

アユ冷水病人為感染方法確立試験（過去3年間の事業の要約）

湯浅明彦・谷本 剛

本試験は平成12年から平成14年の3年間、水産庁の補助事業である先端技術等地域実用化研究促進事業「アユ冷水病非保菌種苗の生産技術確立及び放流効果評価」として実施された。独立行政法人 水産総合研究センター中央水産研究所の協力指導のもと、関係5県6試験研究機関が共同して実施してきた。事業最終年に当たり3年間の試験研究の結果が「アユ冷水病非保菌種苗の生産技術確立及び放流効果評価に関する総括報告書」として取りまとめられた。ここでは、本県で実施した3年間の事業の要約を述べる。

1 研究目的

アユ冷水病非保菌種苗の生産技術を確立する有効な方法の一つとして、冷水病ワクチンの開発が進められている。しかし、アユの冷水病は有効な実験感染系が確立されていないために、ワクチンの有効性評価が不安定であることがワクチン開発の隘路となっている。

そのため、本研究では確実かつ安定的な感染によりワクチンの有効性を評価できる実験感染系の確立を目的とする。

2 研究方法

平成12年度は、皮下注射による感染法の基礎的な知見を得るために、冷水病菌の異なる培養条件における病原性の違いを明らかにするために次の項目の試験を行った。冷水病菌液に長時間浸漬することにより感染が成立（東京水産大学）したことから再現試験を行った。また、県下の河川で発病した冷水病の動態を調査した。

- 1) 感染歴の無いアユに3種類の冷水病菌株（A冷水病対策研究会の攻撃試験で用いられた菌株（PH9804）, B本県で分離された菌株（PT98099）, C本県で分離された新鮮な菌株（PT01006））を用いて皮下注射法による感染試験を行い、菌株による病原性を比較した。
- 2) 改変サイトファーガ寒天培地で同一菌株の培養時間（24時間, 50時間, 73時間）による病原性の比較を行った。
- 3) 同一の菌株で継代数の違いによる病原性の比較を行った。
- 4) 冷水病菌液に長時間浸漬による感染法の可能性を検討

した。

- 5) 冷水病の感染による死亡が確認された河川で、病魚及び成熟魚のサンプル調査により冷水病の動態を追跡した。

平成13年度は、対数増殖期後期（ $10^5 \sim 10^7$ CFU/ml）の冷水病菌液にアユを浸漬すると60～80%の死亡率を示したという高知大学の近藤らの報告（平成12年度日本魚病学会春季大会口頭発表）をもとに、以下の方法で浸漬攻撃法の有効性について検討した。

- 1) 成分を変えた改変サイトファーガ培地及びアユ筋肉浸出液培地での冷水病菌の増殖試験
- 2) 対数増殖期の菌液と菌体の病原性試験
- 3) 菌体処理による病原性の比較試験
- 4) 浸漬攻撃法によるワクチンの有効性試験

平成14年度は、滋賀県が開発し冷水病ワクチンの有効性試験における冷水病感染法の標準法として行われている同居感染法（病魚飼育水槽の排水を試験水槽に添加することにより感染が成立する）の再現試験を実施した。また、過去2年間の結果から改変サイトファーガ培地では野生株の病原性を維持できないことから病原性の再現が可能な培地の探索を行った。

- 1) 病魚飼育排水添加法（同居感染法）による感染試験を実施し、同時に飼育水中の細菌数を検査した。
- 2) AOA培地, KDM-2培地, 配合飼料培地（岐阜県淡水魚研究所で病原性の復帰が確認されている）による冷水病菌の増殖を確認し、浸漬法により病原性を検討した。

3 研究成果

- 1) 平成12年度

菌株により病原性が異なることが考えられ、病原性の差は継代による影響以外に菌株が本来持っている病原性に起因すること、継代数が増加することにより病原性が低下することが示唆された。 10^4 CFU/尾以上の接種量では培養時間にかかわらず累積死亡率はほぼ60%を示したが（PT01006株）、 10^4 CFU/尾接種量での累積死亡率は培養時間が24, 73, 50時間の順に低下した。長時間浸漬攻撃試験を2回実施したが、いずれも最終的な累積死亡率は30%程度にとどまった。死亡魚は殆ど患部又は腎臓から冷水病菌が分離された。死亡は大部分が浸漬攻撃期間中で発生し、その後の流水飼育中はほとんどなかった。

県下のK河川で発病した冷水病の特長は、解禁後の感染による死亡が放流人工種苗が中心であったことである。その後、秋の成熟に伴い親魚の保菌率が高くなるとともに鰓から腎臓に、さらに生殖腺へ保菌箇所が移ることが明らかになった。

2) 平成13年度

徳島県で98年に分離したPT98099株を液体改変サイトファーガ培地（以下mC培地）に接種して15で通気培養した。植継ぎ濃度が 10^6 CFU/mlの場合約40時間後に、 10^5 CFU/mlの場合約60時間までに定常期に達した。液体mC培地成分である肉エキスカツオエキスに変えて冷水病菌の増殖を比較したが差はなかった。FME培地は36時間後に菌が死滅した。

通常の液体mC培地と、肉エキスをカツオエキスに変えた液体mC培地で培養した菌液で浸漬攻撃試験を実施したところ、死亡率は12%と24%にとどまり両培地による病原性に有意差はなかった。培地成分を遠心分離により除去し、更に滅菌淡水で洗浄した菌体の病原性にも有意な差は認められなかった。

培地成分を遠心分離して除去した後に菌体を滅菌淡水で2回洗浄したものと、2回洗浄後7時間滅菌淡水中に懸濁させた菌液を用いて浸漬攻撃を行った。2週間後の死亡率は8%と4%であった。

更に3回洗浄した菌体を、滅菌淡水に 10^8 CFU/ml濃度に懸濁した菌液で浸漬攻撃を行い、ワクチンの有効性試験に応用したところ最も高い死亡率で32%にとどまり安定した結果を得ることができなかった。

3) 平成14年度

飼育排水添加法によれば、凍結病魚を飼育水中に垂下して5日後に冷水病の感染が成立し、この感染水槽の排水を試験水槽に注水（添加）して5～7日後に感染が成立し死亡が始まる。このことから、病魚の飼育水中へ浸漬は長くて5日間（低水温期の真菌症を防止するために同一病魚の浸漬時間は2日が限度）感染槽から試験水槽への排水の添加は病魚の浸漬が終了後7日間以内で行うことにより感染が成立する。トブラマイシンを添加したAOAE培地で分離計数した感染水槽の細菌数（冷水病菌を含む）は感染が成立した前後で $10^2 \sim 10^4$ CFU/mlを示した。AOAE培地とKDM-2培地（FBSを10%添加）は増菌培地として優れていた、また0.3%配合飼料培地は 10^9 CFU/mlまで増殖した。しかし、いずれの培地でも浸漬法（15～30分間）では病原性が低かった。

4 研究成果の利用

研究結果から導かれるのは課題ばかりであり利用可能な技術的成果は乏しい。冷水病人為感染法の標準法として飼育排水添加法（同居感染法）が行われるようになったが、再現試験において高い死亡率を示した。幾つかの培地を用いて培養した菌体を洗浄処理することなど、様々な浸漬法を試みたが飼育排水添加法ほどの死亡率は得られなかった。飼育排水添加法以上の効果のある方法を開発することはできなかった。それは、冷水病原因菌の既知の分離培地である改変サイトファーガ培地、AOAE培地、KDM培地では野生株の病原性を維持できないためと考えられる。病原性の維持は重要であり、防御抗原を保存するということから冷水病対策の基本的な課題と言える。今後、病原性を維持する方法が明らかになれば、人為感染法の改良のみならずワクチンの抗原性が向上し有効なワクチンの開発につながることを期待できる。