

農林水産業競争力アップ技術開発事業

「抗菌剤を使用しないアユ冷水病防除技術の開発

～早期実用化への試み～

河合俊輔

目 的

アユは本県の養殖対象魚種の中で、マダイ、クロマグロに次ぐ3位の生産量を誇る重要魚種である（平成30年788t；平成30年漁業・養殖業生産統計）。そのアユで最も発生件数が多い疾病は冷水病となっている¹⁾。アユ養殖業だけでなく主要河川でも毎年発生しており、河川漁協の遊漁料収入の減少に直結するため、冷水病はアユ養殖業と河川漁協の経営をひっ迫させる要因となっている。

現在、冷水病の治療薬として2種類の抗菌剤が承認されているが、しばしば再発することが確認されている。また、抗菌剤は適正に使用しないと薬剤耐性菌の出現を助長することが分かっており、実際サケ科魚類感染株の一部で耐性菌の出現が確認されている²⁾。そのため、抗菌剤を使用しない防除対策技術の開発は急務である。

本県ではこれまでに、農林水産業競争力アップ技術開発事業「アユ種苗における冷水病対策技術の開発」（平成27～29年度）では、従来のホルマリン不活化ワクチンに加えて、冷水病細菌由来毒素（以下fpcol）を取り入れたトキソイドワクチン（以下、トキソイド）を併用した浸漬ワクチンを開発し^{3) 5)}、除菌技術としてはクエン酸ナトリウム溶液を病魚へ浸漬させる方法⁴⁾により、へい死を抑制することを確認した。しかし、試作ワクチンは安定して高い効果が現れず、除菌技術ではクエン酸ナトリウムの浸漬回数が多い等の理由で実用化に至っていない。

そこで、抗菌剤を使用しない冷水病の防除対策としてワクチン及び除菌技術の実用化に結びつけるための技術開発試験を行った。

方 法

1. ワクチン試験

(1) 供試魚・試験区

供試魚は冷水病感染歴の無い人工産アユ（平均体重6.8g）とした。各区約190LのFRP水槽を使用し、全ての水槽に供試魚を28～45尾収容した。

(2) ワクチン

不活化菌体と非活性コラゲナーゼ菌体内発現大腸菌を各200mlと0.3%ホルマリン添加生理食塩水（以下、PBS）1.3Lを混合し、蒸留水で10倍及び50倍に希釈したものを供試した（一般財団法人松岡科学研究所作成）。不活化菌体は、冷水病細菌SG150804株及びPH0424株の培養液を濃縮、ホルマリンによる不活化、さらに10分間の超音波処理により菌体の破碎処理を行い、保存剤として0.3%ホルマリン、溶剤としてリン酸緩衝生理食塩水（PBS(-)）で調整して作成された。非活性コラゲナーゼ菌体内発現大腸菌については次のとおり作成した。形質転換した大腸菌*E. coli*（BL21（DE3）/PET22b(+)-fpcol（f883））をAPS LB培地にて、前培養（37℃，180rpm，16時間往復振とう）後、本培養（37℃，180rpm，7時間旋回培養中，2時間後にIPTG終濃度0.05mM添加）を行い，4%パラホルムアルデヒドPBSを終濃度0.3%ホルマリン相当となるよう添加し，4℃で1晩不活化した。その後30分間冷却遠心（4℃，5,000×g）し，ペレットを300mlの0.3%ホルマリン添加PBSに再懸濁し，10分間の超音波処理と5分間の冷却を4サイクル繰り返した。非活性は，発現した不溶性画

分をアルギニン存在下の透析により得た可溶化物が、ゼラチンザイモグラフィーによりゼラチン分解活性を持たないことで確認した。

ワクチンの魚体への処理は、魚体重の4倍量のワクチン溶液に供試魚を通気しながら30分間浸漬し、10倍希釈ワクチンはこの処理を2週間間隔で2回行い、50倍希釈は1回とした。浸漬水温は通常水温帯（16.6～17.0℃）及び高水温帯（22.8～24.7℃）の試験区を設けた。

(3) 人為感染

人為感染で使用する冷水病細菌はPH-0424株とした。当株は1/2CGY液体培地100mlで15℃、48時間振とう培養した後、さらに1Lの1/2CGY液体培地に1回目の培養液を全量入れ、48時間攪拌培養し10倍希釈したものを感染菌液とした。培養後の菌液の620nm波長における吸光度は0.62を示したため、過去の試験から攻撃菌液の生菌数は 10^7 CFU/ml程度であると推定された。感染は、最後のワクチン接種から14日後に、全ての供試魚に魚体重の4倍量の菌液で通気しながら60分間浸漬した。感染時の水温は18℃付近となるようウォーターバス方式で感染水槽の外側に井戸水をかけ流した。その後は190L水槽にて $15.0 \pm 1^\circ\text{C}$ となるよう注水量を調整し、3週間無給餌で飼育した。その間、各区のへい死数を記録した。へい死魚は症状を確認した後、鰓組織又は腎臓からの菌分離により得られたコロニーをPCRで冷水病菌かどうか同定した。終了後の累積へい死率から有効率（：RPS = $1 - (\text{ワクチン接種群のへい死率} / \text{ワクチン非接種群のへい死率}) (\%)$ ）を算出した。

(4) ワクチン後の抗体量の確認

感染前日の各区の供試魚から血液を採取し、1晩静置し、遠心して血清を得た。ワクチンの抗原である不活化菌体による抗体量は既報²⁾の方法（ELISA法）で確認した。もう一つの抗原であるfpcolについては、二次抗体としてPBSで4,000倍希釈した抗Histagマウスモノクローナル抗体（ナカライテスク：04428-26）を使用したELISA法で確認した。1血清毎の抗体価は3ウェルの平均値で求めた。

2. クエン酸ナトリウム試験

供試魚は平均体重10.4gの人工種苗とし、4基の720L水槽に100尾ずつ収容した。試験飼料はクエン酸ナトリウム1%及び5%添加飼料を次のとおり作成した。配合飼料重量の1%及び5%のクエン酸三ナトリウム二水和物を飼料の10%程度の水に溶解させ、飼料に噴霧した後、袋の中でよく振とうし、吸着させた。その後50℃で8時間乾燥し、飼料重量の4%のサラダ油を展着させた。無添加飼料は、飼料重量の10%の水を添加し乾燥後、飼料重量4%のサラダ油を展着させたものとし、対照区1及び対照区2に給与した。給餌回数は1日3回、給餌率4%で27日間給与した。その後冷水病細菌に人為感染させるため、1%区、5%区及び対照区1の供試魚に 10^6 CFU/ml程度に調整された冷水病細菌を1個体あたり0.1ml注射器で腹腔内に接種した。感染方法を浸漬ではなく注射とした理由は、魚体重10g程度の個体の場合、浸漬感染でへい死しにくいためである。対照区2については、1/2CGY培地を1個体あたり0.1ml腹腔内に接種した。接種後21日間各区のへい死数を記録し、累積へい死率を比較した。

結果及び考察

1. ワクチン試験

へい死魚は、口周辺又は体表に発赤の症状を呈し、PCR検査により陽性が確認されたため、冷水病によるへい死であることが確認された。感染後21日間の累積へい死率の推移を図1に示した。通常の水温試験では、3試験区全て80%以上の累積へい死率となり、へい死抑制効果が全く確認されなかった。高水温試験では、対照区及び50倍希釈1回区がそれぞれ3日、6日で累積へい死率がそれぞれ100%、98%に達したのに対し、10倍希釈2回区は3日で40%、6日で57%に留まり、最終的に21日後には69%と他の試験区に比べて約3割へい死率が低かった。当区の累積へい死率は対照区に比べて有意に少ないことが確認され（フィッシャーの正確確率検定、 $p < 0.01$ ）、有効率は31%となった。

図2に、ELISA法の結果を示した。抗原を冷水病菌体とした場合、10倍希釈×2回では抗体価は高水温区の方が高かったが、50倍希釈×1回では両者の抗体価はほぼ同じとなった。高水温の対照区の抗体価が0.79と

高くなった理由は不明であった。一方 fpcol を抗原とした場合、10 倍希釈×2 回では、高水温と通常水温の抗体価は同等で、50 倍希釈では高水温の方が通常水温よりも若干下回る結果となった。高水温で浸漬した個体は菌体に対して多く抗体を産生した。対照区との比較でワクチン効果の裏付けを確認することはできなかったが、冷水病菌体を抗原とした場合に限り、10 倍希釈×2 回区の抗体価が 50 倍希釈×1 回区を上回ったため、ワクチン試験でのワクチン効果を裏付けるものとなった。

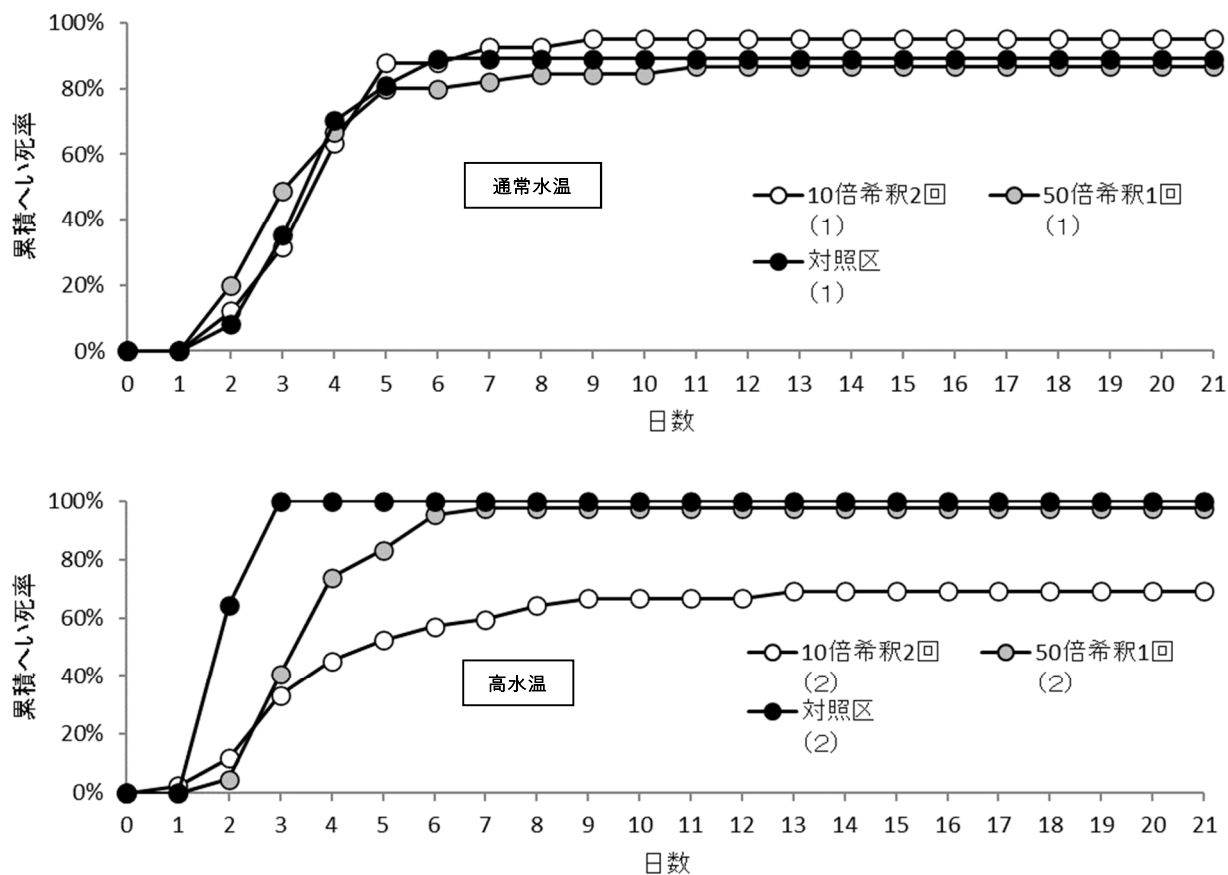


図1 ワクチン試験における感染後 21 日間の累積へい死率の推移
上段：通常水温 下段：高水温

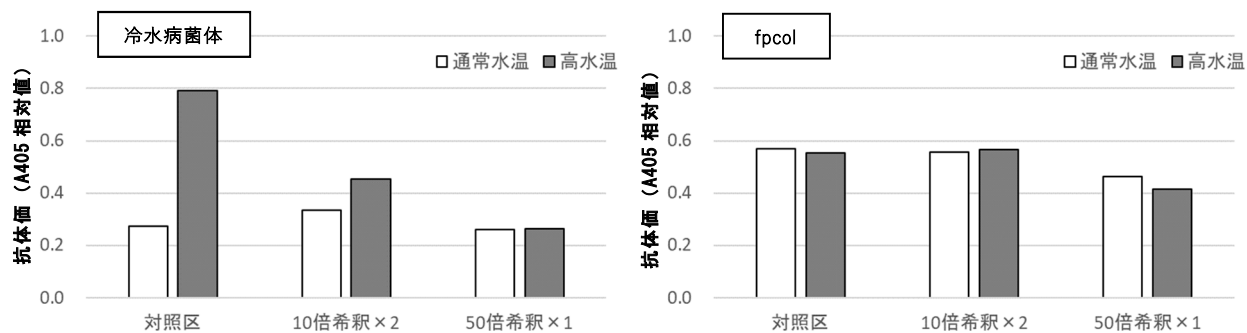


図2 ELISA 法の結果
左：冷水病菌体を抗原とした場合 右：fpcol を抗原とした場合

2. クエン酸ナトリウム試験

へい死魚は注射患部に発赤の症状を呈し、PCR 検査により陽性が確認されたため、冷水病によるへい死であることが確認された。累積へい死率の推移を図 3 に示した。無処理区 1 では開始 5 日で 90%がへい死したのに対し、クエン酸ナトリウム 1%区及び 5%区はともに 47%に留まった。21 日後も対照区 1 では 93%だったのに対し、1%区では 55%、5%区では 49%で、ともに対照区 1 と比べ有意にへい死率が低かった（フィッシャーの正確確率検定、 $p < 0.01$ ）。また、培地のみを注射した対照区 2 は期間を通してへい死がなかったことから、試験区全体として注射による冷水病以外のダメージは無かったと推察された。

クエン酸ナトリウムの経口投与は、添加率 1%、5%で大きな差はなく、冷水病に対する有意なへい死抑制効果が確認され、コスト面から添加率 1%での普及が妥当であると考えられた。

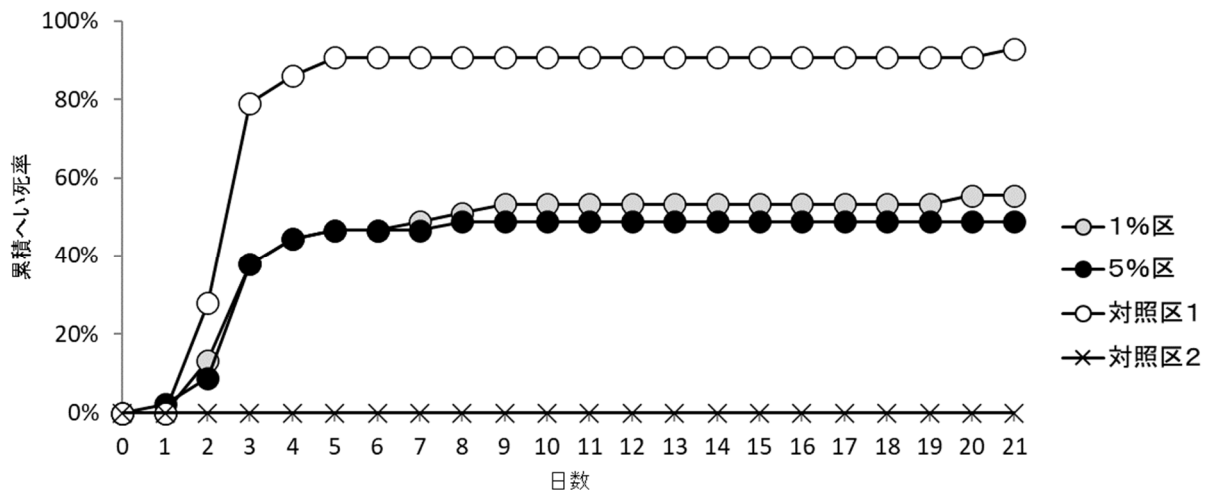


図 3 クエン酸ナトリウムの経口投与試験における累積へい死率の推移

文 献

- 1) 河合俊輔・賀集健太（2018）水産衛生対策（内水面）. 平成 30 年度和歌山県水産試験場事業報告, 62-64.
- 2) 熊谷明（2016）：薬剤感受性試験「全国養鱒技術協議会魚病対策研究部会活動報告Ⅱ 平成 17 年度～26 年度.熊谷明編」, 5-14
- 3) 中山仁志・葦澤崇博（2016）農林水産業競争力アップ技術開発事業「アユ種苗における冷水病対策技術の開発」. 平成 27 年度和歌山県水産試験場事業報告, 66-69.
- 4) 河合俊輔（2017）農林水産業競争力アップ技術開発事業「アユ種苗における冷水病対策技術の開発」. 平成 28 年度和歌山県水産試験場事業報告, 83-85.
- 5) 河合俊輔（2018）農林水産業競争力アップ技術開発事業「アユ種苗における冷水病対策技術の開発」. 平成 29 年度和歌山県水産試験場事業報告, 77-79.