sim 10^6$ 倍希釈した菌液を、培地組成の検討で用いた方法と同様に接種し、18°C で8日間培養し観察した。

試験2. 寒天培地による性能比較 本試験では、寒天 (Bacto Agar: Difco) を添加した試験培地 (2% 添加) と改変サイトファーガ培地 (1.5% 添加) および TYES 培地 (1.5% 添加) を比較した。試験培地における FBS の添加方法は、寒天培地をオートクレーブ滅菌して、55°C のウォーターバスで保温した後、同じ温度で保温した所定量の FBS を添加して平板に流した。なお、FBS の添加により寒天強度が低下するため、試験培地では寒天濃度を2%とした。

京都府内の河川に放流される養殖アユ種苗 (湖産) の冷水病菌検査を上記3種の寒天平板培地を用いて実施した。2005年5月9日に供試材料のアユ56尾の下顎部体表を3種の培地に直接スタンプし、腎臓からは無菌的に1白金耳の血液を採取して培地に塗抹した。18°C で4日間培養し、透明感のある黄色コロニーを単離培養し、供試菌とした。これらの供試菌株が長桿菌であることを確認した上、前述の方法および Izumi, Wakabayashi (2000) の方法に準拠した PCR 法で、*F. psychrophilum* であるかどうかを調べ、3種の培地における冷水病原菌の検出率を比較した。

また、2005年7月に群馬県内の河川で採捕された冷水病の特徴的な外部症状を呈する6尾の死亡アユと6尾の瀕死アユを供試し、試験寒天培地と TYES 寒天培地を用いて冷水病原菌の分離を行った。分離部位は鰓、腎臓、病変患部 (体表の穴あき部位および下顎

Table 1 Source and growth of *Flavobacterium psychrophilum* strains tested

Strain	Origin	Isolation		Growth* ⁴ in liquid media		
		Location	Date	TYFBS* ⁵	MCY* ⁶	TYES* ⁷
PH-9304	Ayu* ¹	Hiroshima	Jul. 1993	10 ³	10 ³	10 ³
PH-9334	Ayu	Hiroshima	Sep. 1993	10 ³	10 ³	10 ³
ZH-9306	Pale chub* ²	Hiroshima	Aug. 1993	10 ³	10 ³	10 ³
SG990302	Ayu	Shiga	Mar. 1999	10 ³	10 ³	10 ³
PH-0003	Ayu	Hiroshima	May 2000	10 ⁴	10 ³	10 ³
OH-0016	Masu salmon* ³	Hiroshima	Dec. 2000	10 ³	10 ³	10 ¹
PH-0103	Ayu	Hiroshima	May 2000	10 ³	10 ³	10 ³
PH-0215	Ayu	Hiroshima	Jun. 2002	10 ³	10 ³	10 ³
AK-0206	Ayu	Kyoto	Jun. 2002	10 ⁴	—* ⁸	10 ²
AK-0302	Ayu	Kyoto	Apr. 2003	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴
ZH-0412	Pale chub	Hiroshima	May 2004	10 ⁴	10 ¹	10 ¹
PH-0424	Ayu	Hiroshima	Jun. 2004	10 ³	10 ³	10 ³

*¹ Ayu, *Plecoglossus altivelis*; *² Pale chub, *Zacco platypus*; *³ Masu salmon, *Oncorhynchus masou masou*. *⁴ Growth: expressed as the highest dilution of inoculum that grew in each tested medium. *⁵ TYFBS medium (tryptone 0.05%, yeast extract 0.02%, FBS 5%). *⁶ MCY: modified *Cytophaga* medium. *⁷ TYES: tryptone yeast extract salts medium. *⁸ —: no growth.

発赤部位)とし、腎臓は18°Cで5日間培養、鰓および病変患部は10°Cで7日間培養した。寒天培地上の黄色コロニーを単離培養し、Izumi, Wakabayashi (2000)に準拠したPCR法で冷水病原菌の同定を行った。

結果および考察

培地組成の検討 塩酸システイン濃度の結果をTable 2に示した。0.25%以上添加すると、供試したAK-0206株はいずれの希釈段階でも全く発育しなかった。

0.01~0.1%では10⁴倍希釈まで発育し、0%のみ10⁵倍希釈まで発育がみられた。したがって、塩酸システインは添加しないほうが良いと判断された。

FBS濃度の結果をTable 3に示した。0%では供試菌は全く発育せず、0.5~1%添加では接種菌液が10¹倍希釈でのみ発育した。2.5および3.5%添加では10⁴倍および10⁵倍希釈まで発育し、5%以上では10⁶倍希釈まで発育した。そこでFBS添加濃度は5%とした。

酵母エキス濃度の結果をTable 4に示した。添加濃度が0~0.05%の範囲では接種菌液が10¹~10⁴倍希釈

Table 2 Effect of L-cysteine monohydrochloride concentration in test medium on the growth of *Flavobacterium psychrophilum* AK-0206 strain inoculated at different dilutions after 7 days

dilution level	concentration (%)									
	0	0.01	0.02	0.04	0.05	0.1	0.15	0.25	0.35	0.5
10 ¹	+*1	+	+	+	+	+	+	—*2	—	—
10 ²	+	+	+	+	+	+	+W*3	—	—	—
10 ³	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
10 ⁴	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
10 ⁵	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10 ⁶	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

*1: growth. *2: no growth. *3: weakly growth.

Table 3 Effect of FBS concentration in test medium (without L-cysteine monohydrochloride) on the growth of *F. psychrophilum* AK-0206 strain inoculated at different dilutions after 10 days

dilution level	concentration (%)										
	0	0.5	1	2.5	3.5	5	7.5	10	12.5	15	20
10 ¹	*1	+*2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ²	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ³	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁴	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁵	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁶	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+

*1: no growth. *2: growth.

Table 4 Effect of yeast extract concentration in test medium (with no L-cysteine monohydrochloride and 5% FBS) on the growth of *F. psychrophilum* AK-0206 strain inoculated at different dilutions after 12 days

dilution level	concentration (%)								
	0	0.005	0.01	0.02	0.03	0.05	0.1	0.2	
10 ¹	+*1	+	+	+	+	+	+	+	
10 ²	+	+	+	+	+	+	+	+	
10 ³	+	+	+	+	+	+	+	+	
10 ⁴	+	+	+	+	+	+	—*2	—	
10 ⁵	—	—	—	+	—	—	—	—	
10 ⁶	—	—	—	—	—	—	—	—	

*1: growth. *2: no growth.

Table 5 Effect of tryptone (Difco) concentration in test medium (with no L-cysteine monohydrochloride, 0.02% yeast extract and 5% FBS) on the growth of *F. psychrophilum* AK-0206 strain inoculated at different dilutions after 9 days

dilution level	concentration (%)									
	0	0.05	0.1	0.2	0.4	0.5	0.75	1	1.5	3
10 ¹	+* ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	—* ²
10 ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
10 ³	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—
10 ⁴	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—
10 ⁵	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
10 ⁶	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
10 ⁷	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

*¹: growth. *²: no growth.

で供試菌の発育がみられ、0.1および0.2%添加では10³倍希釈まで発育した。10⁵倍希釈で発育がみられたのは0.02%添加だけであった。そこで酵母エキスの添加濃度を0.02%とした。

トリプトン濃度の結果を Table 5 に示した。0～0.2%の添加濃度では接種菌液が10¹～10⁵倍希釈の範囲で供試菌は発育した。0.4, 1 および1.5%添加では10⁴倍希釈まで供試菌の発育がみられ、0.5%では10³倍希釈まで、0.75%では10²倍希釈まで発育した。3%添加ではいずれの希釈段階でも発育しなかった。0～0.2%の添加濃度中0.05%添加でのみ10⁶倍希釈まで発育がみられた。そこでトリプトンの添加濃度を0.05%とした。

試験培地の性能比較 上記培地組成の検討結果を元に、京都府下でアユ病魚より分離された *F. psychrophilum* AK-0206 株の培養培地として、トリプトン0.05%, 酵母エキス0.02%およびFBS 5%から成る試験培地を作成した。なお、この試験培地に対してTYFBS 培地という名称をつけた(以下、試験培地をTYFBS 培地と呼ぶ)。

試験1. 液体培地における性能比較 結果を Table 1 に示した。供試した *F. psychrophilum* 12株のうち、TYFBS 培地での発育が改変サイトファーガ培地あるいはTYES 培地より優れていたのは5株であり、特にAK-0206 株とオイカワ由来のZH-0412 株の2株で顕著な差が見られた。ヤマメ由来のOH-0016 株では、TYES 培地での発育が他の2つの培地に較べ劣った。

試験2. 寒天培地による性能比較 放流用アユ種苗における冷水病保菌検査の結果をTable 6 に示した。TYFBS 寒天培地における冷水病原因菌の検出率は、下顎部からは63%であったのに対し、改変サイトファーガ寒天培地およびTYES 寒天培地では20%および7%とはるかに低かった。腎臓からの分離では、TYFBS 寒天培地が20%であったが、改変サイトファーガ培地およびTYES 培地では4%および2%

Table 6 Comparison in *F. psychrophilum* detection rates on TYFBS agar, modified *Cytophaga* agar (MCY) and TYES agar from the lower jaw and the kidney of 56 cultured ayu

Isolation site	TYFBS agar* ¹	MCY* ²	TYES* ³
Lower jaw	63%	20%	7%
Kidney	20%	4%	2%

*¹ TYFBS agar: tryptone 0.05%, yeast extract 0.02%, FBS 5% and agar 2%. *² MCY: modified *Cytophaga* medium. *³ TYES: tryptone yeast extract salts medium.

Table 7 Comparison in *F. psychrophilum* detection rates on TYFBS agar and TYES agar from the gill, kidney and affected skin of 12 naturally infected ayu

Isolation site	TYFBS agar* ¹	TYES* ²
Gill	67%	25%
Kidney	92%	75%
Affected skin	67%	67%

*¹ TYFBS agar: tryptone 0.05%, yeast extract 0.02%, FBS 5% and agar 2%. *² TYES: tryptone yeast extract salts medium.

にすぎなかった。

河川採捕罹病アユ12尾からのTYFBS 寒天培地とTYES 寒天培地を用いた冷水病原因菌の分離率はそれぞれ、鰓で67%と25%、腎臓で92%と75%、病変患部では共に67%であった(Table 7)。

アユ、オイカワおよびヤマメから分離された *F. psychrophilum* 12株を用い、TYFBS 培地を含む3種の液体培地の培養性能を比較した結果では、AK-0206 株を含めた2株以外の10株に対して特に優れているという結論は得られなかった。しかし、寒天を加えた上記3種の培地を用い、河川放流アユ種苗の冷水病原因菌の保菌検査を実施したところ、TYFBS 寒天培地における原因菌の検出率は改変サイトファーガ寒天培地

および TYES 寒天培地よりはるかに優れていることが確認された。このことは、FBS の添加が寒天中に含まれる有害物質の作用を緩和させること（坂崎ら，1986）によるものであろう。また，河川採捕アユからの TYFBS 寒天培地と TYES 寒天培地における冷水病原菌の分離率の比較では，分離部位として病変患部では差はみられなかったものの，鰓および腎臓では TYFBS 培地の方が高く，TYFBS 寒天培地を用いた分離が明らかに優れた方法であることが分かった。一方，Michel *et al.* (1999) は，AOAE 培地や TYES 培地に対する血清の 5% 添加効果を検証しており，馬脱纖維素血清で代替できるとした。したがって，今回の一連の試験では，*F. psychrophilum* の発育における FBS の添加効果を追認するとともに，AK-0206 株のような発育特殊性を有する *F. psychrophilum* の分離・培養には FBS，馬血清等の血清は必須であり，血清添加寒天培地が特殊株を含めた本菌の分離には有用であることを明らかにした。

謝 辞

本稿の御校閲を賜った東北大学大学院農学研究科の室賀清邦教授に深謝する。また，菌株を譲渡頂いた滋賀県水産試験場の二宮浩司氏（現滋賀県水産課）に感謝する。

文 献

Izumi S., Wakabayashi H. 2000. Sequencing of *gyrB* and their application in the identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR. *Fish Pathol.*,

35: 93-94.

Kumagai A., Nakayasu C., Oseko N. 2004. Effect of tobramycin supplementation to medium on isolation of *Flavobacterium psychrophilum* from ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, 39: 75-78.

Lorenzen E., Karas N. 1992. Detection of *Flexibacter psychrophilus* by immunofluorescence in fish suffering from fry mortality syndrome: a rapid diagnostic method. *Dis. Aquat. Org.*, 13: 231-234.

Michel C., Antonio D., Hedrick R.P. 1999. Production of viable cultures of *Flavobacterium psychrophilum*: approach and control. *Res. Microbiol.*, 150: 351-358.

坂崎利一，吉崎悦郎，三木寛二. 1986. 「新細菌培地学講座第二版—上—」. 150-151. 近代出版. 東京.

Toyama T., Kita-Tsukamoto K., Wakabayashi H. 1994. Identification of *Cytophaga psychrophila* by PCR targeted 16S ribosomal RNA. *Fish Pathol.*, 29: 271-275.

若林久嗣. 2004a. 細菌性冷水病 (Bacterial cold-water disease). 「魚介類の感染症・寄生虫病」(若林久嗣・室賀清邦編). 177-183. 恒星社厚生閣, 東京.

若林久嗣. 2004b. サケ科魚類の細菌性腎臓病 (Bacterial kidney disease: BKD). 「魚介類の感染症・寄生虫病」(若林久嗣・室賀清邦編). 136-141. 恒星社厚生閣, 東京.