

27) 培養菌攻撃で耐過したアユの冷水病発生飼育水 導入法攻撃における抗病性の向上効果

金辻宏明・二宮浩司・山本充孝・遠藤 誠

【目的】 *Flavobacterium psychrophilum*を原因菌とするアユ冷水病は近年、非常に問題となっており、早急に対策を講じる必要がある。しかしながらワクチンを開発するにあたって冷水病のアユに対する病原性や免疫応答などの知見については現在のところ乏しいといえる。これまでに我々は培養菌体の感染能が通常の水平感染(冷水病発生飼育水導入法)より軽微でさらに感染終息後の生残率が高いことを見いだした。また通常感染耐過魚は再度攻撃しても再感染死亡率が低いことを明らかにした。そこで本研究では培養菌攻撃で耐過したアユの再感染性について通常耐過魚と比較検討した。

【方法】 供試魚には11月に琵琶湖で採捕され、冷水病経験のない平均体重3.6gの湖産アユを用いた。用いた供試菌株(SG990302株)および培養方法は前報¹⁾と同様とした。培養菌体による攻撃は培養液を 1×10^8 、 1×10^7 および 1×10^6 CFU/mlの菌濃度に地下水で希釈してそれぞれ10ℓ調製し、通気しながらアユ100尾を投入して15min浸漬して行った。対照区は供試魚の冷水病発生飼育水導入による攻撃²⁾(通常攻撃)区を設けた。攻撃後は60×30×30cm水槽2本に25尾ずつ収容し、地下水を通水して飼育した。各区の生残状況は投入から21day後まで行った。また、攻撃21day後の生残魚から尾断法で採血して常法にしたがって血清を分離し、55°Cで30min非働化してマイクロタイター法で血中凝集抗体価を測定した。また、同時に供試魚のヘマトクリット値(Ht値)を測定した。次に各方法で耐過させたアユの再感染性を通常攻撃を行って調べた。試験区には 1×10^8 、 1×10^7 および 1×10^6 CFU/mlの3濃度の培養菌浸漬耐過魚区、通常攻撃耐過魚区(病魚の直接投入)、ホルマリン不活化菌体(FKC)注射ワクチン接種魚²⁾区(それぞれ攻撃または接種21日後)および無処理魚区の6区を設け、各区の供試魚数は25尾とした。6区の供試魚の再攻撃は冷水病発生飼育水導入(通常)攻撃²⁾で行った。

【結果】 3種類の濃度の培養液で攻撃した結果を図1に示した。すなわち、各区の死亡は約6day後に開始し、終息は培養区では約15day後で、通常攻撃区では約20day後であった。また最終生残率は培養菌攻撃では菌の濃度が高いほどその生残率は低く、高濃度浸漬区から順に、32、40および43%であった。また、通常攻撃区では2%と非常に低かった。攻撃を耐過生残した供試魚の血中凝集抗体価およびHt値を表1に示した。抗体価は培養菌浸漬攻撃区では浸漬菌濃度が濃いほど抗体価は高く1:16~2未満で、Ht値は逆に38.9~31.2%と菌濃度が濃いほど高かった。なお、無処理生残魚の抗体価およびHt値は1:1.9および38.5%であった。次に、培養菌攻撃生残魚の再感染性について通常攻撃で調べた結果を図2に示した。すなわち、各区の生残率は通常攻撃耐過魚区で84%と最も高く、次いで 1×10^8 、 1×10^7 および 1×10^6 CFU/ml培養菌浸漬攻撃耐過区の順に80.1、74.2および38.8%の生残率で、浸漬菌濃度が高い順に生残率は高くなる傾向を示した。培養菌で攻撃する前から通常攻撃法で再攻撃した後の生残率を計算すると、 1×10^8 、 1×10^7 および 1×10^6 CFU/ml培養菌浸漬攻撃耐過魚区の順に26.2、30.6および19.0%で、 1×10^7 CFU/ml培養菌浸漬攻撃耐過区の30.6%とFKC注射区の34.6%に近い値であった。したがって、培養菌による浸漬では 1×10^7 CFU/ml以上で攻撃すると再感染に対する抗病性が向上すると考えられた。また、 1×10^6 CFU/ml浸漬攻撃耐過魚区では抗体価が上昇しないことからこの菌濃度では十分な免疫応答が成立せず、逆にHt値が低下していることから溶血素様毒素の毒性のみが発揮している可能性も示唆された。以上の結果から、培養菌攻撃耐過魚の免疫適格性はある程度の高濃度の培養菌の下で成立させることが可能であると推察された。

文献 1) 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，in press (2003)。

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，in press (2003)。

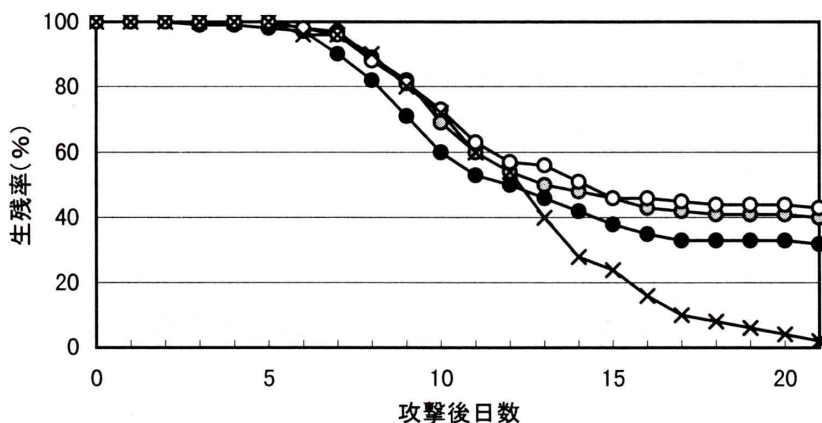


図1. 培養菌で攻撃したときのアユの生存率におよぼす濃度の影響.

-●-: 1×10^8 CFU/ml, -○-: 1×10^7 CFU/ml, -□-: 1×10^6 CFU/ml,
 -×-: 無処理魚の冷水病発生飼育水導入法による攻撃結果.

表1 培養菌攻撃で生残したアユの血中凝集抗体価およびヘマトクリット値

	浸漬菌濃度 (CFU/ml)			無処理魚 ^{*2}
	1×10^8	1×10^7	1×10^6	
凝集抗体価(1:) ^{*1}	16.0	9.2	<2	1.9
ヘマトクリット値(%)	38.9	38.2	31.2	38.5

※1: 凝集抗体価は5個体の幾何平均値, ※2: 無処理魚は冷水病発生飼育水導入攻撃後の生残魚.

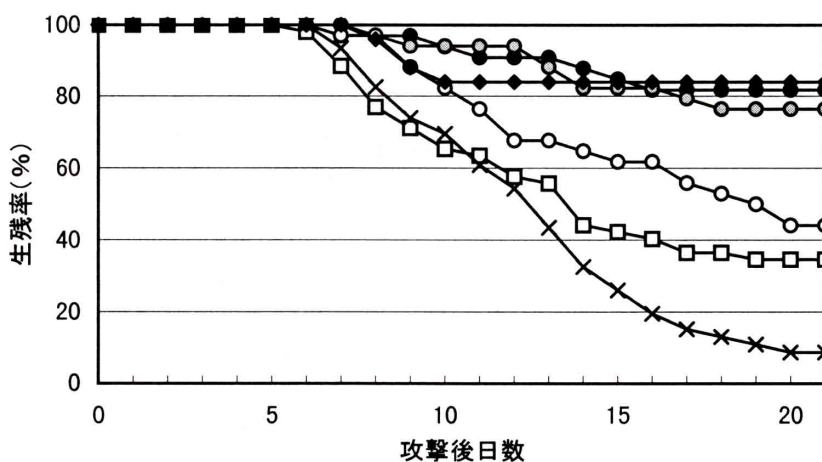


図2. 培養菌攻撃で生残したアユの冷水病発生飼育水導入攻撃による生存率の推移.

-●-: 1×10^8 CFU/ml耐過区, -○-: 1×10^7 CFU/ml耐過区, -□-: 1×10^6 CFU/ml耐過区,
 -□-: FKJ注射ワクチン接種区, -×-: 無処理区, -◆-: 冷水病発生飼育水耐過区.