

アユの冷水病に対するワクチンの予防効果—Ⅲ

宇野悦央, 堀木暢人

目 的

アジュバント添加冷水病不活化ワクチンは腹腔内接種により効果が認められているが,¹⁾アジュバントの残留性²⁾や接種に多大な労力を要すること等の問題がある。そこで、これらの問題点を解決する方法として10倍希釈ワクチン液30分間浸漬法および100倍希釈ワクチン液3時間浸漬法をとりあげ、冷水病の予防効果について検討した。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

飼育期間 平成13年7月18日～9月13日

(Ⅰ期：7月18日～8月15日, Ⅱ期：8月16日～9月13日)

供試魚 当センターで種苗生産した4代目無選抜アユを各試験区200尾ずつ用いた。平均体重は10倍希釈ワクチン区で13.0g, 100倍希釈ワクチン区13.2g, 対照区13.3gであった。

飼育条件 飼育池は3×2×0.5m(水深0.33m, 水量約2.0m³)で、十分通気を行った。飼育用水は河川伏流水で、換水率はⅠ期0.2～0.5回/時, Ⅱ期0.5～0.7回/時とした。水温はⅠ期17.5～21.0℃(平均19.3℃), Ⅱ期18.3～19.5℃(平均18.9℃)であった。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、平成4年4月に養殖アユ病魚から分離された冷水病菌92F1-0423株を用いて当センターが作製したアユ冷水病不活化ワクチンであり、平成13年7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 2.3×10^7 CFU/mLであり、投与時まで4℃で保存した。菌液は、改変サイトファガ寒天培地で前培養したものを、さらに改変サイトファガブイヨンで18℃2日間培養することにより得た。ワクチンの投与は、10倍希釈ワクチン区では、ワクチン原液1.5Lを飼育水で10倍希釈した使用ワクチン液15Lを調整し、供試魚2.6kgを一度に30分間通気しながら浸漬した。浸漬後まもなく液がかなり泡立ち始めたが、供試魚に特に異常はみられなかった。浸漬中の水温は18.2℃であった。100倍希釈ワクチン区では、ワクチン原液0.2Lを飼育水で100倍希釈した使用ワクチン液20Lに、供試魚2.64kgを3時間通気しながら一度に浸漬した。浸漬約2時間後から液がかなり泡立ち始めたが、供試魚に特に異常はみられなかった。浸漬中の水温は17.4～17.7℃であった。対照区ではワクチン液の代わりに飼育水を用いて3時間同様に処理した。対照区においても浸漬約2時間後からかなり泡立ち始めたが、供試魚に特に異常はみられなかった。浸漬中の水温は18.2～18.3℃であった。

人為感染方法 筋肉内接種法および排菌添加法により人為感染を行った。接種法に用いた菌株はワクチン作成株と同じ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、滅菌PBS(-)の希釈により、1mL当り 1.5×10^9 CFUの菌液を調整し、さらに滅菌PBS(-)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菌液を、免疫後28日目の供試魚(平均体重約21g)にツベルクリン注射器を用いて背鰭後端と側線の間0.05mLずつ筋肉内接種し、その後2週間観察した。観察期間中の水温は15.6~17.3℃(平均16.3℃)であった。排菌添加法は同居感染水槽(115LのFRP製)からビニールチューブ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。同居感染水槽には、予め同居感染により得られた病魚を-80℃で凍結保存しておいたものを収容し、免疫後28日目の供試魚(平均体重約21g)および免疫後57日目の供試魚(平均体重約34g)を人為感染させた。その他の条件は表1に示した。

表1 排菌添加による感染方法

	免疫後28日目	免疫後57日目
同居感染水槽 供試魚 病魚	<ul style="list-style-type: none"> 人工産22g/尾、70尾 開始時、3、5日目に平均体重15gの人工産由来病魚を8尾ずつ収容 	<ul style="list-style-type: none"> 人工産29g/尾、70尾 開始時、3、5日目に平均体重20gの人工産由来病魚を10尾ずつ収容
換水率	<ul style="list-style-type: none"> 0.5回/時 	<ul style="list-style-type: none"> 0.5回/時
排菌添加水槽 換水率	<ul style="list-style-type: none"> 供試魚収容後9日目までは同居水槽からの排水0.25回/時と1次水0.3回/時で行い、その後は1次水0.3回/時のみ 	<ul style="list-style-type: none"> 供試魚収容後7日目までは同居水槽からの排水0.3回/時と1次水0.3回/時で行い、その後は1次水0.3回/時のみ

表2 飼育結果

試験区	I期			II期		
	10倍希釈 ワチン区	100倍希釈 ワチン区	対照区	10倍希釈 ワチン区	100倍希釈 ワチン区	対照区
開始時総重量(Kg)	2.60	2.64	2.66	2.28	2.33	2.41
" 尾数	200	200	200	110	110	109
" 平均体重(g)	13.0	13.2	13.3	20.7	21.2	22.1
終了時総重量(Kg)	4.11	4.21	4.21	3.72	3.70	3.65
" 尾数	200	200	199	110	110	109
" 平均体重(g)	20.6	21.1	21.2	33.8	33.6	33.5
死亡尾数	0	0	1	0	0	0
生残率(%)	100	100	99.5	100	100	100
給飼量(Kg)	1.68	1.68	1.68	1.41	1.41	1.41
増重量(Kg)	1.51	1.57	1.55	1.44	1.37	1.24
飼料効率(%)	89.9	93.5	92.3	102.1	97.2	87.9
日間給飼率(%)	1.73	1.69	1.69	1.68	1.67	1.66
日間成長率(%)	1.55	1.58	1.56	1.71	1.62	1.46
増重倍率	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.5
飼育日数	29	29	29	29	29	29

結 果

飼育結果を表2に示した。死亡は対照区で1尾のみであり、摂餌や成長も良好であった。免疫後28日目の人為感染結果を表3, 4に示した。接種法による死亡率は、高濃度区ではいずれのワクチン区とも90%以上であり、差はなかった。低濃度区では、終了時の死亡率に差はみられなかったが、対照区の死亡率が60%を越えた時点の有効率を示すRPS60は100倍希釈ワクチン区で68.4%を示し、Fisherの直接確立計算法により検定すると有意差(p<0.001)が認められた。一方、排菌添加法では、いずれの試験区も40%余りの死亡率であり、有意差はなかった。

免疫後57日目の同居水槽からの排菌による人為感染結果は表5, 6に示したとおりで、いずれの試験区も55%以上の死亡率であったが、試験区間に有意差は認められなかった。

表3 接種法による人為感染結果(免疫後28日目)

接種菌量 (CFU/尾)	試験 区分	供試 尾数	経 過 日 数														計	死亡率 (%)	RPS (%)	RPS60 (%)	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13					14
7.5×10 ⁷	10倍希釈区	30			3	14	10											27	90.0	3.6	-8.0
	100倍希釈区	30			2	10	12	2	1		1							28	93.3	0.0	4.0
	対照区	30			4	11	10	2								1		28	93.3	-	-
7.5×10 ⁶	10倍希釈区	30					1	12	4	1			1	1				20	66.7	9.1	31.6
	100倍希釈区	30					1	5	5	4	2						1	18	60.0	18.2	68.4
	対照区	30					5	14	3									22	73.3	-	-

水温：15.6~17.3℃(平均16.3℃)

R P S=(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4 排菌添加法による人為感染結果(免疫後28日目)

試験 区分	供試 尾数	経 過 日 数																												計	死亡率 (%)	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15 ^{*2}	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27			28
同居感染源 排菌感染	70						1			6	7	6	6	4	2	2		3					1	1			1				40	57.1
10倍希釈区	30								*1						1	2		5		2		1	1	1	1					14	46.7	
100倍希釈区	30								*1						1	2	3	1	2	2	1	1					1			14	46.7	
対照区	30								*1						1	2	3	2	2	1					1	1				13	43.3	

* 1 : 試験開始後6日目に供試魚収容

* 2 : 排菌停止

水温：同居感染水槽15.9~18.3℃ (平均16.9℃)

排菌添加水槽16.0~18.0℃ (平均16.8℃)

表5 排菌添加法による死亡状況(免疫後57日目)

試験 区分	供試 尾数	経過日数																											計	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14 ^{*2}	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26		27
同居感染源	70							1	5	3	6	6	5	6	7	4	5	5	1	2									1	57
排菌感染																														
10倍希釈区	30	-	-	-	-	-	-	-	1 [*]						1	3	2	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	17	
100倍希釈区	30	-	-	-	-	-	-	-	1 [*]						2	3	2	2	4	2		2	1	2					20	
対照区	30	-	-	-	-	-	-	-	1 [*]					2	2	2	3	3			1	2	1	2	1	2	1	19		

* 1 : 試験開始後7日目に供試魚収容

* 2 : 排菌停止

水温 : 同居感染水槽15.5~17.3℃ (平均16.5℃)

排菌添加水槽15.5~17.6℃ (平均16.4℃)

表6 同居感染水槽からの排菌による人為感染結果(免疫後57日目)

試験 区分	供試 尾数	死亡 尾数	死亡率 (%)	病因別死亡尾数			冷水病による 死亡率(%)
				冷水病	フヨウ病	その他	
同居感染源	70	57	81.4	52	4	1	80.0
排菌感染							
10倍希釈区	30	17	56.7	16	0	1	55.2
100倍希釈区	30	20	66.7	20	0	0	66.7
対照区	30	19	63.3	17	1	1	60.7

考 察

飼育結果から摂餌や成長は良好であり、本試験に用いた浸漬法によるアユ冷水病不活化ワクチンは安全であると考えられた。浸漬法による供試ワクチンの免疫効果については、10倍希釈ワクチン30分間浴では有効性が認められなかったが、100倍希釈ワクチン3時間浴で免疫後28日目に有効性が認められた人為感染区があることから、浸漬方法の改良、免疫賦活剤の併用等により免疫効果を促進させる方法についてさらに検討する必要がある。

文 献

- 1) 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 Pathol.* 2000; 35: 199-203.
- 2) 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.