

1. アユの魚病対策に関する研究費

1) 冷水病原菌に対する水平感染耐過アユおよび 注射ワクチン接種アユ血中特異抗体の特殊性

金辻宏明

【目的】 筆者はこれまでに*Flavobacterium psychrophilum* を原因菌とする冷水病の水平感染攻撃で生残したアユはホルマリン死菌(FKC)注射ワクチン接種よりもその後の水平感染に対して高い抗病性^{※1)}を示すことを明らかにした。本報では2種類の抗原を用いて特異抗体量の差異を検討した。

【方法】 供試菌には*F. psychrophilum* SG990302株を用いた。培養は供試菌を50mLのMCY液体培地に接種して15°Cで24時間振盪(100rpm)して行った。培養後これまでの報告^{※2)}と同様にしてFKCとした。冷水病水平感染耐過アユ^{※1)} および注射ワクチン接種アユ^{※3)} はこれまでの報告と同様に水平感染攻撃3週間後に生残したものおよびワクチンを注射してして6週間後のものを用い、これらアユより常法にしたがって血清を分離し、供試アユ血清を得た。抗原は、培養液10L^{※2)} を10,800×gで冷却遠心して集菌(湿重3.2g)したペレットを20mLのリン酸緩衝食塩水(PBS) pH7.0に浮遊させて60°Cで24時間静置して抽出し、27,700×gで15分間冷却遠心した上清を生菌抽出画分とした。この画分は図1に示すようにヒツジ赤血球(SRBC)に結合させ、感作赤血球を作製した。まず、ヒツジ保存血液〔ジャパンラム〕を1,600×gで冷却遠心し、0.1%クエン酸ナトリウムを含むPBSに再浮遊後、同様に冷却遠心した。再度洗浄後、SRBCを2%になるように0.02%グルタルアルデヒド〔和光純薬：電子顕微鏡用〕を含むPBSに浮遊させ、25°Cで2時間振盪させて固定した。固定後、前述と同様にPBSで1回洗浄し、血球容積が2.5%になるようにPBSに浮遊させ、0.005%タンニン酸〔和光純薬：生化学用〕を含むPBSと等量混合して37°Cで15分間インキュベートした。その後、前述と同様にPBSで1回洗浄して血球容積が2.5%になるようにPBSに浮遊させ、PBSで10倍希釈した生菌抽出画分と等量混合して37°Cで15分間反応させた。反応後、前述と同様にしてPBSで2回洗浄し、血球容積が2%になるようにPBSに浮遊させて感作赤血球とした。つぎに感作赤血球に対する供試アユ血清の抗体価を次に示すように受身赤血球法で調べた。V底の96穴プレート〔Costar〕にPBSで希釈した供試アユ血清および陽性対象の冷水病菌体FKCに対するウサギ抗血清^{※4)} の2倍段階希釈系列(50 μL/well)を作製し、感作赤血球を50 μL加えて4°Cで24時間静置後、凝集の有無を判定した。またこれら血清のFKCに対する凝集抗体価も同時にマイクロタイター法で検出した。

【結果】 供試アユ血清およびウサギ抗血清の生菌抽出画分に対する受身赤血球凝集抗体価およびFKCに対する凝集抗体価を検出した結果を表1に示した。感染耐過アユ血清は感作赤血球に対して1 : 8、FKCに対しては1 : 4と低く、注射ワクチン接種アユ血清ではそれぞれ1 : 16および1 : 2048と感作赤血球にだけ高く反応した。陽性対象のウサギ抗血清は感作赤血球に対して1 : 4096、FKCに対して1 : 512の反応性を示した。この結果から、注射ワクチン接種アユは冷水病菌に対して特異抗体を多量に産生しているが抗病性は低く、水平感染耐過アユは冷水病菌に対して特異抗体を少量産生するが抗病性が高いと考えられ、したがって両者は異なった免疫応答をしていると推察される。

※ 1) 金辻宏明・二宮浩司・山本充孝・遠藤誠：冷水病耐過アユの抗病性，平成14年度滋賀水試事報，204-205，(2003)。

※ 2) 金辻宏明：冷水病菌体を用いた免疫原性強化ワクチン作製方法の検討，平成14年度滋賀水試事報，186-187(2003)。

※ 3) 金辻宏明：ハプテン化および免疫原性強化した冷水病菌体ワクチンの有効性，平成14年度滋賀水試事報，188-189(2003)。

※ 4) 金辻宏明：アユ抗体および冷水病菌体に対するウサギ抗血清の作製と酵素標識，平成14年度滋賀水試事報，216-217，(2003)。

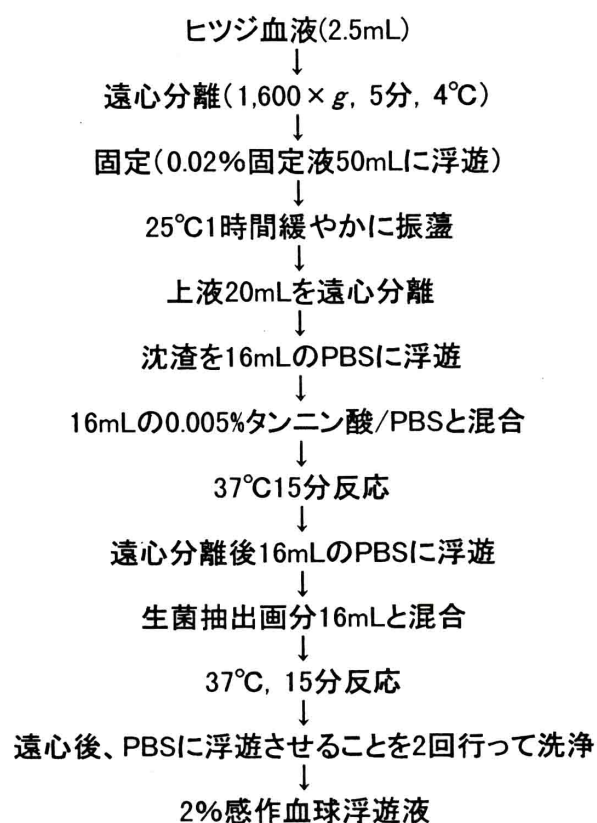


図1. 冷水病感作赤血球浮遊液の作製方法.

表1. 冷水病耐過アユおよびワクチン注射アユ血清の冷水病培養菌体抽出画分の受身赤血球抗体価およびFKCに対する凝集抗体価

抗血清	抗 原	
	生菌抽出画分	FKC
	抗体価(1:)	抗体価(1:)
ウサギ抗血清	4096	512
注射ワクチン接種アユ	2048	16
水平感染耐過アユ	8	4