

19) 冷水病感染耐過アユの混合感染菌に対する特異免疫応答

金辻宏明

【目的】 これまでに琵琶湖における冷水病死亡アユの腎臓より冷水病菌とともに*Aeromonas* 病菌体やその他の雑菌がしばしば分離^{*1)}される。このことからアユは冷水病感染を耐過する過程で冷水病菌以外にも排除した魚病細菌があるかもしれないと考え、本研究では、感染耐過魚が雑菌に対する免疫応答をして耐過しているならば感染耐過魚血清とその他の菌と反応すると考え、病魚分離菌と感染耐過魚血清との反応を酵素抗体免疫測定法(ELISA)で調べた。

【方法】 供試魚には11月に琵琶湖で採捕され、冷水病経験のない湖産アユを用いた。供試アユは水平感染による冷水病攻撃^{*2)}を行い、攻撃10~20日後の死亡アユの腎臓、脾臓、脳、腹腔液、血液、エラ、卵巣、精巣、体側患部および飼育排水より改変サイトファーガ寒天培地および10%ヒツジ保存血液〔ジャパンラム〕および0.85%NaClを含む血液寒天培地で培養(それぞれ15℃)して細菌の分離を行った。分離菌のコロニーは釣菌して50mM酢酸緩衝液pH4.5に懸濁(630nmの吸光度は0.03~0.05)に調節し、100 μ Lを96穴プレート〔Costar〕に加えて4℃で24時間固相化した。固相化後、水平感染耐過魚血清^{*2)}を用いたELISA^{*3)}で水平感染耐過魚が強く認識(490nmの吸光度がおおむね0.15以上)する細菌の検出を行った。明らかな反応が得られたコロニーは再度ELISAを行って、反応性が強いものを感染耐過魚と反応する細菌と判断した。また、病魚から多く分離される細菌についてはAPI 20NE〔BIOMÉRIEUX〕で細菌の簡易同定を行った。

【結果】 病魚から分離した菌と感染耐過魚血清との反応性について調べた結果を表1に示した。各部位より分離された菌のうち、黄色を示すコロニーだけが感染耐過魚血清と反応した。また、脳、卵巣分離菌では100%が、その他では0~36.4%が反応した。各部位から分離される白~クリーム色のコロニーを示す菌は全く反応しなかった。しかし、白~クリーム色のコロニーは多くの供試魚より分離されたため、簡易同定を行ったところ、表2に示すように*A. sobria*と判定され、死亡魚の一部はエロモナス病を併発していることが明らかとなった(他の試験でもおおむね本菌と*A. hydrophila*, *A. caviae*が検出された)。また死亡魚の腎臓からヒツジ血液寒天培地で菌分離を行うと溶血斑を示すコロニーが多数検出され、上記と同様に*Aeromonas*属細菌と同定された。同時に黄色コロニーを示す冷水病菌も検出された。

以上の結果から、冷水病に感染耐過したアユは冷水病菌だけに特異抗体を産生しており、死亡魚より分離されるその他の菌に対しては産生していないことが明らかとなった。しかし、死亡魚からはエロモナス病菌も検出されるため、感染耐過魚は健康でエロモナス病に罹患しないのか、死亡アユが感染後期にエロモナス病に罹患するのは今後検討する必要がある

※1) 二宮浩司・里井晋一：天然アユへの死魚調査，平成7年度滋賀水試事報，112-113(1995)。

※2) 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)。

※3) 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)。

表1. 冷水病死亡アユより改変サイトファーガ培地で分離される菌体コロニーと冷水病水平感染耐過アユ血清との反応性

分離場所	釣菌数	分離結果			感染耐過アユ血清との反応性			
		コロニー色			黄色コロニー		白・肌色・その他コロニー	
		黄色	白～肌色	その他	陽性数	陽性率(%)	陽性数	陽性率(%)
腎臓	44	11	33	0	4	36.4	0	0
脾臓	71	15	54	2	1	6.7	0	0
脳	38	6	32	0	6	100.0	0	0
腹腔内	54	13	41	0	4	30.8	0	0
血液	36	0	36	0	0	0	0	0
エラ	135	60	75	0	17	28.3	0	0
卵巢	17	14	3	0	14	100.0	0	0
精巢	36	1	35	0	0	0.0	0	0
体側患部	31	13	18	0	3	23.1	0	0
養魚排水	96	48	36	12	5	10.4	0	0

表2. 冷水病死亡アユより改変サイトファーガ培地で多く分離される同一形態を示すコロニーのAPI-20NEによる種の同定

分離場所	コロニー色	API-Index No.	種名	信頼性
腎臓	白～クリーム色	5176755	<i>Aeromonas sobria</i>	Good Identification
脳	白～クリーム色	5176755	<i>Aeromonas sobria</i>	Good Identification
脾臓	白～クリーム色	5176755	<i>Aeromonas sobria</i>	Good Identification
腹腔内	白～クリーム色	5176755	<i>Aeromonas sobria</i>	Good Identification

※同一個体より分離

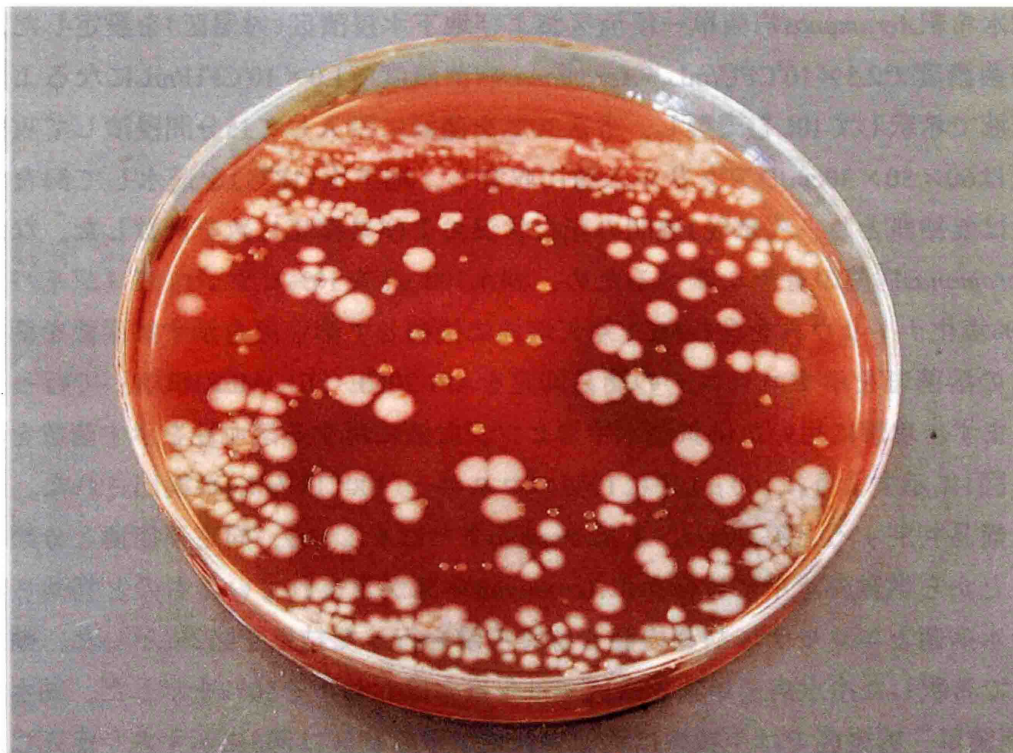


図1. ヒツジ血液を含む改変サイトファーガ培地上に出現する溶血斑を伴う*Aeromonas sobria*および黄色コロニーの冷水病菌*Flavobacterium psychrophilum*.