

アユのビブリオ病に対する耐病性の系統間差異

福 永 剛
(内水面研究所)

Varying levels of Resistance to Vibriosis in Ayu (*Plecogullosus altivelis*)
based on genealogy

Takeshi FUKUNAGA
(Freshwater Laboratory)

ビブリオ病は、アユ養殖業において短期間に大量へい死を起こす重大な疾病である。その対策として、オキソリン酸投与による薬剤療法やワクチンによる予防法が用いられている。しかし、これらの治療法や予防法にも限界があり、ビブリオ病に対して耐病性のある品種の作出が望まれている。そこで、本報では在来海産アユ、耐病選抜アユ、奄美産リュウキュウアユおよび海産アユとリュウキュウアユとの交雑種など数系統を用いて、ビブリオ病人為感染による生残率、ワクチン接種後の血中抗体価および補体価などの耐病形質を測定した。その結果、耐病選抜群と無選抜群との間に差異が認められ、耐病性品種作出の可能性がみられたので報告する。

材料および方法

供試菌

試験には血清型Aの *Vibrio anguillarum* P T-479株(以下、P T-479株と略記)を用いた。また、病原性を保持するため、感染試験に用いる前に2回の魚体通過を行った。

供試系統

試験は'94年および'95年の2カ年にわたって行い、表1に示したように有明海産アユ、奄美産リュウキュウアユ、クローンアユ(和歌山系)など14系統を用いた。この中で、耐病選抜群は選抜の有効性の検討、海産アユ

表1 試験に用いたアユ系統

年	系 統 名	略 号	N	体長 (cm)	体重 (g)
1994	海産2代目	F ₂	29	13.4±0.7	22.0±4.2
	海産7代目	F ₇	30	12.5±0.9	23.5±5.4
	1回耐病選抜海産2代目	F ₂ S 1	29	13.4±0.8	20.2±4.6
	1回耐病選抜海産7代目	F ₇ S 1	24	13.6±0.8	27.0±6.3
	海産1代目×リュウキュウ1代目(交雑1代目)	H y F ₁	50	12.6±0.8	20.6±3.0
	リュウキュウ2代目	R F ₂	16	7.5±0.5	3.1±0.7
	クローン	C L	31	10.6±0.5	11.5±0.7
1995	海産3代目	F ₃	30	12.7±0.9	18.5±4.9
	海産8代目	F ₈	24	13.3±1.0	17.7±3.2
	2回耐病選抜海産3代目	F ₃ S 2	29	13.0±0.8	20.8±4.0
	2回耐病選抜海産8代目	F ₈ S 2	30	14.6±0.5	26.4±5.6
	海産1代目×リュウキュウ1代目(交雑2代目)	H y F ₂	30	13.2±2.8	20.5±5.3
	リュウキュウ3代目	R F ₃	20	12.4±0.5	16.2±2.0
	クローン	C L	20	13.5±0.5	21.4±2.6

とリュウキュウアユとの交雑種は、交雑による耐病性の向上、無選抜の海産アユおよびリュウキュウアユは、その対照を目的として用いた。'94年の選抜群は1回選抜したもの、'95年の選抜群は同群を再度選抜したものである。さらに、クローンは遺伝形質の評価基準として用いた。尚、以下系統名は表1に示すよう略記する。

耐病選抜

耐病選抜は、'94年、'94年の2回、下記の方法で行った。海産アユ500~1000尾を 10^4 CFU/mlレベルの濃度に調整したPT-479株菌液(1%食塩水中)100lに5分間浸漬したのち、生残率が一定(10~50%)となるまで1tFRP水槽で流水飼育をして行った。生残魚の次代を選抜群として試験に供した。

人為感染試験

人為感染試験は、各供試魚40尾を、PT-479株の菌濃度を 10^4 CFU/mlレベルに調整した菌液に5分間浸漬した後、60l水槽で流水飼育して行った。へい死魚はその都度取り上げ、細菌分離を行い、供試菌による弊死であることを確認した。試験期間は14日間とした。

血中抗体価

ワクチン処理は、各供試魚30~50尾の腹腔内にPT-479株のホルマリン死菌(FKC;1mg/cc PBS)を供試魚のサイズによって0.05ml、または0.1ml接種して行った。処理後の供試魚は30日間給餌飼育を行った後、背大動脈から採血を行った。血清は採取した血液を凝固させた後、遠心分離して得、実験に供するまで-80℃に保存した。抗体価の測定は、マイクロタイター法によって行った。

補体価

補体価(ACH50値)は、各系統30~50尾について、矢野ら¹⁻²⁾の方法に準じて、ウサギ赤血球に対する血清の溶血活性を測定して行った。測定には予め200倍に希釈したアユ血清を用いた。

系統間差の検定

系統間の差異を検出するために、感染試験の結果はカイ二乗検定で、抗体価および補体価はt検定で解析を行った。

結 果

人為感染試験

'94年に行った感染試験のうち耐病選抜群(F₂S₁, F₇S₁), 対照群(F₂, F₇)およびクローン(CL)の結果を図1に示した。F₇S₁はへい死が緩やかで13日後

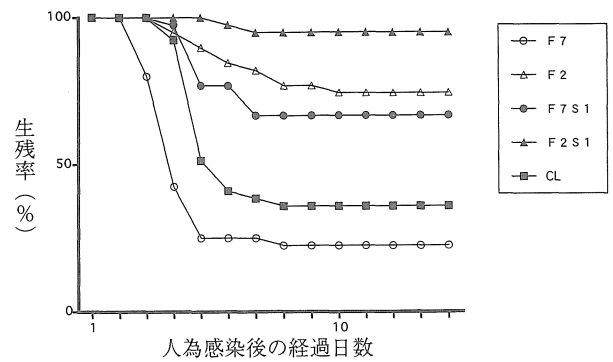


図1 耐病選抜群、対照群およびクローンにおける人為感染後の生残率変化(1994)

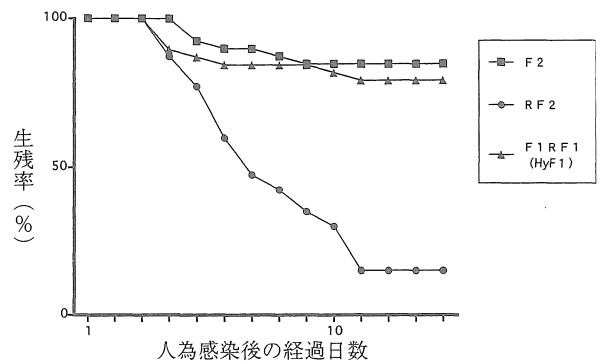


図2 海産アユ、リュウキュウアユおよび交雑群における人為感染後の生残率変化(1994)

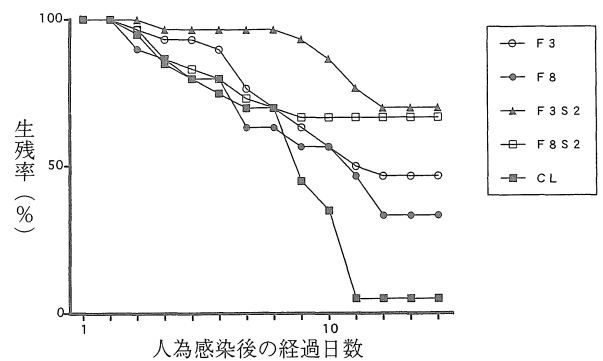


図3 耐病選抜群、対照群およびクローンにおける人為感染後の生残率変化(1995)

の生残率が67%であったのに対して、F₇では23%と低い値を示した。また、F₂S₁についてもほとんどへい死が見られず、14日後の生残率が95%であった。これに対してF₂では74%とやや低い値を示した。さらに、CLの生残率は、35%と低かった。

F₂, RF₂および交雑種であるHyF₁の人為感染後

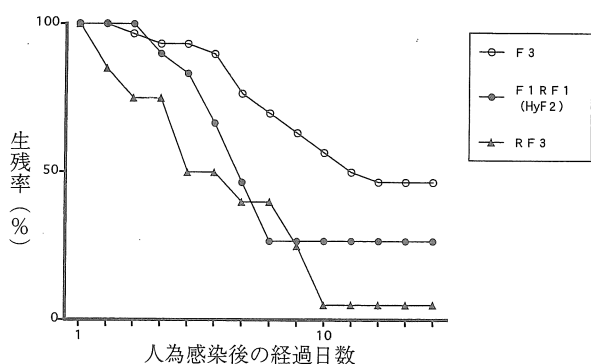


図4 海産アユ、リュウキュウアユおよび交雑群における人為感染後の生残率変化 (1994)

のへい死状況を図2に示した。F₂とHyF₁はほぼ同様の傾向を示し、へい死が緩やかで14日後の生残率は、両者とも80%前後であった。これに対してRF₂はへい死が急激で、生残率は15%であった。

'95年に行った感染試験のうち耐病選抜群 (F₃S₂, F₈S₂)、対照群 (F₃, F) およびクローン (CL) の結果を図3に示した。生残率はF₈S₂で74%, F₃S₂で72%, F₃で50%, F₃で37%となり、選抜群が対照群より生残率が高いという点では94年と同様の傾向を示したが、94年ほど大きな差は認められなかった。さらに、CLの生残率は5%と著しく低かった。

F₃, RF₃および交雑種であるHyF₂の人為感染後

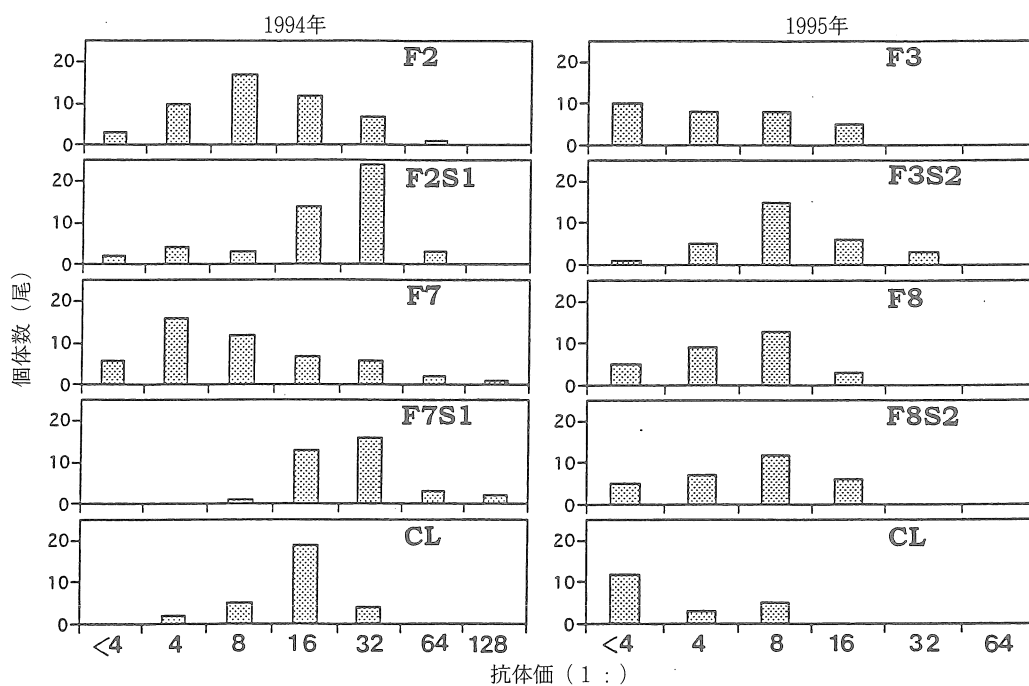


図5 耐病選抜群、対照群およびクローンにおける血中抗体価の個体変異

のへい死状況を図4に示した。生残率はF₃で47%, HyF₂で23%, RF₃で5%となり、'94年と同様、交雑種の値が両原品種の中間的値となった。

血中抗体価

'94年と'95年の耐病選抜群、対照群およびクローンの血中抗体価の個体変異を図5に示した。すなわち'94年の結果ではF₂は抗体価が8から16に多かったのに対してF₂S₁は16から32に多かった。同様にF₇が4から8に多かったのに対してF₇S₁は16から32に多く、中には128と、高い値を示す個体もみられた。CLは16を示す個体が63%を示し、比較的変異幅が狭かった。また、

95年の結果ではF₃S₂に32を示す個体があり、分布もF₃より高めであったが、F₃とF₈S₂はほぼ同様の分布を示した。

さらに、交雑種および原品種の抗体価の分布を図6に示した。'94年の結果ではHyF₁が16および32に多く分布していたのに対して原品種のF₂では8を中心とする分布を示し、交雑種がややまさっていたが、'95年の結果では差は認められなかった。

補体価

表2に各系統の補体価を、また図7に各系統の補体価の個体変異を示した。すなわち、94年の結果はF₂では

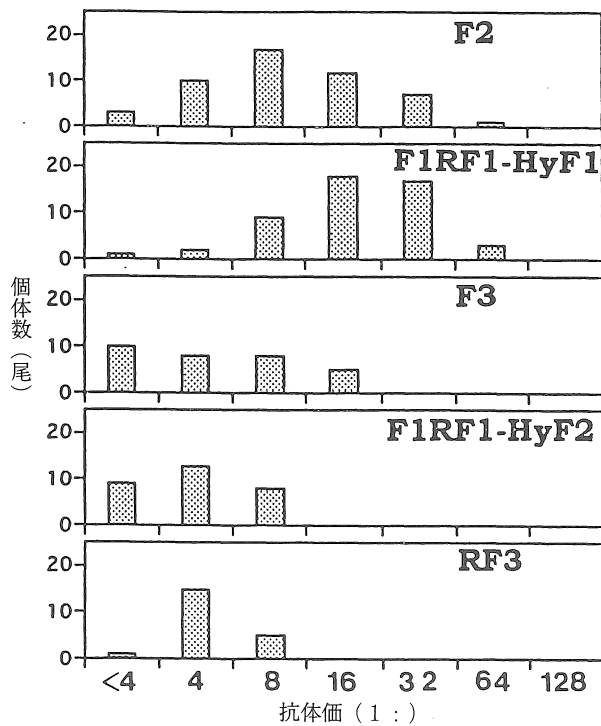


図6 海産アユ、リュウキュウアユおよび交雑群における血中抗体価の個体変異 (1994, 1995)

補体価が平均185であったのに対してF₂S 1は281と高い値を示した。しかし、F₇は300であったのに対してF₇は240とやや低い傾向が認められた。CLは180となった。

'95年の結果では、F₃で250、F₃S 2で294、F₈では176、F₈S 2では250と、いずれも選抜群の方が高い値を示した。CLは206であった。

系統間差の検定

本報で行った耐病形質の測定値を検定した結果を表3

表2 各系統における補体価

系 統 名	A C H 50	変動係数
F ₂	184.8±55.2	0.30
F ₇	300.7±46.5	0.15
1994年		
F ₂ S 1	281.1±74.5	0.27
F ₇ S 1	238.7±47.7	0.20
H y F ₁	254.0±64.6	0.25
C L	179.8±39.3	0.22
1995年		
F ₃	250.1±58.3	0.23
F ₈	175.5±51.8	0.30
F ₃ S 2	594.5±63.1	0.21
F ₈ S 2	249.8±105.8	0.42
H y F ₂	274.9±73.1	0.27
R F ₃	180.0±50.5	0.28
C L	206.3±72.7	0.35

表3 アユ各系統間の耐病性の差異

	系統差	X ² 検査値
生 残 率	F ₂ < F ₂ S 1	P<0.005
	F ₇ < F ₇ S 1	P<0.001
	F ₃ < F ₃ S 2	P<0.05
	F ₈ < F ₈ S 2	P<0.01
	F ₂ > H y F ₁	P>0.05
	F ₃ > H y F ₁	
	R F ₂ < H y F ₂	P<0.001
	R F ₃ < H y F ₂	P<0.001
	系統差	t 検査値
血中抗体価	F ₂ < F ₂ S 1	P<0.0005
	F ₇ < F ₇ S 1	P<0.005
	F ₃ < F ₃ S 2	P<0.005
	F ₈ < F ₈ S 2	P>0.05
	F ₂ > H y F ₁	P>0.05
	F ₃ > H y F ₂	P>0.05
	R F ₃ > H y F ₂	P>0.05
補 体 率	F ₂ < F ₂ S 1	P<0.005
	F ₇ > F ₇ S 1	P<0.005
	F ₃ < F ₃ S 2	P<0.05
	F ₈ < F ₈ S 2	P<0.005
	F ₂ < H y F ₁	P<0.0055
	F ₃ < H y F ₂	P>0.05
	R F ₃ < H y F ₂	P<0.005

に示した。人為感染試験では選抜群は対照と比較して有意に生残率が高く、選抜の効果は認められた。しかし、交雑群は原品種であるリュウキュウアユよりは生残率が高いが、海産アユとの差が認められなかった。このように継代数によっていくぶん差があるものの、耐病選抜群と対照群では生残率に差が認められた。また、交雑種と原品種である海産アユとの間に生残率の差は認められなかったが、リュウキュウアユは交雑種より有意に生残率が低かった

抗体価では選抜群は対照群に比較すると4組の組み合わせのうち3組が選抜群の方が有意に抗体価が高いという結果となった。また、交雑群と対照群とに抗体価の有意な差は認められなかった。さらに、補体価ではF₇S 1よりF₇が高いという結果を除いて選抜群の補体価が有意に高いという結果となった。また、'94年の結果では交雑群が海産アユより有意に高いという結果であったが'95年には明らかな差が検出できなかった。

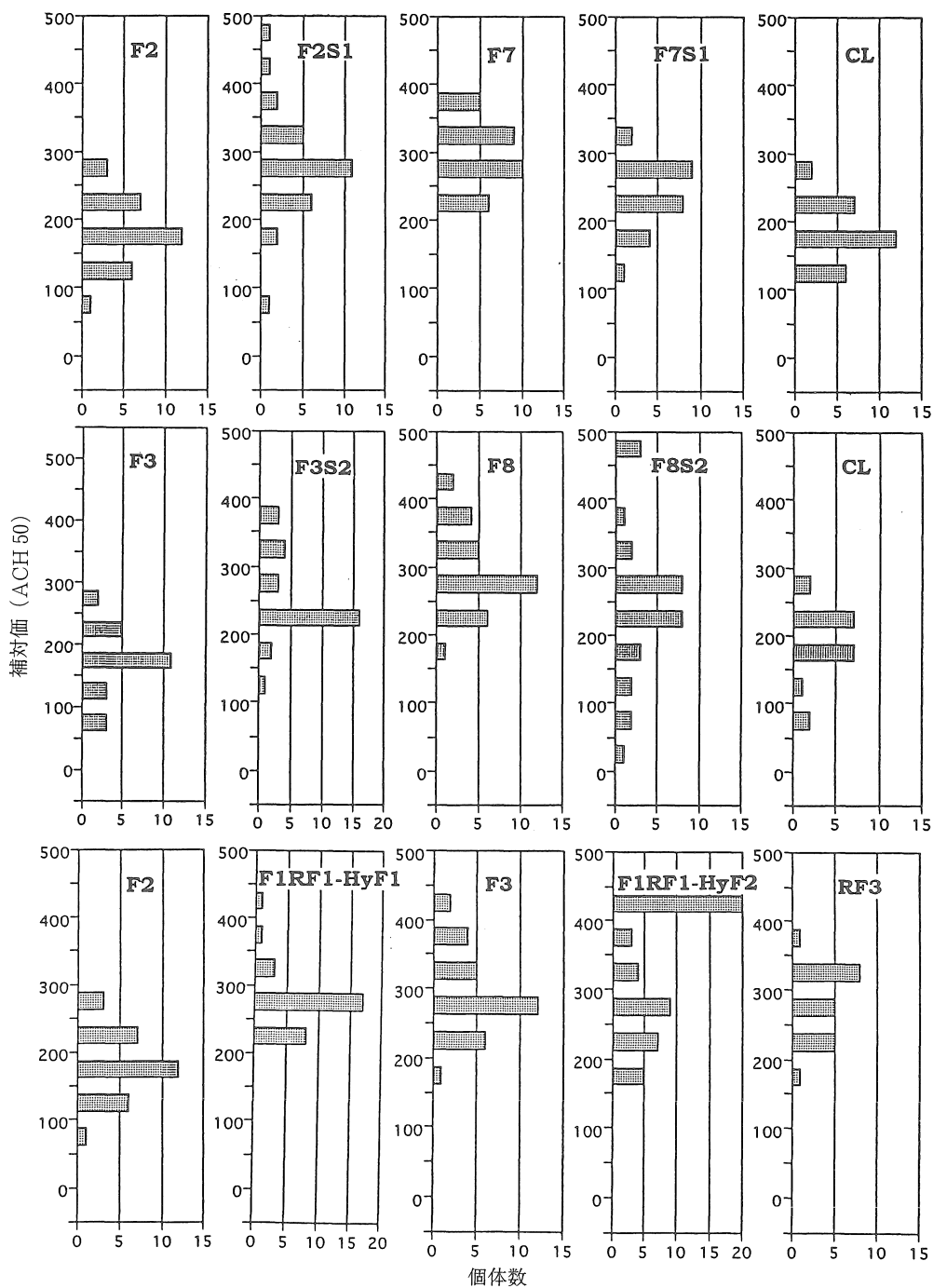


図7 アユ各系統における補体価の個体変異 (1994, 1995)

考 察

今回の試験では、アユの各系統の耐病形質の差異を調べるために、人為感染試験、抗体価および補体価の測定を行った。このうち人為感染試験は総合的な耐病性を表わし、抗体は感染後数週間後に得られる特異的な生体防御能を、第2経路による補体活性は感染初期に細菌の細胞壁に傷害を与えて殺菌するなど、病原体の種類を選ばな

い非特異的な生体防御能を示している³⁾。また、補体は前述の働き以外に貪食細胞の活性化、抗体の産生など免疫機能の要となっている⁴⁾。今回の試験で'94年に前年度耐病選抜を行ったF₇および海産F₂の次代魚についての抗ピブリオ病形質を検討したところ、海産F₇S1の補体価が対照と比較してやや低かったものの、人為感染後の生残率、血中抗体価、補体価の測定結果から、両者とも概ね対照群と比較して高かったことから、耐病性にお

いて優れていると考えられた。'94年に2回目の選抜を行った群および対照群について'95年に補体価を測定したところ、ほぼ同様の傾向が認められた。このことから、耐病選抜を繰り返すことによって、耐病性に優れた群を作出できる可能性を示していると考えられた。また、リュウキュウアユのように人為感染試験での生残率が低い系統は補体価も低かったことから、補体価は耐病性を検討する上で重要な要素であると考えられる。さらに、選抜群において補体価も高い値を示したことは、非特異的生体防御が優れていることを示しており、ビブリオ病以外の疾病に対しても抵抗性が高い可能性もあり興味深い。しかし、本報で検討した耐病形質のうち抗体価についてはクローンの個体変異が比較的狭くなっていたことから遺伝形質であると考えられる。しかし、補体価の変動係数は、'94年で0.22、'95年で0.35（表2）と他の系統より高い場合が多く、クローンでの測定結果を見る限り、遺伝形質とは考えにくく、一時的な体調を示したものと

も考えられる。今後は実験手法に改良を加えるとともに、他の耐病性因子について検討を加え、それらを総合して、耐病性の評価を行う必要がある。

文 献

- 1) T. Yano : Assays of Hemolytic complement Activity, in "Techniques in Fish Immunology", SOS Publication, 1992, pp. 131-141.
- 2) T. Yano, K. Fujiki, M. Nakao and H. Matsuyama : Characteristic of the alternative complement pathway in fish serum. Fish Pathol., 23, 213-217(1988).
- 3) G. A. Ingram : 魚類の感染症に対する自然抵抗性に関連する物質-総説-(2) (北尾忠利), メディアサークル, 28 (5), 22-28.
- 4) 近藤元治 : 補体学入門. 第1版, 南江堂, 東京, 1981.