

アユ冷水病人為感染方法確立試験

湯浅明彦・谷本 剛

ワクチンはアユの冷水病非保菌種苗の生産技術を確立する有効な方法である。冷水病ワクチンの開発を進める上で、アユ冷水病の有効な実験感染系が確立されていないことがその隘路になっている。ワクチンの有効性を評価できる確実かつ安定的な実験感染系の確立が急がれている。

高知大学の近藤らは、対数増殖期後期の $10^5 \sim 10^7$ CFU/mlの冷水病菌液に、15℃で30分間体重1.0～6.0gのアユを浸漬することにより感染が成立し、60～80%の死亡率を示したことを報告している。¹⁾また、 10^6 CFU/mlの菌液に長期間(9日間)浸漬することで感染が成立し、死亡率は約30%を示した。²⁾そこで、浸漬攻撃法を工夫することにより安定的に感染が成立し、適切な死亡率を得ることを目標とした。浸漬法により冷水病の感染が成立しない原因として、改変サイトファーガ培地(以下、mC培地と称する)で培養することにより菌の性状が変化し感染力が低下したことが考えられる。また変化の原因として、培地の成分と増殖環境の影響が考えられる。そこで、mC培地の一部成分を変更したものとアユの魚肉から作成したFME培地³⁾による冷水病菌の増殖特性を明らかにするとともに、対数増殖期後期の培養菌液又は菌体を用いて浸漬攻撃試験を行った。冷水病菌の増殖環境を自然感染に近づけるために菌体を培地成分(菌体外成分を含む)と分離するとともに滅菌水中に懸濁することによる病原性の変化について検討した。また、供試魚に冷水病ワクチン処理したものをを用いることにより有浸漬攻撃による効性試験の可能性について検討した。

本試験は、水産庁の補助を受けて平成13年度先端技術等地域実用化研究促進事業の研究課題「アユ冷水病非保菌種苗の生産技術確立及び放流種苗効果評価」として実施した。

材料と方法

1) 異なる培地での冷水病菌の増殖試験

徳島県で養殖アユ病魚の腎臓から分離した冷水病菌株PT98099を供試菌株とした。mC培地の成分は表1のとおりであり、肉エキスとカツオエキスを成分とする2種類の液体培地を作成した。FME培地は、M/15リン酸バッファー(pH7.4)に10%のアユ魚肉を加えて磨砕し、100℃で30分煮沸したのを遠心濾過して上清を121℃で15分滅菌して作成

した。培養条件は、接種菌量が 10^5 又は 10^6 CFU/mlとし、培養温度15℃の通気培養とした。

表1 改変サイトファーガ培地の組成

| 培地成分 | 濃度(%) |
|--------------------|-------|
| ペプトン ¹⁾ | 0.2 |
| 酵母エキス | 0.05 |
| 酢酸ナトリウム | 0.02 |
| 塩化カルシウム | 0.02 |
| 肉エキス又はカツオエキス | 0.02 |
| 寒天 | 1.5 |
| 馬血清 ²⁾ | 5 |

1) Difco社製Bacto-Tryptone

2) 液体培地には添加しない

2) 対数増殖期の菌液と菌体の病原性試験

増殖特性を確認した液体培地(肉エキスとカツオエキス2種類のmC培地)にPT98099株を 10^5 CFU/ml接種し、約40時間通気培養した対数増殖期後期の菌液0.5%に淡水を添加して5%の菌液を作成した。同様に培養した菌液0.5%を遠心分離(5000rpm、20分)して菌体と培養液を分離し、菌体を滅菌淡水中に懸濁(スターラーで攪拌)した後に更に遠心分離することにより菌体の洗浄を行い、その後飼育水5%に再懸濁した。この4種類の菌液を用いて、平均体重12gのアユ25尾を30分間通気しながら浸漬した。攻撃後18日間経過を観察した。

3) 菌体処理による病原性の比較試験

PT98099株を 10^6 CFU/ml接種した液体mC培地を37時間通気培養し、遠心分離(5000rpm、20分)と、滅菌淡水中に懸濁させることによる菌体洗浄を2回行った。また、菌体洗浄を2回行った後に15℃の滅菌淡水中に7時間静置した。2回洗浄した菌体と滅菌淡水中に静置した菌体を5%の飼育水に懸濁した。未処理区は同じ条件で培養した菌液0.5%を飼育水で5%に10倍希釈したものである。平均体重17gの未成熟の雌魚25尾を、この3種類の菌液に30分間浸漬することにより浸漬攻撃を行った。各菌液の菌数は、菌体洗浄区が 1.1×10^8 CFU/ml、菌体洗浄後静置区が 9.6×10^7 CFU/ml、未処理区が 7.2×10^7 CFU/mlであった。対照区は供試魚を5%の飼育水中に通気状態で30分間収容した。

脚注 1)平成12年魚病学会春季大会で口頭発表 2)平成12年度事業報告書「アユ冷水病人為感染試験」 3)Fish Meat Extract培地、真菌性肉芽腫症の分離培地

4) 浸漬攻撃法によるワクチンの有効性試験

PT98099株を 10^6 CFU/ml接種した液体mC培地を40時間通気培養し、遠心分離（5000rpm、20分）と滅菌淡水に再懸濁させることで菌体を3回洗浄した。この菌体を8%の飼育水に懸濁し、10月29日に菌数 1.6×10^8 CFU/mlに、31日には 2.7×10^8 CFU/mlに調整した菌液に平均体重19.7gの未成熟の雌魚25尾にワクチン処理を施したものを60分間浸漬することにより攻撃試験を行った。

ワクチン処理は浸漬法と注射法で10月5日に行った。浸漬法は低濃度（ 1.0×10^7 CFU/ml）と高濃度（ 1.0×10^8 CFU/ml）のPT98099株ホルマリン不活化菌液にそれぞれ通気状態で24時間と30分間浸漬した。注射法はオイルアジュバンドISA763A（Seppic社製）と 1.0×10^9 CFU/ml冷水病菌液を0.3%ホルマリンで不活化したものを7:3の容量比で混合しエマルジョンにしたアジュバンド添加ワクチンを50 μ l腹腔内に注射した。対照区にはワクチン処理をしていない供試魚を用いた。各試験区に2水槽を設けた。

2)、3)及び4)の浸漬攻撃試験の概要を表2に示した。

結果

1) 異なる培地における冷水病菌の増殖特性

冷水病菌株PT98099を培養温度15℃で通気培養したところ、接種菌数が 10^6 CFU/mlの場合は40時間後に、 10^5 CFU/mlの場合は約60時間後に定常期に達した（図1）。植継菌数を 10^5 CFU/mlにして15℃で通気培養した場合、肉エキスとカツオエキスの2種類のmC培地はほぼ同様の増殖傾向を示したが、FME培地では、36時間後に冷水病菌が死滅した（図2）。

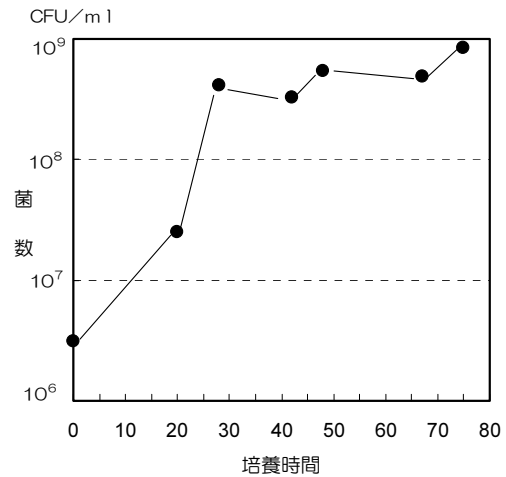


図1 Cm液体培地での冷水病菌の増殖曲線（培養温度15℃ 通気培養）

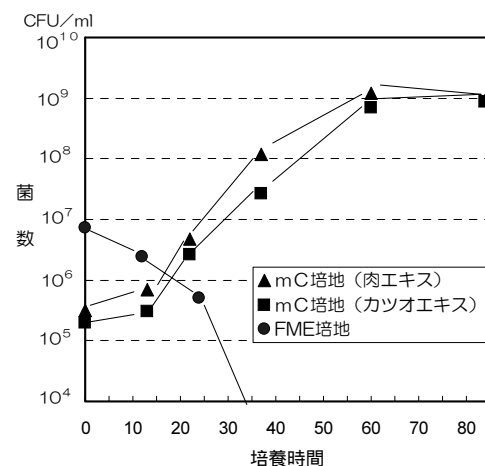


図2 異なる培地での冷水病菌の増殖曲線（培養温度15℃ 通気培養）

表2 浸漬攻撃試験の実施方法

| | 培地成分による比較試験 | | 菌体処理による比較試験 | | 菌体洗浄の効果試験 | |
|---------|--|--------------------------|--|--------------------------|--|-----------------------------------|
| 攻撃菌 | PT98099株 10^6 CFU/ml接種したmC液体培地を15℃で約40時間通気培養 | | PT98099株 10^6 CFU/ml接種したmC液体培地を15℃で約37時間通気培養 | | PT98099株 10^6 CFU/ml接種したmC液体培地を15℃で約40時間通気培養 | |
| 菌体の処理 | 滅菌淡水で1回洗浄 | | 滅菌淡水で2回洗浄及び15℃の滅菌淡水中で7時間静置 | | 滅菌淡水で3回洗浄 | |
| 攻撃菌濃度 | 肉エキス (菌体洗浄区) | 6.5×10^7 CFU/ml | 未処理区 | 7.2×10^7 CFU/ml | 第1回 | 1.3 及び 2.3×10^8 CFU/ml |
| | カツオエキス (菌体洗浄区) | 5.3×10^7 CFU/ml | 菌体洗浄区 | 1.1×10^8 CFU/ml | 第2回 | 2.7×10^8 CFU/ml |
| | | 4.0×10^7 CFU/ml | 洗浄・静置区 | 9.6×10^7 CFU/ml | | |
| | | 3.5×10^7 CFU/ml | | | | |
| 浸漬方法 | 5%の菌液に30分浸漬 | | 5%の菌液に30分浸漬 | | 8%の菌液に60分間浸漬処理 | |
| 攻撃実施日 | 01/9/10 | | 01/10/16 | | 01/10/29(第一回) 01/10/31(第二回) | |
| 観察期間 | 01/9/10~9/28 | | 01/10/16~10/30 | | 01/10/29~11/17 | |
| 飼育水温 | 16.4~19.2 | | 16.2~17.2 | | 18.1~15.0 | |
| 供試魚平均体重 | 12g | | 雌魚17g | | 雌魚19.7g | |

2) 対数増殖期の菌液と菌体の病原性試験

4種類の菌液による浸漬攻撃の結果、冷水病菌が分離された死亡魚から算出した死亡率は12~24%であった(表3)。死亡は攻撃後6日目から始まり9日目に終息した。肉エキスとカツオエキス、培養液と洗浄菌体の組み合わせによる死亡率の差をFisherの直接確率法で検討したが有意な差は認められなかった(表4)。

3) 菌体処理による病原性の比較

攻撃後14日目までの各試験区の死亡率は0~8%であった(表5)。未処理区と対照区では死亡がなかった。

4) 浸漬攻撃法によるワクチンの有効性試験

1回目の浸漬攻撃は10月29日に、低濃度浸漬区と注射ワクチン区の各2水槽で行った。攻撃後18日目までの死亡率は低濃度浸漬区が32%と24%、注射ワクチン区は2水槽とも8%であった。この2区についてFisherの直接確率法で確率を計算すると0.0174となり5%の水準で有意な差が認められた(表6)。

10月31日に高濃度浸漬区と対照区で2回目の浸漬攻撃を行ったが、高濃度浸漬区では死亡が見られず対照区の死亡率は4.0%と4.3%であった。

表3 対数増殖期の培養液と菌体による浸漬攻撃後の死亡状況

| 試験区 | 培地成分 ¹ | 供試尾数 | 経過日数 | | | | | | | | | | | | | | | | 計 | 死亡率% | | |
|---------------|-------------------|------|------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|-------------------|------|----|------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | | | 17 | 18 |
| 菌液に浸漬 | 肉エキス | 25 | | | | | | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | 3 | 12.0 |
| | カツオエキス | 25 | | | | | | | 2 | 1 | 3 | | | | | | | | | | 6 | 24.0 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | (10) ² | (10) | | |
| 洗浄した菌体の懸濁液に浸漬 | 肉エキス | 25 | | | | 1 | | 4 | 1 | | | | | | | | | | | | 6 | 24.0 |
| | カツオエキス | 25 | | | | | | | 2 | 1 | 1 | | | | | | | | | | 4 | 16.0 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | (12) | (12) | | |

* 1 改変サイトファーガ培地の成分の一つを肉エキスがカツオエキスにしたもの

* 2 冷水病菌が検出されなかったものも合わせた死亡魚数

表4 Fisherの直接確率計算法による結果

| | 菌液と洗浄菌体の比較 | | 肉エキスとカツオエキスの比較 | |
|-------|------------|--------|----------------|-------|
| | 肉エキス | カツオエキス | 菌液 | 洗浄菌体 |
| 確率(P) | 0.463 | 0.725 | 0.463 | 0.725 |

表5 菌体の処理による病原性の比較攻撃試験における死亡状況

| 試験区 | 供試尾数 | 経過日数 | | | | | | | | | | | | | | 死亡率 | |
|--------|------|------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 計 | % |
| 未処理区 | 25 | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0.0 |
| 菌体洗浄区 | 25 | | 1 | | | 1 | | | | | | | | | | 2 | 8.0 |
| 洗浄後静置区 | 25 | | | | | | | | | | | | 1 | | | 1 | 4.0 |
| 対照区 | 25 | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0.0 |

表6 浸漬攻撃法によるワクチン接種魚の死亡状況

| 試験区 | 浸漬攻撃 | 供試尾数 | 経過日数 | | | | | | | | | | | | | | | | 死亡率 | | P [※] | |
|-------------------|------|------|------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----------------|---------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | | 計 |
| 低濃度ワクチン区 | 第1回目 | 25 | | | | | 1 | | 2 | 2 | 2 | | 1 | | | | 1 | | | 8 | 32.0 | 0.0174* |
| | | 25 | | | 1 | 1 | 2 | | | | 2 | | | | | | | | | 6 | 24.0 | |
| 注射ワクチン区 (陽性対照) | 第1回目 | 25 | | | | | | | | | | 1 | | 1 | | | | | | 2 | 8.0 | |
| | | 25 | | | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 | | 2 | 8.0 | |
| 高濃度ワクチン区 | 第2回目 | 25 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0.0 | |
| | | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0.0 | |
| 対照区 | 第2回目 | 25 | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 | 4.0 | |
| | | 23 | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | 1 | 4.3 | |

※Fisherの直接確率計算法による低濃度ワクチン区と注射ワクチン区の有意差の検定

*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001