冷水病感染耐過アユの抗病性

金辻宏明*・山本充孝・二宮浩司

(2006年 9月22日受付)

The Resistance of Ayu *Plecoglossus altivelis* Recovered from Bacterial Coldwater Disease against Reinfection with *Flavobacterium* *psychrophilum*

Hiroaki Kintsuji*, Michitaka Yamamoto and
Koji Ninomiya

Shiga Prefectural Experimental Station, Hikone,
Shiga 522-0057, Japan

(Received September 22, 2006)

ABSTRACT—Ayu *Plecoglossus altivelis* that survived from bacterial coldwater disease (BCWD) were reinfected with *Flavobacterium psychrophilum*. Artificial reinfection challenge showed that the survival rate of ayu recovered from BCWD was significantly higher (84%) than that of naive ayu (2%) or ayu immunized with FKC vaccine (18%).

Key words: bacterial coldwater disease, *Flavobacterium psychrophilum*, disease resistance, *Plecoglossus altivelis*, ayu

アユ *Plecoglossus altivelis* の細菌性冷水病ワクチンでは、オイルアジュバントを添加した *Flavobacterium psychrophilum* ホルマリン不活化菌体（以下 FKC と略す）注射ワクチン¹⁾、水溶性アジュバント添加 FKC 注射ワクチン^{2,3)} やリポ多糖（LPS）が多く含まれる外膜成分注射ワクチン⁴⁾ でその有効性が報告されているが、作業効率の悪さやアジュバントの残留などのため¹⁾ 実用化には解決すべき課題が多く、また、経口ワクチンについても、効果が認められたとする報告⁵⁾ もあるものの、現在までに、本病に対するワクチンは実用化されていない。一方、冷水病の自然感染を耐過したアユは、冷水病に対する抗病性の高いことが経験的に知られているが、その実態は明らかではない。冷水病を感染耐過させたアユの

本病に対する抗病性の機序を明らかにすることができれば、ワクチンの開発に有用な知見が得られるものと考えられる。そこで、本研究ではアユ冷水病感染耐過魚の冷水病菌再感染に対する抗病性を調べた。

材料および方法

供試魚には2002年11月に琵琶湖で採捕され、滋賀県水産試験場の屋内池で飼育した平均体重 1.9~3.0 g の湖産アユを用いた。供試魚は、水温約17.5°Cの地下水を注入した 7.5 t の 8 角形コンクリート製水槽で飼育し、1 日あたり魚体重の 2 % 量のアユ用市販飼料（日本配合飼料）を給餌した。なお、供試魚には冷水病の履病歴がないものを用いた。

感染耐過魚は以下のように作出した。供試魚（平均体重 1.9 g）250尾を飼育しているアクリル水槽（90×45×45 cm）に、-85°Cに凍結保存していた本病発病魚を投入して7日間放置し、供試魚に冷水病を発生させた。凍結病魚を投入し始めてから新たな死亡が認められなくなった時点で、生残していたアユを感染耐過魚とした。なお、凍結保存していた本病発病魚には滋賀県内の養殖業者で飼育され、冷水病が自然発病した瀕死アユ（平均体重 0.66 g）を用いた。

感染耐過魚に対する攻撃試験は次のようにして行った。まず、アクリル水槽（90×45×45 cm）に健康な供試アユ100 尾を収容し、前述の凍結病魚（5 尾）を投入して冷水病を発生させた。冷水病の発生を確認後（凍結病魚を投入して7日後）に、感染耐過魚25尾を収容したアクリル水槽（60×30×30 cm）に、上記の冷水病の発生した水槽の排水を 50 mL/分になるように7日間導入した。攻撃試験は2水槽で行った。攻撃開始から21日間死亡状況を観察し、死亡魚の鰓および腎臓から改変サイトファーガ寒天培地を用いた菌分離によって冷水病による死亡の確認を行った。抗病性の比較のため、無処理対照魚および FKC 注射ワクチン接種魚を試験に加えた。ワクチン接種魚は次のようにして作出した。供試菌には *F. psychrophilum* SG990302 株を用い、供試菌を 50 mL の改変サイトファーガ液体培地に接種し、15°C、100 rpm で振盪しながら24時間培養した培養液（ 2.1×10^9 CFU/mL）に、0.3%量ホルマリンを加えて4°Cで24時間攪拌（100 rpm）したものを FKC として用いた。不活化前菌濃度を 3.33×10^9 CFU/mL に濃縮した FKC と、植物性オイルアジュバント ISA763A VG（Seppic, France）を 3 : 7 の容量比で混合して乳化させた FKC 注射ワクチン液を、1 個体あたり 50 μ L（ 5×10^7 CFU/fish）になるように供試魚120尾（平均体重 1.9 g）の腹腔内に注射した。ワクチン接種魚を 0.5 t 水槽に収容して水温約 17.5°Cの地下水を注入し、アユ用市販飼料を給餌率 2 % 魚体重/日となるように与えて飼育した。ワクチン接種

滋賀県水産試験場

* Corresponding author

E-mail: kintsuji-hiroaki@pref.shiga.lg.jp

後21日目に攻撃試験に供した。生残率の統計学的な検定はFisherの直接確率計算法によって行った。

感染耐過魚が免疫を獲得しているかを調べるため、以下の方法で血清中の抗体価を測定した。感染耐過魚の尾柄部を切断し血液を採取し、5尾分をプールして血清を分離後、55°Cで30分間非働化した。非働化血清の抗体価は、常法に従いFKCを抗原としたマイクロタイター法および冷水病菌のLPS等を含む生菌抽出画分を感作させたヒジ赤血球を用いた受身赤血球凝集反応法により測定した。比較のため、ワクチン接種魚および無処理魚も同様の方法で抗体価を測定した。なお、生菌抽出画分は次のようにして作製した。改変サイトファーガ液体培地で培養した供試菌液10 Lを30分間冷却遠心(4°C, 10,800×g)によって集菌(湿菌重量3.2 g)し、20 mLのPBSに再浮遊させて60°Cで24時間静置した。その後、15分間冷却遠心(4°C, 27,700×g)し、上清を生菌抽出画分とした。

結果および考察

感染耐過魚を作出するための試験では、試験開始後21日目で250尾中55尾が生存した。その感染耐過魚および無処理対照魚、ワクチン接種魚の攻撃試験における生残率の推移をFig. 1に示した。感染耐過魚は攻撃8日後から死亡が認められたが10日後には終息して生残率は84%となった。一方、無処理対照魚では、死亡の始まったのはほぼ同時期であったが、最終生残率は2%と非常に低かった(Fig. 1)。比較のため加えたワクチン接種魚の死亡は5日後から始まり観察終了の21日後まで続き、生残率は18%となった(Fig. 1)。感染耐過魚およびワクチン接種魚の生残率は無処理対照魚と比べて危険率それぞれ0.1%未満および1%未満で有意に高く、また、感染耐過魚の生残率は、ワクチン接種魚と比較して危険率0.1%未満で有意に高かった。このことから、経験的に知られている通り感染耐過魚は冷水病菌の再感染に対して強い抗病性を示すことが確認され、その抗病性はワクチン接種魚よりかなり高いものと考えられる。これまでにアユ

Fig. 1. Survival rates of ayu after an experimental infection. ●, ayu survived from bacterial coldwater disease; ■, ayu vaccinated with folmalin-killed *Flavobacterium psychrophilum* with oil adjuvant; ×, naive ayu. The experimental infection was performed by supplying the water (50 mL/min) for 7 days from the tank where bacterial coldwater disease had been occurring.

は系統間で冷水病に対する抵抗性に差があることが報告されている⁶⁾。今回の感染耐過魚では、本質的に冷水病に対して強い抵抗性を有する個体、すなわち、冷水病に対する高い自然免疫を有している個体が生存した可能性は否定できない。しかし、一方、冷水病菌の感染が進行する過程で、免疫を獲得したことにより生残した可能性も考えられる。今後は、まずクローン魚などを用いることにより、感染耐過魚の冷水病に対する高い抗病性の要因を明らかにする必要がある。

感染耐過魚、ワクチン接種魚および無処理対照魚のFKCに対する血清抗体価はそれぞれ1:4, 1:16および1:<2であった。また、生菌抽出画分に対する受身赤血球凝集抗体価はそれぞれ1:8, 1:2048および1:<2であった(Table 1)。感染耐過魚において抗体価の上昇が認められたことから、感染耐過魚は冷水病菌に対する何らかの免疫を獲得しているものと思われた。しかし、生菌抽出画分を感作した赤血球に対する凝集活性では、

Table 1. Agglutinating antibody titers and passive hemagglutinating antibody titers of antisera of ayu

Serum ^{*1}	Antigen		
	FKC	Sensitized SRBC	Fixed SRBC
	Titer (1:)	Titer (1:)	Titer (1:)
Bacterial coldwater disease-survived ayu	4	8	<2
FKC-vaccinated ayu ^{*2}	16	2048	<2
Naive ayu	<2	<2	<2

^{*1}, Serum was pooled from 5 fish.

^{*2}, Serum was obtained at 3 weeks after vaccination.

FKC, Folimalin-killed cells; Sensitized SRBC, Fixed sheep red blood cells sensitized with heat extract of *F. psychrophilum*

感染耐過魚血清とワクチン接種魚血清では大きな差があり、感染耐過魚が認識している冷水病菌抗原とワクチン接種魚が認識している抗原とは異なっている可能性がある。もし、感染耐過魚が免疫を獲得することにより生存したと仮定すると、この獲得免疫の質の差が、感染耐過魚とワクチン接種魚の冷水病に対する抗病性の差に表れたと考えられる。この質的な差を明らかにすることがより効果の高いアユ冷水病ワクチンの開発に繋がると期待できる。

本稿を校閲頂いた滋賀県水産試験場の藤岡康弘博士に深謝する。また、アジュバントを提供していただいた Seppic 社にお礼申し上げる。なお、本研究の一部は、養

殖衛生管理対策技術開発研究費（農林水産省委託）によって実施されたことを付記し、関係者各位に感謝する。

文 献

- 1) Rahman, M. H., M. Ototake, Y. Iida, Y. Yokomizo and T. Nakanishi (2000): *Fish Pathol.*, **35**, 199–203.
- 2) 永井崇裕, 飯田悦左, 米司 隆 (2003): 魚病研究, **38**, 63–65.
- 3) Rahman, M. H., M. Ototake, T. Nakanishi (2003): *Fish Pathol.*, **38**, 171–176.
- 4) Rahman, M. H., A. Kuroda, J. M. Dijkstra, I. Kiryu, T. Nakanishi and M. Ototake. (2001): *Fish Shellfish Immunol.*, **12**, 169–179.
- 5) Kondo, M., K. Kawai, M. Okabe, N. Nakano, S. Oshima (2003): *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 261–264.
- 6) Nagai, T., T. Tamura, Y. Iida and T. Yoneji (2004): *Fish Pathol.*, **39**, 159–164.