

アユの冷水病に対するワクチンの予防効果－Ⅳ

宇野悦央, 堀木暢人

目 的

アユの冷水病は全国的に蔓延し、アユ漁業に大きな影響を与えており、¹⁾ その抜本的な対策としてアユの冷水病不活化ワクチンの開発が急務である。冷水病の予防効果が認められているワクチンとしては、植物性オイルアジュバントを添加した冷水病不活化ワクチンによる腹腔内接種法があるが、²⁾ アジュバントの残留性³⁾ が懸念されている。また、接種に多大な労力を要することから実用面での問題がある。そこで、浸漬法による効果が前報⁴⁾ で示唆されていることから、前処理後に冷水病不活化ワクチンに浸漬した場合の冷水病予防効果について検討した。前処理法としては、濃塩水浴および免疫賦活剤の併用をとりあげた。なお、本試験は、国庫補助事業である先端技術等地域実用化研究促進事業として実施したものである。

材料および方法

試験期間 平成14年6月4日～9月5日（予備飼育：6月4日～10日）

供試魚 当研究所で生産した5.6gサイズの5代目無選抜人工産アユを7日間予備飼育し、6.3gまで育成したものを100尾/区用いた。

試験区 表1に示したように試験区を5区設定した。2区の免疫賦活剤+ワクチン浴区では、免疫

表 1 試験区と内容

試験区	内 容
1	5%濃塩水に5分間浸漬直後、10倍希釈ワクチン液に5分間浸漬（以下5%塩水+ワクチン浴区と称す）
2	免疫賦活剤投与期間中（連続投与8日目）に、10倍希釈ワクチン液に5分間浸漬（以下免疫賦活剤+ワクチン浴区と称す）
3	ISA763Aのアジュバント添加ワクチンを50 μ L/尾腹腔内接種（以下アジュバント添加ワクチン接種区と称す）
4	10倍希釈ワクチン液に5分間浸漬（以下ワクチン浴区と称す）
5	ワクチン無処理対照区（以下無処理対照区と称す）

賦活剤として市販のペプチドグリカン混合飼料を用い、7日間連続投与の翌日にワクチン浴を行い、その後3日投与4日休みを45日間繰り返す。その後は他の試験区と同様に飼育した。混合飼料にはビフィズス菌粉末が混合されており、ペプチドグリカンとして0.2mg/kg・魚体重/日投与した。

飼育条件 飼育池は屋外のコンクリート水槽（3×2×0.5m、水深0.33m、水量約2.0m³）で、十分通気を行った。用水は河川伏流水で、換水率はⅠ、Ⅱ期0.2回/時、Ⅲ期0.5～0.7回/時とした。

水温はⅠ期 15.3～17.6℃（平均 16.4℃）、Ⅱ期 16.0～18.5℃（平均 17.1℃）、Ⅲ期 16.6～20.3℃（平均 18.3℃）であった。飼料は市販のアユ用配合飼料を用い、自動給餌機により 4 回/日与えた。

ワクチンの種類および投与方法 供試ワクチンは、冷水病菌 F P C 840 株⁵⁾を用いて共立製薬株式会社つくば中央研究所が作製したアユ冷水病不活化ワクチンロット 1 とアユ冷水病アジュバント混合不活化ワクチンロット 1 で、6 月 18 日に投与した。不活化ホルマリン濃度は 0.3V/V% で、不活化前生菌数はいずれも 6.0×10^8 CFU/mL である。アジュバント混合ワクチンは、重量比でワクチン 3 容と植物性オイルアジュバント ISA763A 7 容を攪拌機で混合したものである。ワクチンの接種は腹鰭前方の腹腔内にエッペンピペット 4780 を用いて 1 尾あたり 0.05mL 接種した。ワクチン浴区では、ワクチン原液 0.5L を飼育水で 10 倍希釈した使用ワクチン液 5 L を調整し、各ワクチン浴区の供試魚を一度に 5 分間通気しながら浸漬した。浸漬中の水温は約 17.5℃ で、魚に異常はみられなかった。対照区ではワクチン液の代わりに飼育水を用いて 5 分間同様に浸漬した。試験区と同様に供試魚に異常はみられなかった。

人為感染方法 排菌添加法または筋肉内接種法により人為感染を行った。排菌添加法は免疫後 2 週目に、筋肉内接種法は免疫後 44 日目、79 日目に用いた。排菌添加法は同居感染水槽（115L の F R P 製）からビニールホースで排水を試験水槽（90L アクリル製）に添加することにより行った。添加水中の冷水病菌数は試験開始後 8 日目から 15 日目まで $1.0 \times 10^3 \sim 2.0 \times 10^3$ CFU/mL であった。なお、菌数は 10 倍段階希釈による培養法で計数し、8、11、15 日目の 3 回測定した。換水率は排水を 0.12 回/時、新水を 0.3 回/時の計 0.46 回/時とした。排水添加は試験開始後 8 日目から 19 日目まで行い、その後は新水のみ注水とした。同居感染水槽には、平均 36g の同居感染病魚を -80℃ で凍結保存しておいたものを試験開始時、2 日目、4 日目に 10 尾ずつ収容し、免疫後 2 週目の供試魚を人為感染させた。換水率は 0.5 回/時とした。筋肉内接種は、平成 4 年に本県の養殖アユ病魚から分離された冷水病菌 92 F 1-0423 株を用いて、改変サイトファガ寒天培地を用いて 18℃ で 24 時間培養を 3 回繰り返した後、滅菌 P B S (-) の希釈により、1 mL 当り 6.2×10^9 CFU または 1.2×10^{10} CFU の菌液を調整し、さらに滅菌 P B S (-) で 10 倍段階希釈して所定の菌液を得た。このように調整された各菌液を、免疫後 44、79 日目の供試魚に 0.35 × 18 mm マルコー注射針付きツベルクリン注射器を用いて背鰭後端と測線の間筋肉内に 0.05mL ずつ接種し、その後 2 週間観察した。

結 果

飼育結果を表 2 に示した。いずれの試験区とも取り扱いによる事故以外に死亡はなかったが、アジュバント添加ワクチン接種区では接種後 6 日目から 9 日目まで摂餌が極端に低下したためにⅠ期の成長が劣った。摂餌不良要因としては、ワクチンの腹腔内接種に伴う魚体への悪影響等が考えられる。また、人為感染後の腹腔内には表 3 に示したように免疫後 37～48 日目の魚体にアジュバントの残留が 33.3% の割合で認められ、今後、検査尾数を増加して残留性の検討がさらに必要である。

免疫後 2 週目の人為感染結果を表 4、5 および図 1 に示した。死亡の始まりはアジュバント添加ワクチン区以外では排菌添加後 11 日目までで、無処理対照区では 10 日目であったのに対し、アジュ

表2 飼育結果

試験期間	試験区	開始時 尾数	平均体重		生残率 (%)	飼料効率 (%)	日間成長 率(%)
			開始時	終了時			
I期 (6/18~7/2) 15日間	5%塩水浴+ワクチン浴区	100	8.7	10.8	100	85.0	1.54
	免疫賦活剤+ワクチン浴区	100	8.6	10.9	100	85.8	1.68
	アジュバント添加ワクチン接種区	100	8.1	9.0	100	56.6	0.75
	ワクチン浴区	100	8.2	10.5	100	88.8	1.76
	無処理対照区	100	8.5	10.6	100	81.1	1.57
II期 (7/3~8/1) 30日間	5%塩水浴+ワクチン浴区	75	10.8	17.6	100	95.7	1.60
	免疫賦活剤+ワクチン浴区	74	10.8	17.7	100	93.1	1.61
	アジュバント添加ワクチン接種区	75	8.9	14.8	100	102.3	1.65
	ワクチン浴区	75	10.4	16.9	100	96.1	1.59
	無処理対照区	75	10.5	17.2	100	98.0	1.60
III期 (8/2~9/5) 35日間	5%塩水浴+ワクチン浴区	24	15.4	32.5	100	132.3	2.38
	免疫賦活剤+ワクチン浴区	24	16.5	32.9	100	127.4	2.22
	アジュバント添加ワクチン接種区	24	12.3	30.8	100	143.5	2.87
	ワクチン浴区	25	18.0	34.4	100	132.3	2.09
	無処理対照区	25	16.2	32.0	100	127.4	2.19

表3 ワクチン接種区におけるアジュバント残留率

免疫後の日数	検査尾数	残留尾数	残留率(%)
37~48	15	5	33.3
47~62	35	0	0.0
93	16	0	0.0

表4 排菌添加法による死亡状況(免疫後2週目)

試験 区分	供試 尾数	経過日数										計														
		0	5	10	15	20	25	30	32																	
同居感染源	100		1	2	5	8	8	4	4	3	8	2	3	2	3	1	1	1	1	1	57					
排菌感染*																										
5%塩水浴+ ワクチン浴区	25														3	2	1	1	2	2	11					
免疫賦活剤+ ワクチン浴区	25														1	3	4	1	2	2	1	14				
アジュバント添加 ワクチン接種区	24																				1	1	1	1	5	
ワクチン浴区	25														1	1	3				1	2	1	9		
無処理対照区	25																				3	2	2	1	1	10

*：試験開始後8日目に供試魚を収容し、19日目に排菌添加を終了した。

水温：同居感染水槽14.0~17.0℃(平均15.6℃)

：排菌感染水槽14.3~17.5℃(平均15.6℃)

表5 排菌添加法による人為感染結果(免疫後2週目)

試験区分	供試尾数	死亡尾数	死亡率 (%)	有効率 (%)	有意差 ^{1*}
同居感染源	100	57(53)	57(53)	—	—
排菌感染					
5%塩水浴+ワクチン浴区	25	11(7) ^{*2}	44(28)	-10(12.5)	NS(NS)
免疫賦活剤+ワクチン浴区	25	14(11)	56(44)	-40(-37.5)	NS(NS)
アジュバント添加ワクチン接種区	24	5(1)	20.8(4)	48(87.5)	NS(P<0.05)
ワクチン浴区	25	9(5)	36(20)	10(37.5)	NS(NS)
無処理対照区	25	10(9)	40(36)	—(-)	—(-)

*1: Fisherの直接確立計算法

*2: 排菌添加開始後16日目の値

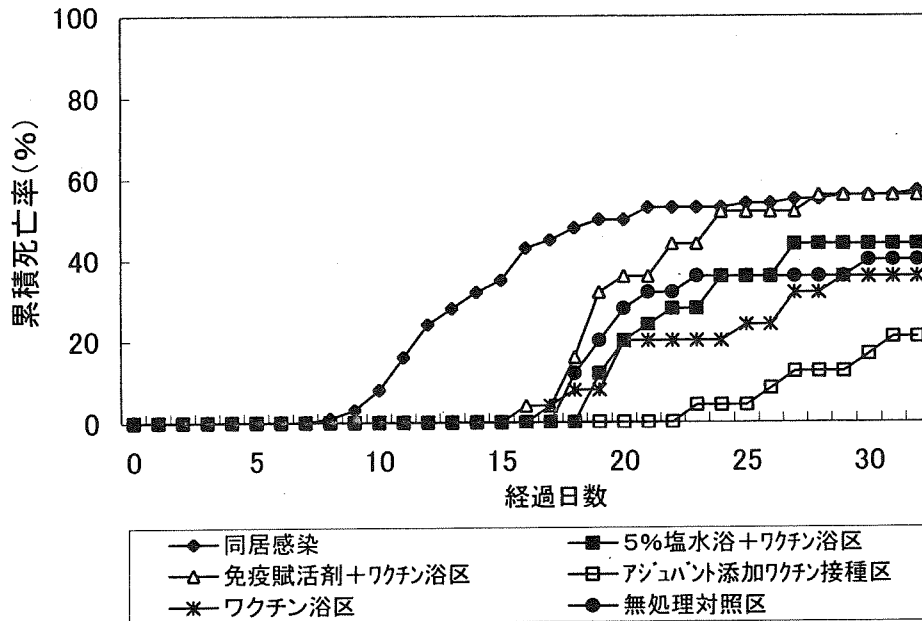


図1 冷水病ワクチンの排菌感染による効果判定
免疫後2週目

バント添加ワクチン接種区では15日目と遅延効果がみられた。死亡率は同居感染源で57%と低かったために対照区の死亡率も40%と低くなり、効果の判定が難しくなった。しかし、無処理対照区の死亡が落ち着き始めた排菌添加後15日目の率でみると、アジュバント添加ワクチン区の死亡率は4%であり、対照区の36%と比較して有意(P<0.05)に低い値を示した。また、前処理を行わなかったワクチン浴区も、有意差はないものの20%と低い傾向を示した。

免疫後44日目の人為感染結果は表6に示したように、高濃度区、低濃度区ともにアジュバント接種ワクチン区で死亡率が低い傾向がみられたが有意差は認められなかった。免疫後79日目の人為感染結果は表7に示したように、無処理対照区の死亡率が36%と低かったうえに、死亡率の差異も認められなかった。

表6 接種法による人為感染結果(免疫後44日目)

接種菌量 (CFU/尾)	試験 区分	供試* 尾数	経過日数														死亡率 計 (%)	有意差	RPS (%)	RPS60 (%)	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13					14
3.1×10 ⁷	5%塩水浴+ ワクチン浴区	24			1	18	1		1								21	87.5	NS	-15.1	-38.9
	免疫賦活剤+ ワクチン浴区	24			1	21											22	91.7	NS	-20.6	-52.8
	アジュバント添加 ワクチン接種区	25			2	11		1									14	56.0	NS	26.3	13.3
	ワクチン浴区	23				14	2	1									17	73.9	NS	2.7	-15.9
	無処理対照区	25				10	5	2		1	1						19	76.0	-	-	-
	5%塩水浴+ ワクチン浴区	25					6	9	2								17	68.0	P<0.001	-308.0	-
3.1×10 ⁶	免疫賦活剤+ ワクチン浴区	25				5	3	2								10	40.0	NS	-140.0	-	
	アジュバント添加 ワクチン接種区	25				1				1						2	8.0	NS	52.0	-	
	ワクチン浴区	25					2	1	1			2		1		7	28.0	NS	-68.0	-	
	無処理対照区	24						3		1						4	16.7	-	-	-	
	5%塩水浴+ ワクチン浴区	25														4	16.7	-	-	-	

* 冷水病以外の死亡を除いた尾数

水温：15.6~17.5℃(平均16.5℃)

RPS=(1-試験区の冷水病による死亡率/対照区の冷水病による死亡率)×100

表7 接種法による人為感染結果(免疫後79日目)

接種菌量 (CFU/尾)	試験 区分	供試* 尾数	経過日数														死亡率 計 (%)	有意差	RPS (%)
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
3.0×10 ⁸	5%塩水浴+ワクチン浴区	23					3	1	1	2						7	30.4	NS	15.5
	免疫賦活剤+ワクチン浴区	23					2	3	1				1			7	30.4	NS	15.5
	アジュバント添加ワクチン接種区	24					2	4	1		1					8	33.3	NS	7.4
	ワクチン浴区	25					1	5	1		1			1		9	36.0	NS	0.0
	無処理対照区	25					2	3	2	1	1					9	36.0	-	-

* 冷水病以外の死亡を除いた尾数

水温：17.5~18.5℃(平均17.9℃)

考 察

摂餌や成長などの飼育状況から、前処理の有無に関わらず浸漬法によるアユ冷水病不活化ワクチン処理は安全であると考えられた。一方、アジュバント添加ワクチンの接種は摂餌に悪影響を及ぼしている可能性があるうえにアジュバントの残留が認められたことから安全面からの検討がさらに必要であると考えられた。

前処理後に冷水病不活化ワクチンに浸漬した場合の冷水病予防効果については、濃塩水浴または免疫賦活剤の投与による前処理効果は認められず、かえって前処理しない方がよい傾向がみられた。今後、浸漬法の開発に当たっては、アジュバントとの併用等抗原の取り込みを増加させる方法について

後、浸漬法の開発に当たっては、アジュバントとの併用等抗原の取り込みを増加させる方法についてさらに検討する必要があると思われる。また、陽性対照区として設けたアジュバント添加ワクチン接種区は想定していた程の効果は認められなかったが、対照区の死亡率が低かったこともあり適切な感染濃度での検討が必要であると考えられる。

文 献

- 1) 井上 潔. アユの冷水病. 海洋と生物.2000 ; 22 : 35-38.
- 2) Rahman,M.H.,M.Ototake,Y.Iida,Y.Yokomizo and T.Nakanishi. Efficacy of oil-adjuvanted Vaccine for coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*.*Fish Pathology* 2000;35:199-203.
- 3) 宇野悦央. アユのシュードモナス病・冷水病アジュバント混合不活化ワクチンの予防効果. 平成12年度和歌山県農林水産総合技術センター内水面漁業センター事業報告.2002 ; 26 : 21-25.
- 4) 宇野悦央, 堀木暢人. アユの冷水病に対するワクチンの予防効果－Ⅲ. 平成13年度和歌山県農林水産総合技術センター内水面漁業センター事業報告.2003 ; 27 : 45-48.
- 5) Wakabayashi,H.,Toyama and T.Iida. A Study on Serotyping of *Cytophaga psychrophila* Isolated from Fishes in Japan.*Fish Pathology* 1994;29;101-104.