

人為3倍体アユのビブリオ病に対する抗病性

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	稲田, 善和 吉村, 研治 谷口, 順彦
巻/号	56巻10号
掲載ページ	p. 1587-1591
発行年月	1990年10月

人為3倍体アユのビブリオ病に対する抗病性*1

稲田 善和, 吉村 研治, 谷口 順彦

(1990年3月13日受付)

Study on the Resistance to Vibriosis in Induced Triploid Ayu
Plecoglossus altivelis

Yoshikazu Inada,*2 Kenji Yoshimura,*3 and Nobuhiko Taniguchi*4

The resistance to vibriosis of triploid ayu induced by cold shock and normal diploid ayu were compared by the susceptibility to *Vibrio anguillarum* and the potency of vibriosis vaccine as parameters. It was demonstrated by immersion challenge experiments that there was no difference in susceptibility to *V. anguillarum* between the two groups. The artificial challenges with *V. anguillarum* were also attempted at 1, 2, 3 and 8 weeks after an immersion vaccination. The relative of percentages survival in triploid was slightly lower than that in diploid, but the difference was not significant. From these results, it is suggested that the resistance to vibriosis in triploid ayu is quite similar to that of normal diploid ayu.

アユ *Plecoglossus altivelis* においても、人為3倍体種苗の生産が可能となり、^{1,2)} その長寿、不妊性などの特性を活用して、養殖用あるいは放流用として実用化することが期待されている。

一方、人為3倍体アユにおいて、各種の疾病に対する抗病性を検討しておくことは、今後実用化を図るうえで重要な課題と考えられる。

人為3倍体魚の抗病性に関しては、サケ科の魚種で若干の研究が報告されているが、^{3),*5)} 人為3倍体アユについてはまったく検討されていない。

そこで、著者らは、アユの重要な細菌性疾病であるビブリオ病に対する感受性と、ビブリオ病ワクチンの効果について、人為3倍体アユと正常2倍体アユとの間で比較検討したので報告する。

実験方法

1. *Vibrio anguillarum* に対する感受性比較試験

供試魚: 1985年10月に低温ショック法^{1,2)}によって作出した3倍体アユと、同時期に孵化させた2倍体アユをそれぞれ同様に種苗生産し、1986年7月まで養成し

た未成魚を供試魚とした。

実験は7月4日~8月14日の間に3回行ったが、第1回の実験開始後の7月10日に2倍体アユに標識(脂鱗切除)を施し、3倍体アユと同一水槽内で混養して給餌を行い、第2および第3回目の実験に供試した。各実験における3倍体アユと2倍体アユの平均体重とSDは実験-Iでは 6.2 ± 1.2 gと 7.0 ± 1.9 g、実験-IIでは 7.6 ± 1.5 gと 9.0 ± 1.9 g、実験-IIIでは 10.6 ± 2.1 gと 12.2 ± 2.1 gで、いずれの場合も3倍体アユの方が若干小さかった。

供試菌株: 宮崎大学より分与を受けた血清型Aの*V. anguillarum* PT 24株を用いた。実験に先立って、実験魚以外のアユに筋肉内注射により人為感染させ、その感染魚を -40°C で冷凍保存して供試菌株の病原性を保持した。

人為感染法: 浸漬感染法⁴⁾を用いた。実験の直前に冷凍保存中の感染魚を解凍し、それより供試菌を再分離したのち、1%食塩加トリプトソイブイオン培地に接種し、 25°C で24時間培養を行った。この菌液を原液として1%の割合に食塩を添加した滅菌飼育用水を用いて、

*1 1987年4月日本水産学会春季大会で報告した。

*2 福岡県内水面水産試験場 (Fukuoka Prefectural Fresh Water Fisheries Experimental Station, Asakura, Fukuoka 838-13, Japan).

*3 福岡県栽培漁業公社 (Fukuoka Prefectural Mariculture Center, Genkai, Fukuoka 811-35, Japan).

*4 高知大学農学部栽培漁業学科 (Department of Cultural Fisheries, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783, Japan).

*5 川嶋尚世, 鈴木雄策, 高瀬進, 青木一永, 阪本雄康: 昭和62年度静岡県水産試験場事業報告, 307-311 (1988).

$10^0 \sim 10^5$ CFU/ml になるように各濃度の菌浮遊液 5 l ずつを作製した。この菌浮遊液の中に供試魚を 10 尾または 20 尾ずつ 5 分間浸漬することにより人為感染させた。

感染後の飼育および観察: 感染後は、菌濃度別に 40 l 容量の水槽を用いて、それぞれの供試魚を 10 日間流水飼育し、毎日のへい死状況を観察した。また、へい死魚については、腎臓から細菌分離を行い、供試菌によるへい死であることを確認した。なお、飼育期間中の水温は $19.5^\circ\text{C} \sim 20.8^\circ\text{C}$ であった。

2. ビブリオ病ワクチンの効果比較試験

供試魚: 1986 年 10 月に低温ショック法により作出した 3 倍体アユと、同時期に孵化させた 2 倍体アユを原種苗として、1987 年 7 月まで養成した未成魚を供試魚とした。両者は、同年 5 月 21 日から実験に供試するまでの間、2 倍体アユに標識（脂鱗切除）し、同一水槽内で混養した。

供試菌株: 自然発症した人工生産アユから分離した血清型 A の *V. anguillarum* を用いた。なお、攻撃試験に使用するために、予め実験魚以外のアユを用い浸漬感染法により人為感染させ、その感染魚を -40°C で冷凍保存した。

ビブリオ病ワクチンの製法: 供試菌株を 4 l の 1% 食塩加トリプトソイブイオン培地に接種し、 25°C で 48 時間スターラーで攪拌しながら培養を行ったのち、0.3% の濃度になるように中性ホルマリンを加え、 4°C に 24 時間放置して不活化したものをワクチン原液とした。

ワクチン処理法: 直接浸漬法^{4,5)}を用いた。製造後 1 週間冷蔵庫内に保存していたワクチン原液を滅菌飼育用水で 10 倍希釈し、40 l のワクチン液を作製した。この液に 3 倍体と 2 倍体アユの供試魚をそれぞれ 100 尾ずつ 10 分間浸漬した。

ワクチン処理後の飼育: ワクチン処理した供試魚は、対照の無処理の供試魚とまったく同一条件で、残餌が出

ない程度に 1 日 3 回給餌しながら 5 t 容量水槽で流水飼育した。

攻撃方法と供試魚の大きさ: ワクチン処理後、1, 2, 3 および 8 週目に先と同じように浸漬感染法によって攻撃した。すなわち 1% 食塩加滅菌飼育用水を用いて、菌濃度が 10^4 CFU/ml になるように調整した 5 l の菌浮遊液 4 区を作製した。この菌浮遊液の中に、ワクチン処理した 3 倍体と 2 倍体アユ、および無処理の 3 倍体と 2 倍体アユを 20 尾または 25 尾ずつ 5 分間浸漬した。

1, 2, 3 および 8 週目の攻撃試験に用いた 3 倍体と 2 倍体アユの平均体重と SD は、1 週目は 8.1 ± 1.3 g と 9.9 ± 1.6 g, 2 週目は 9.0 ± 1.3 g と 10.9 ± 2.0 g, 3 週目は 11.4 ± 2.0 g と 12.4 ± 2.0 g, 8 週目は 15.1 ± 2.4 g と 16.7 ± 3.0 g で、いずれの場合も 3 倍体の方が若干小さかった。

攻撃後の飼育および観察: 攻撃後は、それぞれの試験区毎に 40 l 容量の水槽を用いて 2 週間流水飼育し、毎日のへい死状況を観察した。へい死魚については腎臓から細菌分離を行い、供試菌によるへい死であることを確認した。飼育中の水温はいずれの試験の場合も $20.6 \sim 20.9^\circ\text{C}$ であった。

結 果

1. *V. anguillarum* に対する感受性の比較試験

3 倍体と 2 倍体アユを濃度別の *V. anguillarum* で人為感染させた後のへい死率と、Reed-Muench⁶⁾法により算出した LD_{50} 値を Table 1 にまとめて示した。各実験毎のへい死率は、人為感染の菌濃度が若干異なるため一様ではなかったが、いずれの場合も、 10^5 CFU/ml および 10^4 CFU/ml の濃度では全ての供試魚がへい死し、また人為感染させなかった対照区ではまったくへい死魚は認められなかった。

各実験における 3 倍体と 2 倍体アユに対する *V. anguillarum* の LD_{50} 値は、実験-I では、3 倍体アユで $3 \times$

Table 1. Comparison of mortality rate between triploid and diploid ayu infected with different concentrations of *Vibrio anguillarum*.

Concentration of <i>V. anguillarum</i>	Exp-I		Exp-II		Exp-III	
	Triploid	Diploid	Triploid	Diploid	Triploid	Diploid
10^5 (CFU/ml)	100*	100	—	—	100	100
10^4	100	100	100	100	100	100
10^3	100	100	100	100	65	60
10^2	80	40	45	40	10	10
10^1	20	10	10	15	0	0
10^0	0	0	—	—	—	—
Control	0	0	0	0	0	0
LD_{50}	$3 \times 10^{1.5}$	$3 \times 10^{2.1}$	$2 \times 10^{2.0}$	$2 \times 10^{2.3}$	$3 \times 10^{2.7}$	$3 \times 10^{2.8}$

* Percent of dead fish

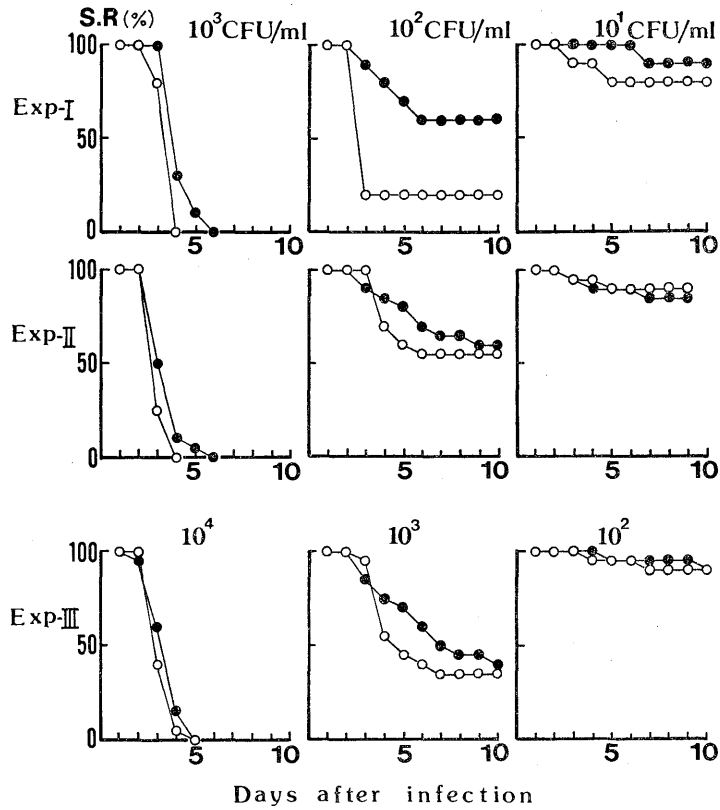


Fig. 1. Changes in survival rate (SR) of triploid and diploid ayu infected with different concentrations of *V. anguillarum*.
 (○) Triploid, (●) Diploid.

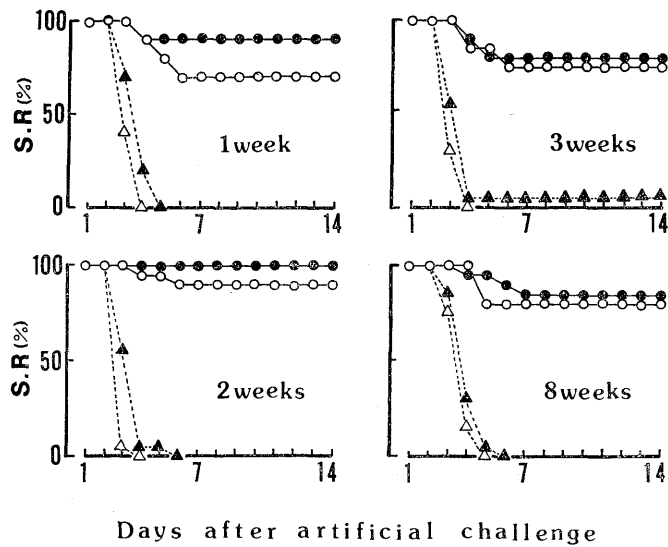


Fig. 2. Changes in survival rate (SR) of triploid and diploid ayu vaccinated and challenged with *V. anguillarum* at given intervals.
 (○) Vaccinated triploid, (△) Non-vaccinated triploid, (●) Vaccinated diploid, (▲) Non-vaccinated diploid.

Table 2. Relative of Percentages Survival in triploid and diploid ayu vaccinated and challenged with *V. anguillarum* at given intervals

Weeks after Vaccination	Triploid	Diploid
1	70*	89
2	90	100
3	75	79
8	80	85

$$* \text{ RPS: } 1 - \left\{ \frac{\% \text{ vaccination mortality}}{\% \text{ control mortality}} \right\} \times 100.$$

$10^{1.5}$ CFU/ml, 2 倍体アユで $3 \times 10^{2.1}$ CFU/ml となり, 若干の差がみられたが, 実験-II では, それぞれ $2 \times 10^{2.0}$ CFU/ml と $2 \times 10^{2.3}$ CFU/ml, 実験-III では $3 \times 10^{2.7}$ CFU/ml と $3 \times 10^{2.8}$ CFU/ml であり, 3 倍体と 2 倍体アユとの間にほとんど差はみられなかった。また, 3 倍体と 2 倍体アユの菌濃度別の経日的な生残率変化を Fig. 1 に示した。実験-I の 10^8 CFU/ml で人為感染させた場合を除いて, 最終生残率では両者の間に有意な差は認められなかったが, 3 倍体アユの方が 2 倍体アユよりも先にへい死する傾向がみられた。

2. ビブリオ病ワクチンの効果比較試験

ワクチン処理後, 1, 2, 3 および 8 週目に攻撃した場合の 3 倍体と 2 倍体アユのワクチン区および無処理区の経日的な生残率の変化を Fig. 2 に示した。1 週目の攻撃では, 無処理区の 3 倍体と 2 倍体アユは全てへい死したのに対して, ワクチン区の 3 倍体アユは 70% の生残率を示し, 2 倍体アユは 90% の生残率を示した。2 週目では, 無処理区は両者とも全滅し, ワクチン区の 3 倍体アユは 90% が生残し, 2 倍体アユは 100% が生残した。3 週目では, 無処理区の 3 倍体アユは全滅し, 2 倍体アユは 5% が生残したのに対して, ワクチン区の 3 倍体アユは 75% が生残し, 2 倍体アユは 80% が生残した。8 週目では, 無処理区は 3 倍体および 2 倍体アユともに全滅し, ワクチン区の 3 倍体アユは 80% が生残し, 2 倍体アユは 85% が生残した。このように, ワクチン区の 3 倍体アユは, 2 倍体アユ同様無処理区よりも高い生残率を示した。さらに, ワクチン区のみについて, 3 倍体と 2 倍体アユの生残率を比較すると, いずれの場合も 3 倍体の方が低かったが, 両者の間に有意な差はみられなかった。また, 1, 2, 3 および 8 週目の攻撃試験から算出した 3 倍体と 2 倍体アユの RPS を Table 2 に示した。いずれの週においても, 3 倍体アユの RPS は 2 倍体アユのそれよりやや低い値を示した。

考 察

人為 3 倍体アユの抗病性について, ビブリオ病の原因

菌である *V. anguillarum* に対する感受性とビブリオ病ワクチンの効果の両面から, 正常 2 倍体アユと比較検討した。

3 倍体と 2 倍体アユの *V. anguillarum* に対する感受性について, 3 回の反復実験結果を解析してみると, 実験-I では 3 倍体と 2 倍体アユの LD₅₀ 値の間に若干の差がみられ, 実験-II および実験-III では両者間にほとんど差はみられなかった。3 回の実験手法はまったく同様であることから, この若干の相違の要因は供試魚の状態によるものと思われた。すなわち, 実験-I の 3 倍体と 2 倍体アユの供試魚は別々の水槽から得られたものであるが, 実験-II および実験-III の供試魚は, 3 倍体と 2 倍体アユを混養してのち, それぞれ 12 日目と 27 日目に得られたものである。このような実験に供試するまでの飼育前歴が実験結果に影響したものと考えられる。したがって, 実験-II および実験-III の結果からみると, 3 倍体と 2 倍体アユの *V. anguillarum* に対する感受性にはほとんど差はないものと推察される。ただ, Fig. 1 に示したように, 経日的なへい死状況をみると, 最終生残率には有意な差はないものの, 3 倍体アユの方が 2 倍体アユよりもやや先にへい死する傾向がみられた。このことは, 3 倍体アユの *V. anguillarum* に対する感受性の方が, 2 倍体アユのそれよりも, 僅かながら高いことを示唆している。

ビブリオ病ワクチンの効果については, ワクチン処理後の 1, 2, 3 および 8 週目の攻撃試験では, 3 倍体アユも 2 倍体アユ同様, ワクチン処理区は無処理区よりも高い生残率を示し, ワクチンによる予防効果が期待できることが判明した。ただ, 3 倍体と 2 倍体アユの RPS を比較すると, いずれの週の攻撃試験においても, 3 倍体アユの方がやや低い値を示し, 3 倍体アユにおけるビブリオ病ワクチンの効果は, 2 倍体アユにおける場合よりもやや低い可能性があるとも考えられた。しかしながら, Fig. 2 に示したように, *V. anguillarum* で攻撃した後の無処理区の 3 倍体と 2 倍体アユの経日的なへい死状況をみると, 前述の *V. anguillarum* に対する感受性の比較試験の場合と同様に, 3 倍体アユの方が 2 倍体アユよりもやや先にへい死し, 感受性が僅かに高い傾向をみせた。このことが, ワクチン区の 3 倍体アユの生残率にも影響し, 結果として, 3 倍体アユの RPS 値を 2 倍体アユよりも低いものにしたと考えられる。すなわち, 3 倍体と 2 倍体アユの RPS 値の差は, ワクチン効果そのものの差というよりも, 3 倍体アユの僅かに高い感受性が反映されたものと推察される。

以上のように, 3 倍体アユのビブリオ病に対する抗病性を検討した場合, *V. anguillarum* に対する感受性については, 2 倍体アユよりも僅かながら高い傾向はあるも

の、ほとんど差はなく、ビブリオ病ワクチンの効果についても、RPSとしてはやや低い値を示すが、2倍体アユと同様であることから、3倍体アユも2倍体アユと同程度の抗病性を有するものと考えられた。

なお、今回の実験に用いた3倍体と2倍体アユの供試魚は同一親魚由来のものでなく、また、種苗生産時の混養は不可能であり、厳密な意味での前歴が共通ではない。したがって、今後遺伝形質を含めた詳細な検討が必要であると考えている。

謝 辞

本研究を実施するに当たり、懇切な指導と校閲の労を賜った宮崎大学農学部北尾忠利教授をはじめ、適切な助言を戴いた徳島県水産試験場城 泰彦博士、共立商事 KK 小松 功氏、以上の方々に深く感謝する。なお、本研究の一部は水産庁の地域バイオテクノロジー研究開発

促進事業の国庫補助金により実施した。

文 献

- 1) N. Taniguchi, S. Seki, Y. Inada, and K. Murakami: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 503 (1985).
- 2) N. Taniguchi, A. Kijima, J. Fukai, and Y. Inada: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 49-53 (1986).
- 3) J. E. Parsons, R. A. Bush, G. H. Thorgaard, and P. D. Scheerer: *Aquaculture*, **57**, 337-343 (1986).
- 4) 城 泰彦: 四国医学雑誌, **37**, 82-110 (1981).
- 5) K. Kawano, T. Aoki, and T. Kitao: *Fish Pathology*, **18**, 143-149 (1983).
- 6) 国立予防衛生研究所学会: ウィルス実験学総論, 改訂二版, 丸善, 東京, 1973, pp. 479-480.