

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」

中山仁志・葦澤崇博（内水面試験地）

1 目的

冷水病はアユの代表的な疾病であり、県内の養殖場や河川において頻繁に発生している。時に大量へい死を引き起こすため、アユ養殖場や漁協の経営を圧迫する原因の一つとなっている。しかし、現在のところ有効な予防・治療法が確立されていないことから、冷水病被害を十分に軽減できていない状況にある。

そこで、本研究はアユ種苗の健全性診断技術を確立するとともに、冷水病菌の除菌技術や冷水病耐性を獲得したアユ種苗の作成技術を確立することにより、冷水病による経済的損失を軽減させることを目的とする。

2 方法

1) アユ種苗の健全性診断技術の確立

(1) 冷水病菌高感度検出技術の開発

冷水病菌由来DNAを鋳型として、プライマーfpPPIC-F：5'-GTACCATGATACAGTCAGGTTTTATACCA及びfpPPIC-R：5'-GCGTTTTAAATCCAACCTCTTGCTTCGを用いたPCRにより増幅を行った¹⁾。DNAポリメラーゼはTaKaRa Ex Taq®（タカラバイオ社製）を使用し、サーマルサイクラー（エッペンドルフ社製マスターサイクラー）で熱変性96°C×1分、アニーリング60°C×30秒、伸長72°C×30秒を30サイクル繰り返すことによって増幅した。この増幅産物をエタノール沈殿によって精製した後に、10倍毎に段階希釈してPCRの鋳型とした。これを用いて、上記と同じ条件でPCRを行い、増幅産物を2%アゲロースゲルによる電気泳動に供した後、エチジウムブロマイドで染色を行った。

nestedリアルタイムPCRにおいては、上記で調整した増幅産物を鋳型として用い、nestedプライマーとしてPPIC-Q-F：5'-CTTCGATGTAGTTTCTGTGCCATA及びPPIC-Q-R：5'-TCTAATTCACGAGATTCGTCTGCTを用いた。SYBR Premix Ex Taq II（タカラバイオ社製）を試薬として、リアルタイムPCR装置（アプライド・バイオシステムズ社製7900HT Fast）を用いて、熱変性95°C×5秒、アニーリング・伸長60°C×30秒を40サイクル繰り返すことによって増幅し、プログラムSDS ver2.0を用いて解析を行った。1条件につき、2ウェルずつの反応・解析を行った。

(2) アユの集団としての健全性を診断する技術の確立

冷水病を自然発病したアユ人工種苗集団を対象として、定期的に生魚10尾から採血を行った。採血は尾へい部を切断し、ヘマトクリット毛細管を用いて行った。採取した血液は4°Cで18時間程度インキュベートした後に、1,500×gで10分間遠心し、上清を血清として回収した。血清はELISA法による分析又は血清グロブリン量の定量に供するまで-20°Cで保存した。

ELISA法 10mg（湿重量）の冷水病菌SG-1株菌体を50mLの炭酸塩バッファー（pH9.6）に懸濁し、抗原溶液とした。ELISAプレートのウェルに100μLの抗原溶液を入れ、25°Cで1時間インキュベートした。次に、200μLの1%ブロッキングバッファー（ブロックエース粉末、DSファーマバイオメディカル）を添加し、4°Cで18時間程度インキュベートした。次に、50μLのアユ血清（TBSTバッファー：20mM トリス塩酸溶液 pH7.4, 136mM 塩化ナトリウム, 2mM 塩化カリウム, 3mM アジ化ナトリウム, 0.05% Tween 20溶液、で10倍希釈）を添加し、25°Cで1時間インキュベートした。血清1サンプルにつき、3ウェルずつの解析を行った。50μLの200倍希釈済み抗アユIg-MマウスIg-G抗体（Aquatic Diagnostics Ltd.）を添加し、25°C×1時間インキュベートした。次に、2,000倍希釈した抗マウスIg-G抗体・アルカリフォスファターゼ（Vector Laboratories Inc.）を50μL添加し、25°Cで1時間インキュベートした。その後、アルカリフォスファターゼの基質であるニトロフェニルリン酸二ナトリウムを100μL添加して、37°Cで2時間インキュベートした。100μLの2N水酸化ナトリウム溶液を添加して反応を停止させた後に、マイクロプレートリーダー（IMMUNO-MINI NJ-2300, ナルゲヌンク社製）を用いて、405nm波長における吸光度を測定した。なお、上述の各段階の間においては、200μLのTBSTバッファーで3回ずつ洗浄した。1血清毎の抗体価は3ウェルの平均値で求めた。

血清タンパク質の測定 血清グロブリン量はELISA法に用いたものと同じ血清を用い、以下の式により算出した。

$$[\text{血清グロブリン量} = \text{血清総蛋白量} - \text{血清アルブミン量}]^2)$$

血清総蛋白質量はBCAプロテインアッセイキット（タカラバイオ社製）を用いてLowry法により定量し、血清アルブミン量はBCGアルブミン定量キット（バイオアッセイシステムズ社製）を用いて定量した。

2) 冷水病菌の除菌技術の確立

カルシウム存在下で冷水病菌のタンパク質分解酵素の活性が上がること³⁾が知られている。そこでキレート（金属イオンの吸着）効果のあるクエン酸ナトリウムを用いて冷水病の除菌試験を行った。

供試魚は冷水病を発病したアユ人工種苗とし、3基の720L水槽に200尾ずつ収容した。クエン酸ナトリウム処理区として、クエン酸三ナトリウムを0.5mMとなるよう飼育水に添加し、供試魚を止水条件で5日間浸漬した（1日1回換水）。その他に加温処理区（29℃で3日間）及び無処理区を設定し、30日間の累積へい死率の推移を調べた。

また、へい死魚の保菌状況を調べるため、腎臓から改変サイトファーガ寒天培地を用いて18℃で菌分離を行うと共に、鰓からDNA抽出キット（シグマ・アルドリッチ社製）を用いてDNAを抽出し、これを鋳型としたPCRを行った。冷水病菌は前述のプライマー（fpPPIC-F及びfpPPIC-R）を使用し、それに加えてエロモナス属細菌を検出できるプライマーAerom-Fa：5'-AGCGGCAGCGGAAAGTAGCTTGC及びAerom-Ra：5'-GCTAGCTTGCAGCCCTCTGTACGC⁴⁾でエロモナス属細菌の検出を行った。

3) 冷水病耐性を獲得したアユ種苗作製技術の確立

1次ワクチン液の調製 冷水病菌由来コラゲナーゼ遺伝子を既報の方法⁵⁾に従って、枯草菌発現系を用いて産生した。当該溶液を地下水で20倍希釈した溶液を1次ワクチン液とした。

2次ワクチン液の調製 冷水病菌SG-1株（NBRC111643）培養液を250mLの1/2CGY培地（バクトカシトン0.5%、ゼラチン0.3%、酵母エキス0.1%）にて18℃で3日間培養し、3,000×gで15分間遠心することで、冷水病菌の菌体を回収した。菌体に対して6mLの0.5%ラウリル硫酸ナトリウム溶液及び6mLのBenzonase®ヌクレアーゼを添加して24℃で16時間インキュベートした後、終濃度0.1%となるようホルマリンを添加し、5時間インキュベートした。この溶液をMCY寒天培地に接種して冷水病菌が生育しないことを確認した後、地下水2L及び消泡剤KM-72（信越化学）を適量添加し、2次ワクチン液とした。

平均体重1.5gの海産種苗100尾を供試魚とし、蒸気式ボイラーを用いて24℃で1日馴致し、加温処理（29℃×3日間）した。ワクチン区として50尾を1次ワクチン液に30分浸漬し、引き続いて2次ワクチン液に30分間浸漬した（1回目）。1回目のワクチン処理から2週間後に、再び同様のワクチン処理を行った（2回目）。その後、対照区の供試魚50尾とともに、屋根付きの屋外2.5tコンクリート水槽にて給餌率表に従い給餌飼育した。

2回目のワクチン処理から3週間又は5週間後に、冷水病菌SG-1株培養液を1/2CGY培地で4倍希釈し、50μL（=2.5×10⁶CFU）を対照区及びワクチン区の供試魚の腹腔内に接種した。その後、各区50尾を25尾ずつ2つに分けてFRP水槽（水量約176L）に収容し、15日間の累積へい死率の推移を調べた。

3 結果及び考察

1) アユ種苗の健全性診断技術の確立

(1) 冷水病菌高感度検出技術の開発

プライマーfpPPIC-F及びfpPPIC-Rを使用したPCRでは、鋳型10⁴分子以上で検出することができた。一方、nestedリアルタイムPCRでは鋳型10⁴以上で増幅曲線が確認できた（図1）。nestedリアルタイムPCRの検出感度は前者のPCRに比べて、約1,000倍高かったことから、冷水病菌を高感度に検出する手法の一つとして考えられた。

(2) アユの集団としての健全性を診断する技術の確立

冷水病を自然発病した集団は、高い日間へい死率を示す蔓延期から、低い日間へい死率を示す慢性的感染期を経て、冷水病を再発する再発期に移行した（図2）。

アユ血中においては、蔓延直後から抗冷水病菌

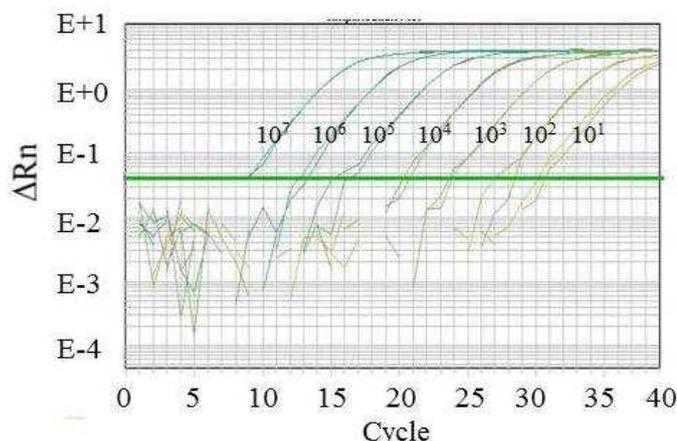


図1 nestedリアルタイムPCRによる増幅曲線

抗体の産生が認められるものの、その個体差は極めて大きく、ほとんど抗体を産生していない個体も認められた(図3)。9月2日の個体で抗体が産生されているにもかかわらず、9月8日以降日間へい死率が上昇したことから、抗体が産生されていない個体の存在により冷水病の再発が引き起こされている可能性が高い。

血清グロブリン量は7.56から35.6mg/mlの間を推移した。未発症期からまん延期の6月10日にかけて増減が認められなかったが、6月10日から7月1日にかけて上昇した(t検定 $p < 0.05$)。その後、7月から9月2日及び9月19日の再発期にかけて低下(t検定 $p < 0.05$, $p < 0.01$)した(図4)。また、血清グロブリン量が20mg/ml以上の割合を示す健全率は、6月10日のまん延期及び9月19日の再発期に30%以下となり、発病時に低水準となった。血清グロブリン量が低下する機構については不明であるが、血清グロブリンは液性免疫に大きく関与していることを考えると、発病期にかけて免疫力が低下していることが示唆された。今回、未発症時から6月のまん延期にかけて血清グロブリン量の低下が確認できなかったため精査が必要であるが、血清グロブリン量は種苗の集団としての健全性を評価する際の指標として利用できる可能性が示唆された。

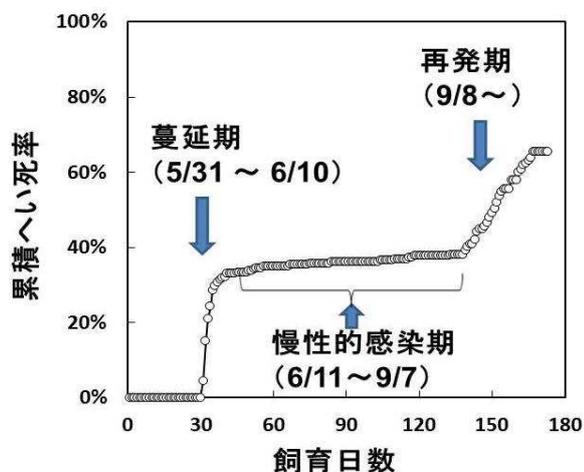


図2 冷水病自然発病群における累積へい死の推移

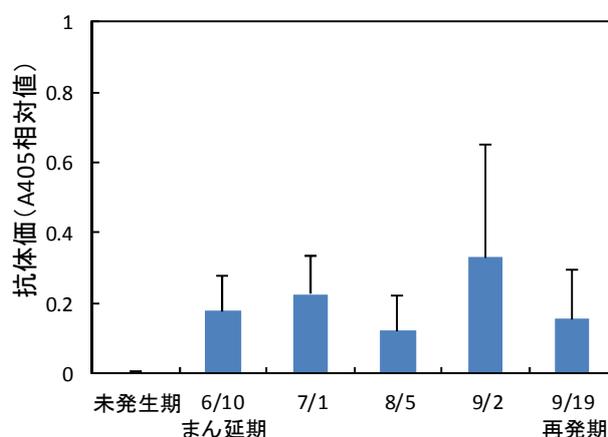


図3 血中抗体価の推移
エラーバーは標準偏差を示す

2) 冷水病菌の除菌技術の確立

無処理区は10日後37%がへい死し、30日後の累積へい死率は38%だった。クエン酸処理区は10日後のへい死率が24%に留まり、30日後の累積へい死率は27%と無処理区と比べやや低かったが、有意差は認められなかった(X^2 検定, $p > 0.05$)。

一方、加温処理区は開始から10日後のへい死率が11%、30日後の累積へい死率は12%で、無処理区と比べ有意に低かった(X^2 検定, $p < 0.01$) (図5)。加温処理は現状において最も効率的な冷水病対策手法である。ただし、加温処理を実際の養殖場で実施するためにはボイラー設備が必要であることから、使用できる条件・状況は限定される。

予備的な試験において、冷水病菌は0.5mM以上のクエン酸濃度下では、増殖できないことが確認されている。このことから、実際の養殖池においてもクエン酸添加により、冷水病によるへい死を抑制することができると考えられる。なお、健康なアユを用いてクエン酸添加による悪影響を調べたところ、1mM以下の濃度では1日後のへい死は確認されなかった。

また、いずれの試験区においても、冷水病が終息した後に、日間へい死率の低い慢性的なへい死が継続した。この時期のへい死魚の腎臓からは冷水病菌を分離できず、日和見感染菌のエロモナス属細菌が優先して分離され

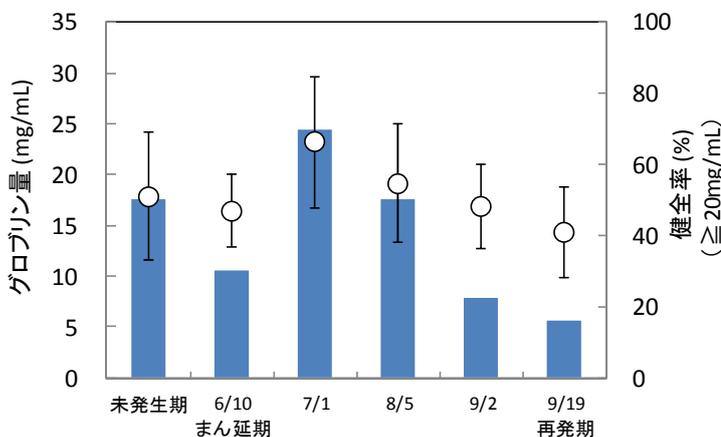


図4 血清グロブリン量の推移
白点…血清グロブリン量の平均値(左軸)。エラーバーは標準偏差を示す。
棒グラフ…健全率(右軸)。

た。一方、へい死魚の鰓は冷水病の特徴的な病変である貧血症状を呈し、冷水病菌及びエロモナス属細菌が高い確率で検出された。これらのことから、冷水病耐過集団であっても冷水病菌が残存し続け、何らかの悪影響を及ぼしている可能性がある。

3) 冷水病耐性を獲得したアユ種苗作製技術の確立

ワクチン処理から3週間後に冷水病を接種した場合、ワクチン区及び対照区の累積へい死率はそれぞれ

34%, 68%であり、有効率は50%であった(図6a)。また、ワクチン処理から5週間後に冷水病菌を接種した場合、ワクチン区及び対照区の累積へい死率はそれぞれ14%, 44%であり、有効率は68.2%であった(図6b)。ワクチン区は3週間後菌接種と5週間後菌接種ともに、対照区に比べて有意に累積へい死率が低いことが認められた(χ^2 検定, $p < 0.01$)。このことから、浸漬法によるワクチンとしては高い効果が認められ、その効果はワクチン処理から5週間を経過した方が高かった。

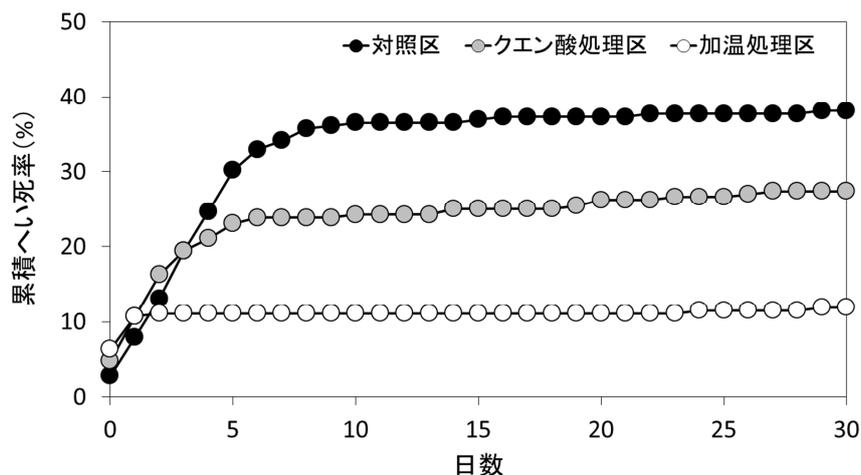


図5 クエン酸ナトリウム試験における累積へい死率の推移

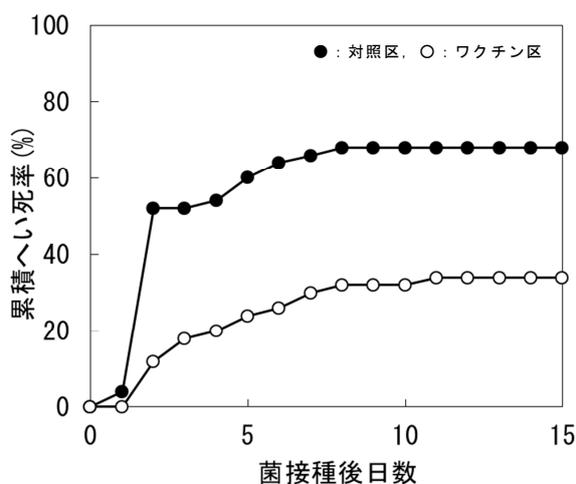


図6a ワクチン処理3週間後に冷水病菌接種後のへい死率

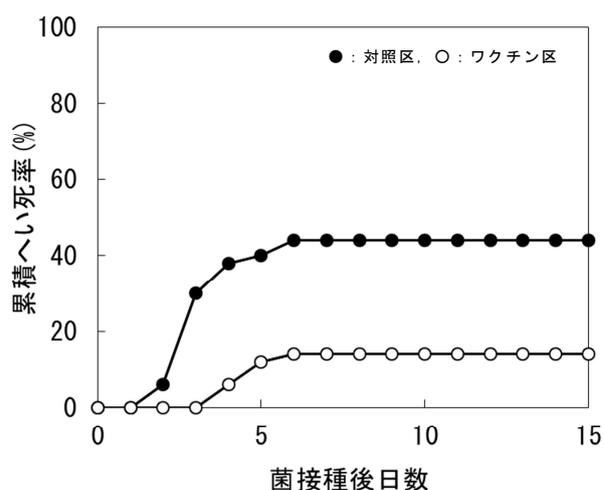


図6b ワクチン処理5週間後に冷水病菌接種後のへい死率

4 文 献

- 1) 吉浦ら (2006) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C 遺伝子を標的としたPCRによる *Flavobacterium psychrophilum* の判別と遺伝子型. 魚病研究, 41, 67-71.
- 2) Shibutani M. *et al.* (2015) The pretreatment albumin to globulin ratio predicts chemotherapeutic outcomes in patients with unresectable metastatic colorectal cancer. *BMC cancer*, 15, 347.
- 3) 佐野聡哉 (2009) アユ冷水病ワクチン開発研究 - プロテアーゼに注目して. 平成21年度滋賀県水産試験場事業報告, 74.
- 4) Rahman M. *et al.* (2005) PCR-RFLP analysis for identification of *Aeromonas* isolates collected from diseased fish and aquatic animals. *Fish Pathology*, 40, 151-159.
- 5) 中山仁志 (2014) アユ冷水病菌由来毒素を応用した新規トキシイドワクチンの開発. 平成26年度和歌山県水産試験場事業報告, 61-63