

# アユのシュードモナス病および冷水病に対する2価ワクチンの予防効果—Ⅲ

宇野悦央, 堀木暢人

## 目 的

本県においてアユの冷水病は1992年以降多発しており, 多大な被害を及ぼし問題となっている。<sup>1, 2)</sup> さらに, シュードモナス病(細菌性出血性腹水病<sup>2)</sup>)も1994年以降は冷水病に次いで発生が多いうえに,<sup>1) 3)</sup> 本疾病原因菌に対する薬剤感受性が低いことから被害量も多く,<sup>4)</sup> これらの疾病に対するワクチンの開発が強く求められている。このため, 混合比を変えたアユのシュードモナス病と冷水病の2種混合アジュバント添加試作ワクチンの腹腔接種による安全性および有効性について検討した。なお, 本試験は社団法人日本水産資源保護協会の委託事業である水産用医薬品調査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10日～10月18日

**供試魚** 当所で種苗生産した5.8gサイズの5代目無選抜アユを6日間予備飼育し, 約7gに成長した供試魚を各試験区250尾ずつ用いた。

**試験区** 次に示す4種類のワクチンを腹腔内接種する試験区を4区と陰性対照区を設定した。

- 1区 冷水病不活化抗原とシュードモナス病不活化抗原の混合比が9:1の2種混合試作ワクチン区 (以下F:P=9:1区と称す)
- 2区 冷水病不活化抗原とシュードモナス病不活化抗原の混合比が19:1の2種混合試作ワクチン区 (以下F:P=19:1区と称す)
- 3区 陰性対照区(以下対照区と称す)
- 4区 冷水病不活化抗原のみの陽性対照区 (以下F単独区と称す)
- 5区 シュードモナス病不活化抗原のみの陽性対照区 (以下P単独区と称す)

**飼育条件** 飼育池は5×2×0.5m(水深0.33m, 水量3.3m<sup>3</sup>)で, 十分通気を行った。用水は河川伏流水で, 換水率は0.3～0.7回/時とした。飼料は市販のアユ用配合飼料を用い, 自動給餌器により魚体重の2%程度を1日当たり4回に分けて与えた。

**ワクチンの種類および投与方法** 供試不活化抗原および供試ワクチンは, シュードモナス病菌FPC941株と冷水病菌FPC840株を用いて株式会社共立製薬株式会社つくば中央研究所により作製されたアユシュードモナス病不活化抗原ロット4, アユ冷水病不活化抗原ロット1およびアユ冷水病アジュバント混合ワクチンロット1である。不活化ホルマリン濃度はシュードモナス病不活化抗原が0.8V/V%, 冷水病不活化抗原およびアユ冷水病アジュバント混合ワクチンが0.3V/V%で, 不活化前生菌数はシュードモナス病不活化抗原が $1.5 \times 10^{10}$  CFU/mL, 冷水病不活化抗原およびアユ

冷水病アジュバント混合ワクチンが $6.0 \times 10^8$  CFU/mLである。アジュバントは独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所から分与された植物性オイルアジュバントのISA763Aを用いた。試作ワクチンは、抗原液を重量比で3容とアジュバント7容を攪拌機または連結針により乳化させたものである。なお、F:P = 9:1区と、F:P = 19:1区の2種混合抗原液はそれぞれの抗原液を容量比で9:1および19:1の割合で混合した。ワクチンの投与は平成14年6月10日に行い、腹鰭基部前方の腹腔内にエッペンピペット4780を用いて0.05mLずつ接種した。陰性対照区には生理食塩水を同様に接種した。

**人為感染方法** 人為感染はワクチン投与後4, 8, 12週目, 115日目および116日目に行った。シュードモナス病人為感染用菌株はワクチン作製株と同じFPC941株で、ハートインフュージョン寒天培地を用いて25℃で24時間培養した $10^9$  CFU/mLの菌液をPBS(-)で希釈し、所定の濃度とした。冷水病人為感染用菌株は平成4年に本県の養殖アユ病魚から分離された冷水病菌92F1-0423株で、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、改変サイトファガブイヨンの希釈により、1 mL当り $10^{10}$  CFUの菌液を得、これを改変サイトファガブイヨンで希釈して所定の菌液を調整した。このように調整された各菌液を、免疫後の供試魚に、冷水病菌はツベルクリン注射器により背鰭後端と側線の間筋肉内に、シュードモナス病菌はエッペンピペット4780により腹腔内にそれぞれ0.05mLずつ接種し、その後2週間観察した。観察期間中の水温は表1に示したとおりであった。なお、免疫後12週目の冷水病人為感染試験時に冷却装置の故障があり、所定の水温より1℃程度高くなった。

表 1 人為感染後の水温状況

感染区分	免疫後経過	水温(℃)
冷水病	4週目	13.7~15.2(14.6)*
	8週目	15.8~17.8(16.9)
	12週目	17.6~18.5(18.0)
	115日目	16.2~17.0(16.6)
シュードモナス病	4週目	17.3~19.2(18.4)
	8週目	17.9~19.4(18.5)
	12週目	18.1~19.2(18.6)
	116日目	18.0~19.5(18.8)

\* 平均値

### 結果および考察

飼育状況を表2に示した。F:P = 9:1区でワクチン接種後6日目から10日目まで水カビ病による死亡魚がみられ、20%の死亡率となった。またF単独区でも水カビ病による死亡が3尾みられた。その他の試験区ではほとんど死亡はなく良好であった。水カビ病が発生した原因としては、ワクチン接種に手間取ったことによる魚体のスレが考えられる。また、人為感染時の供試魚の腹腔内には表3に示したようにアジュバントの残留が目視で確認できた。いずれのワクチン区とも免疫後70日目ま

でアジュバントの残留があり、なかでも、P単独区で残留率が高く、免疫後130日目まで認められ、食品衛生面からも検討する必要がある。

表2 飼育状況

期間	水温 (°C)	試験 区分	開始時 尾数	平均体重(g)		成長 倍率	死亡 尾数	死亡率 (%)
				開始時	終了時			
1~ 28日目	15.2~19.4 (16.5)*	F:P=9:1区	250	7.1	10.8	1.52	50	20.0
		F:P=19:1区	250	7.0	10.9	1.56	0	0.0
		対照区	250	7.0	11.0	1.57	1	0.4
		F単独区	250	6.8	10.8	1.59	3	1.2
		P単独区	250	6.9	10.9	1.58	1	0.4
29~ 64日目	15.4~16.7 (16.0)	F:P=9:1区	100	10.7	17.3	1.62	0	0.0
		F:P=19:1区	125	11.0	18.4	1.67	0	0.0
		対照区	148	11.2	17.9	1.60	0	0.0
		F単独区	197	11.0	16.6	1.51	0	0.0
		P単独区	199	10.7	16.9	1.58	0	0.0
65~ 96日目	15.8~18.8 (17.7)	F:P=19:1区	25	16.0	36.7	2.29	0	0.0
		対照区	48	16.9	33.4	1.98	0	0.0
		F単独区	147	16.9	28.2	1.67	0	0.0
		P単独区	149	16.8	28.5	1.70	0	0.0
97~ 116日目	18.1~19.3 (18.5)	F単独区	97	28.1	39.8	1.42	0	0.0
		P単独区	99	27.3	40.2	1.47	0	0.0

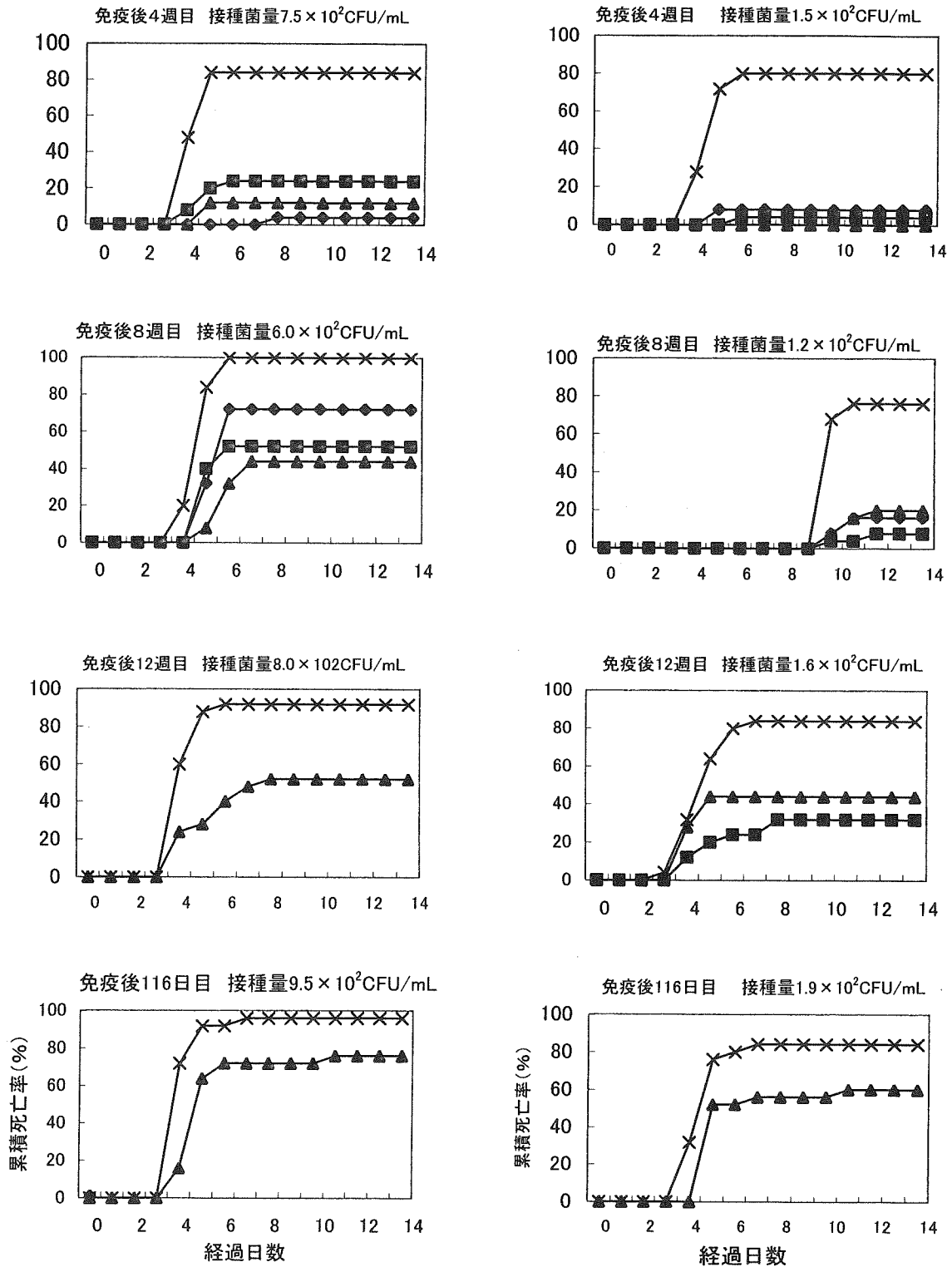
\* 平均値

表3 アジュバント残留率

試験区	免疫後の日数	検査尾数	残留尾数	残留率(%)	備考*
F : P = 9 : 1	31~42	49	3	6	冷水攻撃
	29~42	49	8	16	シュート攻撃
	59~70	50	1	2	冷水攻撃
	61~70	50	1	2	シュート攻撃
F : P = 19 : 1	29~42	50	3	6	冷水攻撃
	29~42	73	4	5	シュート攻撃
	59~70	47	0	0	冷水攻撃
	61~70	50	2	4	シュート攻撃
	98	16	2	13	//
F 単独	31~42	44	2	5	冷水攻撃
	59~70	36	1	3	//
	100	26	1	4	//
	129	25	0	0	//
P 単独	33~42	50	46	92	シュート攻撃
	61~70	50	21	42	//
	98	26	6	23	//
	130	13	1	8	//

\* 攻撃時の死亡魚および生残魚で検査したが、98日目以降は成熟度が高くなったため生残魚のみの値とした。

シュードモナス病人為感染結果を図1に、シュードモナス病に対する有効性を表4に示した。免疫後4週目ではいずれの攻撃濃度においても、F:P=9:1区、F:P=19:1区およびP単独区で高い有効率(70%以上)が得られた。8週目においても攻撃濃度にかかわらず有効性が認められ、特に低濃度では、いずれの試験区とも高い有効率(70%以上)が得られた。さらに12週目でも、F:P=19:1区およびP単独区で8週目より有効率が低下しているものの効果が認められた。116日目ではさらに有効率が低下しているが、P単独区のRPS60は76.9%であり効果が認められた。



◆ F : P = 9 : 1 区    ■ F : P = 19 : 1 区    ▲ P 単独区    × 対照区

図1 シュードモナス病人為感染後の死亡状況

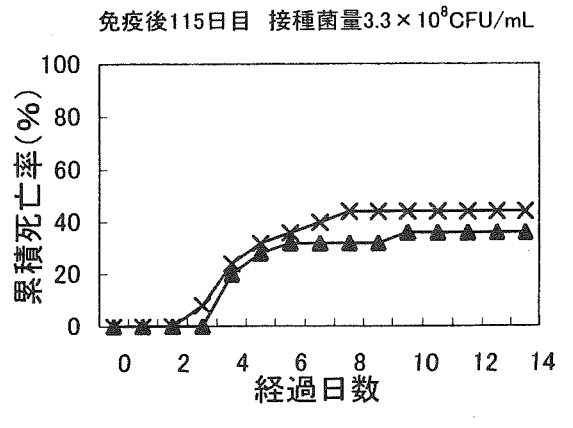
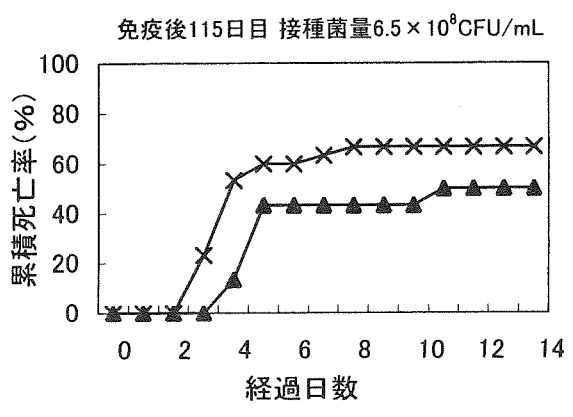
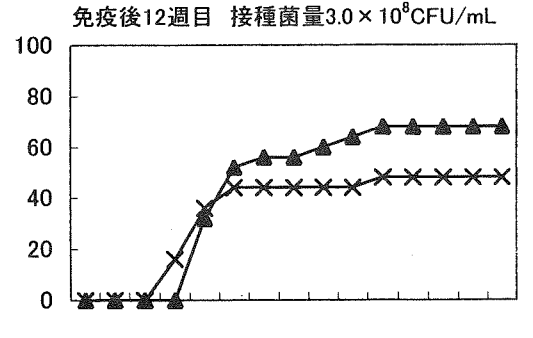
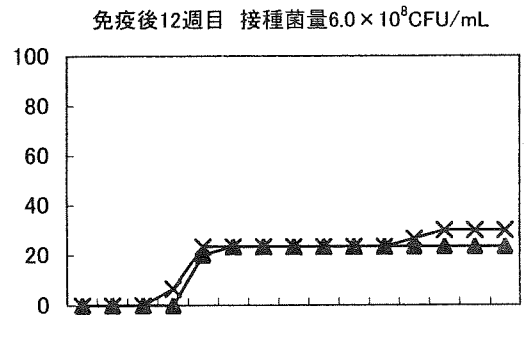
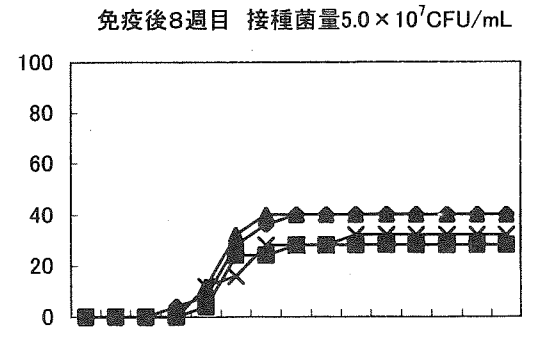
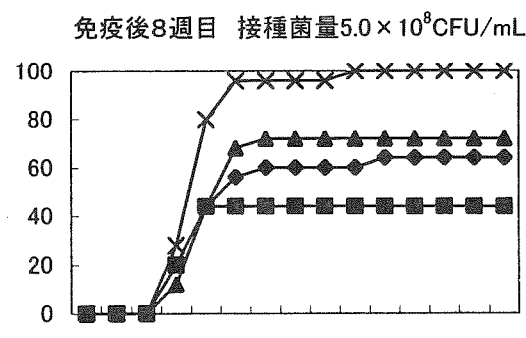
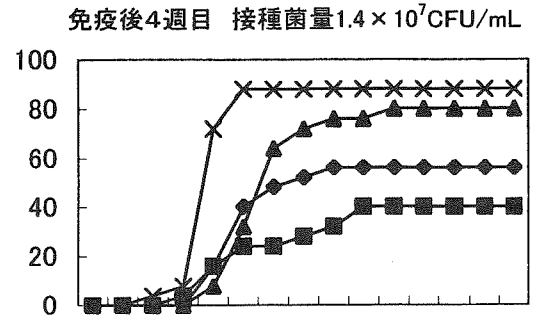
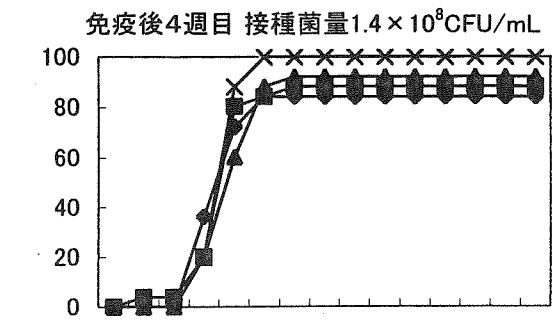
表4 免疫後のシュード・モナス病に対する有効性

試験区	F:P=9:1	F:P=19:1	対照	P単独	F:P=9:1	F:P=19:1	対照	P単独
免疫後経過	4週目				4週目			
攻撃濃度	7.5×10 <sup>2</sup> CFU/尾				1.5×10 <sup>2</sup> CFU/尾			
シュード・モナス病死亡率(%)	4.2	25.0	84.0	12.0	8.3	4.0	80.0	0.0
RPS (%)	95.0	70.2	—	85.7	89.6	95.0	—	100.0
有意差	P<0.001	P<0.001	—	P<0.001	P<0.001	P<0.001	—	P<0.001
RPS60用死亡率	0	20.8	84	12	4.2	0.0	72.0	0.0
RPS60 (%)	100	75.2	—	85.7	94.2	100.0	—	100.0
有意差	P<0.001	P<0.001	—	P<0.001	P<0.001	P<0.001	—	P<0.001
免疫後経過	8週目				8週目			
攻撃濃度	6.0×10 <sup>2</sup> CFU/尾				1.2×10 <sup>2</sup> CFU/尾			
シュード・モナス病死亡率(%)	72	52	100	44	16.7	8	76	20
RPS (%)	28.0	48.0	—	56.0	78.1	89.5	—	73.7
有意差	P<0.05	P<0.001	—	P<0.001	P<0.001	P<0.001	—	P<0.001
RPS60用死亡率	32	40	84	8	8.0	4	68	8
RPS60 (%)	61.9	52.4	—	90.5	88.2	94.1	—	88.2
有意差	P<0.001	P<0.001	—	P<0.001	P<0.001	P<0.001	—	P<0.001
免疫後経過	12週目				12週目			
攻撃濃度	8.0×10 <sup>2</sup> CFU/尾				1.6×10 <sup>2</sup> CFU/尾			
シュード・モナス病死亡率(%)	92	52	—	—	33.3	87.5	—	44
RPS (%)	—	43.5	—	—	61.9	—	—	49.7
有意差	—	—	—	P<0.01	P<0.001	—	—	P<0.01
RPS60用死亡率	60	24	—	—	20.8	66.7	—	44
RPS60 (%)	—	60.0	—	—	68.8	—	—	34.0
有意差	—	—	—	P<0.01	P<0.01	—	—	NS
免疫後経過	116日目				116日目			
攻撃濃度	9.5×10 <sup>2</sup> CFU/尾				1.9×10 <sup>2</sup> CFU/尾			
シュード・モナス病死亡率(%)	96	79.2	—	—	84	65.2	—	—
RPS (%)	—	17.5	—	—	—	22.4	—	—
有意差	—	—	—	NS	—	—	—	NS
RPS60用死亡率	72	16.7	—	—	76	56.5	—	—
RPS60 (%)	—	76.9	—	—	—	25.6	—	—
有意差	—	—	—	P<0.001	—	—	—	NS

\* 有意差検定はFisherの直接確立計算法による

冷水病人為感染結果を図2に、冷水病に対する有効性を表5に示した。免疫後4週目では、低濃度攻撃のF:P=9:1区とF:P=19:1区で効果がみられ、F単独区でも有意差は低いものの(P<0.05)、RPS60は55.6%を示した。8週目では低濃度攻撃で、いずれの試験区とも有効性が認められるが、F単独区では有意差が低かった(P<0.05)。12週目では接種濃度に対応した死亡率が得られず、信頼できる結果とならなかった。その原因としては、接種魚体の大きさが30gサイズと大きかったために細い注射針(直径0.35mm)が曲がりやすく、接種量が一定とならなかったことがあげられる。また、飼育水温が所定より1℃強高かったことも影響していると思われる。115日目には注射針の径を0.45mmと太くすることにより接種濃度が十分得られたためか濃度に応じた死亡率が得られ、しかも、F単独区のRPS60が72.8%とやや有効性が認められた。

このように、混合比を変えたアユのシュードモナス病と冷水病の2種混合アジュバント添加試作ワクチンの安全性および有効性について試験したところ、ワクチンを接種した後に水カビ病の発生した試験区があること並びに腹腔内にアジュバントの残留が認められたことから安全性について検討する必要がある。次に、有効性についてはシュードモナス病に対し免疫後12週目まで高い有効率を示すが、冷水病に対してはシュードモナス病程ではなく、冷水病菌の抗原量を多くする等により冷水病に対する有効性の向上を図る必要がある。



◆ F : P = 9 : 1 区    ■ F : P = 19 : 1 区    ▲ F 单独区    × 对照区

図2 冷水病人為感染後の死亡状況

表5 免疫後の冷水病に対する有効性

試験区	F:P=9:1	F:P=19:1	対照	F単独	F:P=9:1	F:P=19:1	対照	F単独
免疫後経過	4週目				4週目			
攻撃濃度	1.4×10 <sup>8</sup> CFU/尾				1.4×10 <sup>7</sup> CFU/尾			
冷水病死亡率(%)	84	88	100	92	56	40	88	80
RPS (%)	16	12	—	8	36.4	54.5	—	9.1
有意差	NS	NS	—	NS	P<0.05	P<0.01	—	NS
RPS60用死亡率	72	80	88	60	16	16	72	32
RPS60 (%)	18.2	9.1	—	31.8	77.8	77.8	—	55.6
有意差	NS	NS	—	NS	P<0.01	P<0.01	—	P<0.05
免疫後経過	8週目				8週目			
攻撃濃度	5.0×10 <sup>8</sup> CFU/尾				5.0×10 <sup>7</sup> CFU/尾			
冷水病死亡率(%)	64	45.8	100	72	40	28	32	40
RPS (%)	36	54.2	—	28	-25.0	12.5	—	-25.0
有意差	P<0.01	P<0.001	—	P<0.05	NS	NS	—	NS
RPS60用死亡尾数	11	11	20	11	—	—	—	—
RPS60用死亡率	44	44	80	44	—	—	—	—
RPS60 (%)	45	45	—	45	—	—	—	—
有意差	P<0.05	P<0.05	—	P<0.05	—	—	—	—
免疫後経過	12週目				12週目			
攻撃濃度	6.0×10 <sup>8</sup> CFU/尾				3.0×10 <sup>8</sup> CFU/尾			
冷水病死亡率(%)	38.5				28			
RPS (%)	—				27.2			
有意差	—				NS			
免疫後経過	115日目				115日目			
攻撃濃度	6.5×10 <sup>8</sup> CFU/尾				3.3×10 <sup>8</sup> CFU/尾			
冷水病死亡率(%)	80				56.5			
RPS (%)	—				29.3			
有意差	—				NS			
RPS60用死亡率	64				17.4			
RPS60 (%)	—				72.8			
有意差	—				P<0.01			

\* 有意差検定はFisherの直接確立計算法による

## 文 献

- 1) 宇野悦央, 辻村明夫, 見奈美輝彦 (1996): 養殖アユの1985~1994年における疾病発生状況, 平成7年度和歌山県内水面漁業センター事業報告, 21, 19-24.
- 2) 堀木暢人, 宇野悦央 (2003): 魚類防疫体制推進整備対策, 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, 27, 37-41.
- 3) 若林久嗣, 沢田健蔵, 二宮浩司, 西森栄太 (1996): シュードモナス属細菌によるアユの細菌性出血性腹水病, 魚病研究, 31(4), 239-240.
- 4) 宇野悦央, 奥山芳生, 加藤邦彰 (2000): 養殖水産動物保健安全対策, 平成10年度和歌山県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, 24, 21-27.
- 5) 宇野悦央, 加藤邦彰, 見奈美輝彦 (1999): 養殖水産動物保健安全対策, 平成9年度和歌山県内水面漁業センター事業報告, 23, 11-15.