

アユ冷水病人為感染試験

嶋村一郎・湯浅明彦

冷水病非保菌種苗の生産技術を確立するためには、冷水病ワクチンの開発が不可欠である。しかし、アユの冷水病では安定的な人為感染法が確立されていないことが、ワクチン開発を進める上での隘路となっている。本試験ではワクチンの有効性を確認する攻撃試験で、明瞭かつ安定的な結果を得ることができる人為感染法の開発を目的とする。今年度は次の項目について基礎的な知見を得ることを目的に試験を行った。

- 1 菌株による病原性の検討
- 2 継代数による病原性の検討
- 3 培養時間による病原性の検討
- 4 長時間浸漬攻撃法の検討

本試験は、水産庁の補助を受けて平成12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

表1に各試験の実施条件を示した。1)から3)は皮下注射により菌液を試験魚に接種し、4)は菌液中に浸漬する方法で行った。

表1 各試験の実験条件

1) 菌株の病原性比較試験						
菌株	供試魚 (平均体重)	攻撃菌濃度 (CFU/尾)	飼育水温	菌液の希釈溶媒	培養時間	
PH9304	人工種苗 3.6g	$2.5 \times 10^6 \sim 10^4$	17.6 ~ 19.1	滅菌水道水	24時間	
PT98099	人工種苗 12.6g	$2.6 \times 10^7 \sim 10^4$	16.9 ~ 18.3	滅菌水道水	24時間	
PT01006	人工種苗 1.3g	$6.5 \times 10^6 \sim 10^4$	15.2 ~ 15.7	滅菌生理食塩水	24時間	
投げ込み式冷却機により一定水温に調整した						
2) 継代数の異なる場合の病原性比較試験						
菌株	供試魚 (平均体重)	攻撃菌濃度 (CFU/尾)	飼育水温	菌液の希釈溶媒	継代数	培養時間
PT98099	人工種苗 3.3g	$4.3 \times 10^7 \sim 10^4$	16.9 ~ 18.8	滅菌水道水	10 ~ 15	24時間
	人工種苗 1.4g	$2.3 \times 10^7 \sim 10^4$	15.4 ~ 15.8	滅菌生理食塩水	2	24時間
投げ込み式冷却機により一定水温に調整した						
3) 培養時間が異なる場合の病原性比較試験						
菌株	供試魚 (平均体重)	攻撃菌濃度 (CFU/尾)	飼育水温	菌液の希釈溶媒	培養時間	
PT01006	人工種苗 1.3g	$6.5 \times 10^6 \sim 10^4$	15.2 ~ 15.7	滅菌生理食塩水	24時間	
		$1.6 \times 10^7 \sim 10^4$	15.2 ~ 15.7	滅菌生理食塩水	50時間	
		$2.1 \times 10^5 \sim 10^2$	15.2 ~ 15.7	滅菌生理食塩水	73時間	
4) 長時間浸漬攻撃試験						
菌株	供試魚 (平均体重)	攻撃菌濃度 (CFU/ml)	飼育水温	菌液の希釈溶媒	培養時間	
A-1	人工種苗 4.0g	2.4×10^6 (1回目)	16.2 ~ 18.8	滅菌淡水	72時間	
		3.7×10^6 (2回目)				
		4.8×10^6 (3回目)				
A-1	人工種苗 4.8g	2.1×10^6 (1回目)	15.5 ~ 17.3	滅菌淡水	72時間	
		1.6×10^6 (2回目)				
		2.9×10^6 (3回目)				

皮下注射法は、アユの背鰭下後方の皮下に菌液0.05mlを接種して行った。菌液は改変サイトファーガ寒天培地（馬血清添加）で所定の時間培養した冷水病原菌を10mlの滅菌生理食塩水（又は滅菌水道水）に懸濁し、更に10段階希釈により所定の菌濃度に調整した。菌数は、寒天平板に0.1ml菌液を塗抹して計数した。攻撃後2週間の観察および死亡魚の細菌分離を行い、死亡原因の特定を行った。

長時間浸漬攻撃は、25尾のアユを50L水槽（実効水量30L）に収容し、所定の濃度に調整した菌液に3日間浸漬し、これを3回延べ9日間行った。菌液は改変サイトファーガ寒天培地（馬血清添加及び肉エキスの変わりにカツオ肉エキスを使用）で72時間培養した冷水病原菌を10mlの滅菌淡水に懸濁し、10段階希釈により所定の菌濃度に調整したものをを用いた。攻撃後2週間の観察および死亡魚から細菌分離を行い、死亡原因の特定を行った。

結果及び考察

1) 菌株の病原性比較試験

試験結果を図1～図3に示した。

PH9304株は接種量が 10^6 CFU/尾では50%程度の死亡率を示し、菌数が減るに従って死亡率も低下した（図1）。PT01006株は接種量が 10^6 CFU/尾で60%の死亡率であったが、攻撃菌数が減少しても死亡率がそれほど低下しなかった（図2）。ただし、混合感染症が発症し、冷水病による死亡かどうか疑わしいものがあった。

PT98099株では $10^6 \sim 10^7$ CFU/尾では80%以上の高い死亡率を示したが、 10^5 CFU/尾以下の菌量では急激に死亡率が低下した（図3）。

細菌の分離状況はPT98099で患部及び腎臓からほぼ純粋に高率に分離されたのに対し、PT01006株、PH9304株では腎臓からの分離率が低かった。

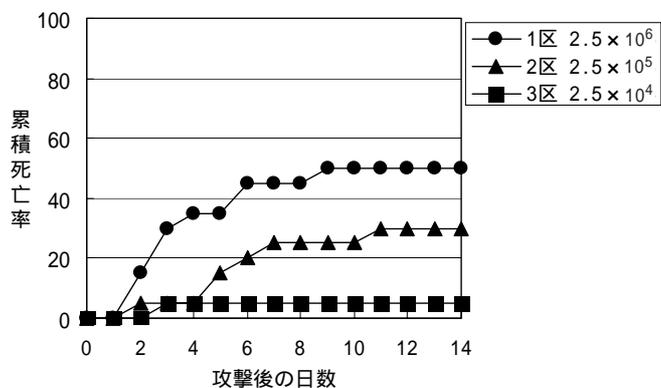


図1 PH9304株攻撃試験結果（24時間培養）

今回の試験結果から、菌株により病原性が異なることが考えられた。また、病原性の差は継代による影響以外に菌株の元来持っている病原性に起因することが示唆された。

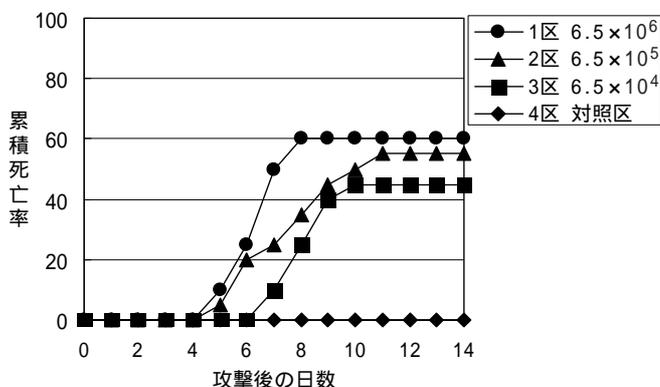


図2 PT01006株攻撃試験結果（24時間培養）

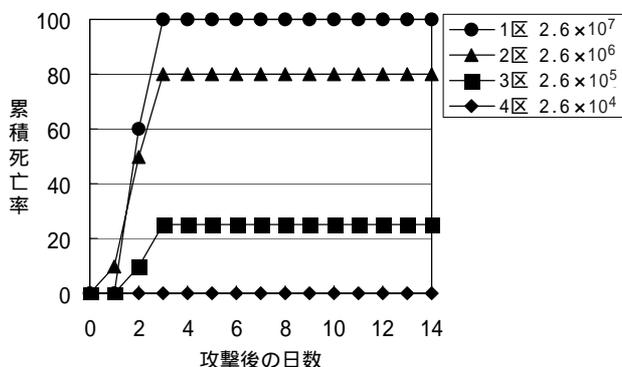


図3 PT98099株攻撃試験結果（24時間培養）

2) 継代数の異なる菌株の病原性比較試験

PT98099株をサイトファーガ寒天培地で植継いだ後、42時間培養して攻撃試験を行った結果を図4、5に示した。2回植継いだ株は接種量が $10^7 \sim 10^5$ CFU/尾で100%死亡したが、10～15回植継いだ株では、接種菌量が 10^7 CFU/尾より低下するにつれて漸次死亡率も低下した。このことから、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。

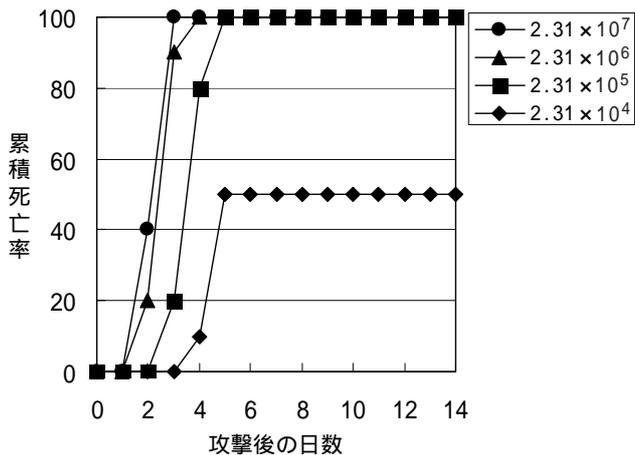


図4 2回植継いだPT98099株による攻撃試験結果

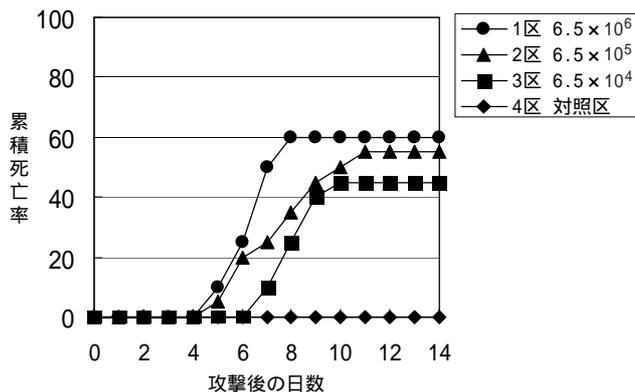


図6 PT01006株の攻撃試験結果 (24時間培養)

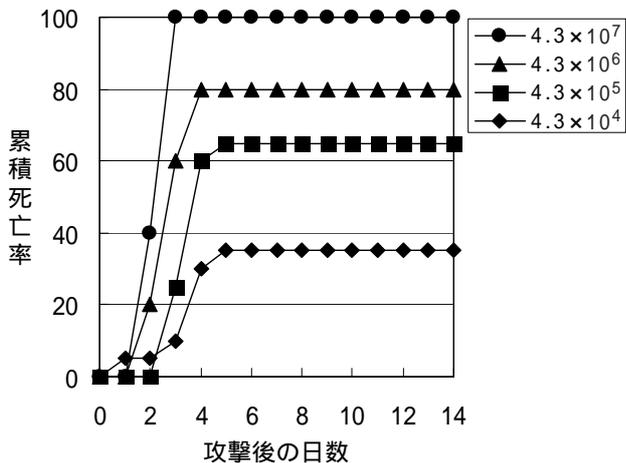


図5 10~15回植継いだPT98099株による攻撃試験結果

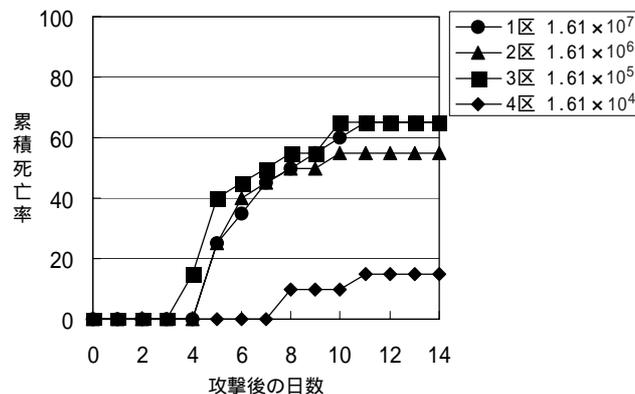


図7 PT01006株の攻撃試験結果 (50時間培養)

今回用いた菌株は比較的継代数が少なかったため、今後継代数の多い株について検討する必要がある。また、冷凍保存等により病原性が低下することが考えられるので、病原性復帰の方法について検討する必要がある。

3) 培養時間が異なる場合の病原性比較試験

PT01006株をサイトファーガ寒天培地で培養し、植継ぎ後24, 50, 73時間経過したものを用いた攻撃試験の結果を図6~8に示した。接種菌濃度は10段階希釈の4段階としたが、菌量不足のため24時間培養では3濃度の試験区とし、73時間培養では生菌数が減少したため10⁵CFU/尾以下の4濃度の試験区とした。各培養時間の10⁴CFU/尾接種量における累積死亡率の推移を図9に示した。

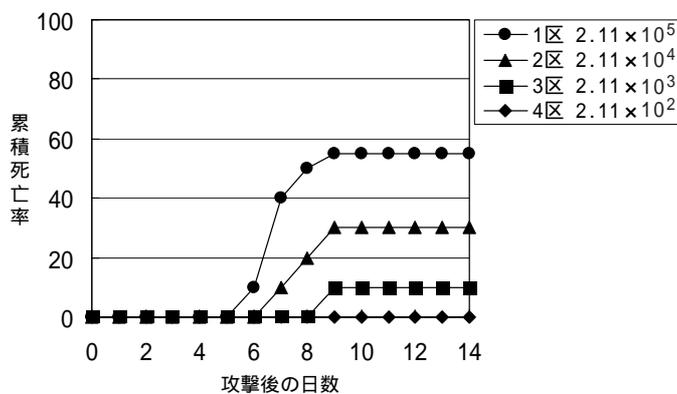


図8 PT01006株の攻撃試験結果 (73時間培養)

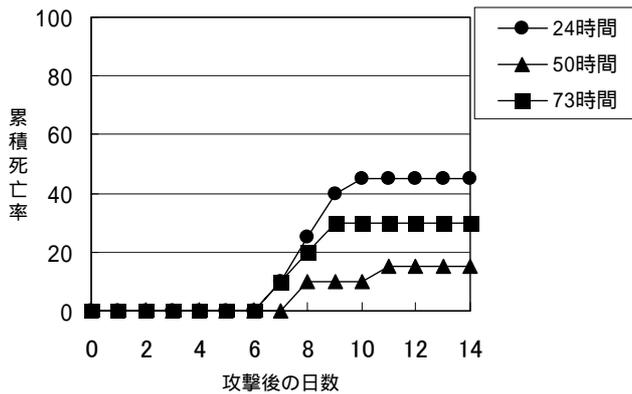


図9 PT01006株の培養時間による累積死亡率の推移

各培養時間の 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、 10^4 CFU/尾では培養時間により死亡率に差が見られた。 10^4 CFU/尾接種量での累積死亡率の推移を培養時間で比較すると、24時間、73時間、50時間の順に低下した(図9)。しかし、50時間培養試験区では混合感染症による死亡が多く、冷水病が主要な死亡原因であるかどうかは不明であった。

全ての試験区で死亡魚の体表患部から冷水病菌が70~80%の高率で純粋に分離されたが、腎臓からの分離率は50%程度であり、他の細菌(白色コロニを形成)と混合して分離されることが多かった。

今回の試験結果では接種菌量が少ない場合に培養時間による死亡率の差が認められた。また73時間培養では生菌数の低下が認められ、培養開始時の菌の塗沫量が多かったことが影響していると考えられる。これらのことから攻撃試験に用いる冷水病菌の培養時間は、50時間以内が望ましいと考えられる。

4) 長時間浸漬攻撃試験

結果を図10に示した。

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。死亡が認められた期間は大部分が浸漬攻撃期間中であり、その後の流水飼育中ではほとんど死亡しなかった。死亡魚の症状は体表の潰瘍、鰓の貧血、尾鰭の欠損、下顎の発赤等、冷水病の特徴的な症状を示した。一部例外はあるものの(1回目試験の14日目の死亡魚)殆どの場合、患部または腎臓から冷水病菌が分離された。

今回の試験では、死亡率は低いものの浸漬法により感染が成立することが確認された。今後、単純な処置で高い死亡率が得られる浸漬法の開発が必要であろう。

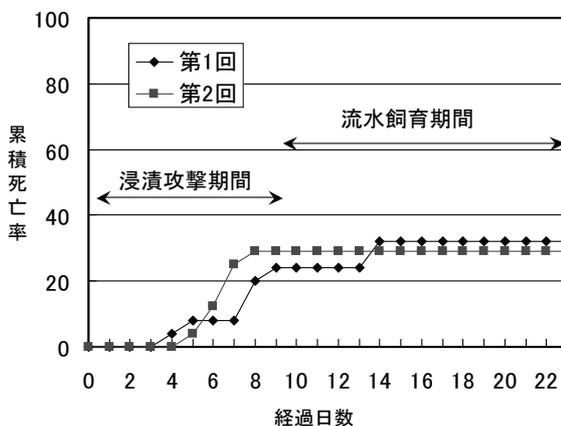


図10 長時間浸漬攻撃試験結果

図10 長時間浸漬攻撃試験結果

第1回	第2回
1回目攻撃菌数 2.40×10^6 CFU/ml	1回目攻撃菌数 2.11×10^6 CFU/ml
2回目攻撃菌数 3.70×10^6 CFU/ml	2回目攻撃菌数 1.55×10^6 CFU/ml
3回目攻撃菌数 4.78×10^6 CFU/ml	3回目攻撃菌数 2.87×10^6 CFU/ml