

# 魚病診断マニュアル

## メガイアワビの *Francisella* 属菌感染症の診断

### 分離・培養

(平成21年3月 暫定版)

独立行政法人 水産総合研究センター  
養殖研究所 病害防除部, 魚病診断・研修センター

## Francisella 属の菌が感染したメガイアワビの診断方法

### 分離・培養

瀕死もしくは死亡したメガイアワビの腹足の表面を70%アルコールで拭いて、表層を除菌します。腹足からシリンジを用いて血リンパ液を採取します。もしシリンジで血リンパ液を採取できない時は、メスやカミソリで腹足を切り、浸みだしてくる液を採取します。この血リンパ液を寒天培地に塗布します。-80℃で凍結しておいた血リンパ液からも分離は可能でしたので、何かの感染が疑われるようなサンプルは凍結して保存して下さい。

### 寒天培地

ユーゴン・1%ヘモグロビン・70%海水・寒天培地を用いることによって分離培養が可能です。ヘモグロビンは最終濃度が1%(w/v)となるようにします。ユーゴン寒天培地はBBLなど市販のものを用います。ヘモグロビンもBBLなど市販のものを用います。200mlの培地を作る時は、140mlの海水(人工海水でも良い)に、200ml分量のユーゴン寒天培地を加えて溶解させて滅菌します。これとは別に60mlのDWにヘモグロビン粉末2gを溶かします。ヘモグロビン粉末はダメになりやすいので、溶けにくい時は、冷やしながら溶かすと良いです。ヘモグロビンがよく溶けたら滅菌します。ヘモグロビンを海水に溶かして滅菌すると、析出してしまいます。

滅菌後、60℃前後まで冷えたら、ユーゴン寒天培地とヘモグロビン溶液を混ぜてシャーレに注ぎます。この時、ヘモグロビンが析出する場合がありますが、少々の析出でしたら、菌は、はえますので、実用上、問題ありません。

白金耳に採取した血リンパ液を付け、この培地へ塗布します。培地は15-20℃でインキュベートします。菌は4-5日でコロニーを形成します。

この培地を調整する時に海水を用いていないと、この菌は全く増殖しません。アワビなど海産無脊椎動物の体内の浸透圧は、環境中の浸透圧とほぼ同じと言われております。そのため内部で増殖する菌も海水の浸透圧に適応しているのだと思います。もちろん、環境水と体内でのイオン組成は全く異なります。

なお、この培地は選択培地ではありません。あらゆる菌が生えてきます。分離されたコロニーは、PCRを用いて、この菌であるかを確認して下さい。ユーゴン培地以外にも、シスチン・ハート寒天や、パーキンサスの培養に用いるFTM(fluid thioglycollate medium)にバクトアガーを足したものに、ヘモグロビンを加えたものでも同様に増殖します。培地に用いる寒天はバクトアガーを使用して下さい。その他の銘柄では上手く増えない可能性があります。冷水病菌や細菌性鰓病菌などもそうなのですが、バクトアガーでなくては上手く増殖しないのが不思議です。

### 液体培地

液体培地は、ユーゴン・70%海水・2mMFeCl<sub>3</sub>培地を用います。寒天の入っていないユーゴン培地がBBLから販売されています。ユーゴン培地は、70%の海水で調整します。このユーゴン・70%海水培地だけでは、この菌の増殖は非常に悪いです。かといってヘモグロビンを入れると、培養液が黒色になってしまって、菌が増殖しているのかわからなくなります。そこで、ヘモグロビンのかわりに塩化鉄を入れます。FeCl<sub>3</sub>のストック溶液は、1MとなるようにDWに溶かして、0.22μmのフィルターで濾過します(オートクレーブをすると析出する)。あまり量は使わないので、ストックは10mlくらいあれば良いかと思えます。これを滅菌したユーゴン液体培地に1/500量加えます。最終濃度は2mMです。塩化鉄は1mMあれば十分なのですが、余裕を見て2mMとしています。液

体培地が1リットルなら、1M FeCl<sub>3</sub> は2ml 入れて混合します。ちなみに平板培地へ、ヘモグロビンの代わりに塩化鉄を入れても、あまり増殖しません。