

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—II

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。1, 2) 一方, シュードモナス病(細菌性出血性腹水病³⁾)も1994年以降冷水病に次いで発生が多い。えに, 1, 4) 薬剤に対し耐性であることから, 2) 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, 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腹腔内接種による安全性, 有効性および免疫発現時期について検討した。なお, 本試験は社団法人日本水産資源保護協会から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

飼育期間 試験Ⅰ:平成13年7月13日~8月10日

試験Ⅱ:平成13年7月23日~8月24日

供試魚 本県沿岸地先海面で採捕された海産稚アユを養成したもので, 試験Ⅰの平均体重はワクチン区11.0g, 対照区9.8g, 試験Ⅱはワクチン区11.7g, 対照区12.0gである。供試尾数は試験Ⅰで399尾ずつ, 試験Ⅱで300尾ずつとした。

飼育条件 飼育池は5×2×0.5m(水深0.33m, 水量3.3m³)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3回に分けて投与した。

ワクチンの種類および投与方法 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商事中央研究所により作製されたアユシュードモナス病・冷水病アジュバント混合不活化ワクチンLot. 1で, 平成13年7月13日と7月23日に投与した。不活化ホルマリン濃度はシュードモナス病不活化ワクチンが0.8v/v%, 冷水病不活化ワクチンが0.3v/v%で, 不活化前生菌数はシュードモナス病不活化ワクチンが 1.7×10^{10} CFU/mL, 冷水病不活化ワクチンが 6.1×10^8 CFU/mLである。試作ワクチンは, これら2種ワクチンの等量混合液を重量比で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り, 投与直前に連結針により再乳化させた。ワクチンの投与は, 腹鰭基部後方の腹腔内にエッペンピペット4780を用いて1尾当たり0.05mL接種した。投与された不活化菌数はシュードモナス病不活化ワクチンが 1.3×10^8 CFU/尾, 冷水病不活化ワクチンが 4.6×10^6 CFU/尾であり, 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3日目、1週目、2週目、4週目および32日目に次の方法で実施した。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 10^8 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、PBS(-)の希釈により、1mL当り 10^8 CFUまたは 10^9 CFUの菌液を得、これをPBS(-)で希釈して所定の菌液を調整した。このように調整した各菌液を、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の筋肉内に、シュードモナス病菌はエッペンピペット4780により腹鰭基部前方の腹腔内にそれぞれ0.05mLずつ接種し、その後2週間観察した。供試魚として、1週目から4週目までは試験Ⅰのアユを、3日目および32日目は試験Ⅱのものをそれぞれ用いた。人為感染後の水温は表1に示したとおりで、シュードモナス病感染群では18~19℃、冷水病感染群では16℃を基準に設定したが、冷水病人為感染期間中に冷却装置の故障があり、3日目感染群の7日目から終了時までと2週目感染群の6日目から終了時までには所定の水温より高くなった。

表1 人為感染後の水温状況

感染区分	免疫後経過	水温 (°C)
シュードモナス病	3日目	17.9~18.9 (18.4)*
	1週目	17.9~19.0 (18.4)
	2週目	17.6~19.2 (18.5)
	4週目	18.1~19.4 (18.7)
	32日目	18.2~19.8 (18.8)
冷水病	3日目	15.2~18.8 (16.9)
	1週目	15.0~18.5 (15.7)
	2週目	15.2~19.0 (17.5)
	4週目	15.6~17.0 (16.2)
	32日目	15.8~17.5 (16.3)

* 平均値

結果および考察

飼育状況を表2に示した。試験Ⅰ、Ⅱともにワクチン区で接種後2日目から水カビ病がみられるようになり、接種後6日目頃から死亡は治まったものの、ワクチン区の死亡率は試験Ⅰで10.3%、試験Ⅱで9.0%となった。一方、対照区では死亡はみられなかった。ワクチン区でのみ水カビ病が発生した原因としては、アジュバント添加ワクチンの取り扱いの不慣れから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、人為感染後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により認められたことから、食品衛生面からの検討も必要である。

シュードモナス病人為感染結果を表4および図1に、シュードモナス病に対する有効性を表5に示した。ワクチン区の有効率は免疫後3日目以降32日目まで60%以上を示し、しかもFisherの直接

表2 飼育状況

試験 回次	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			
I	1~7日目	17.5~20.5 (19.1) *	ワチン区	399	11.0	10.4	0.95	37	9.3
			対照区	399	9.8	10.8	1.10	0	0.0
	8~14日目	18.0~22.0 (19.6)	ワチン区	242	10.4	11.7	1.13	3	1.2
			対照区	279	10.8	10.9	1.01	0	0.0
	15~28日目	18.1~22.0 (19.6)	ワチン区	119	12.3	16.1	1.31	1	0.8
			対照区	159	10.9	14.2	1.30	0	0.0
1~28日目	17.5~22.0 (19.4)	ワチン区	399	11.0	16.1	1.46	41	10.3	
		対照区	399	9.8	14.2	1.45	0	0.0	
II	1~3日目	18.0~20.5 (19.3)	ワチン区	300	11.7	11.7	1.00	21	7.0
			対照区	300	12.0	11.9	0.99	0	0.0
	4~32日目	18.0~20.8 (21.1)	ワチン区	159	11.7	19.9	1.70	6	3.8
			対照区	180	11.9	18.4	1.55	0	0.0
	1~32日目	18.0~20.8 (20.9)	ワチン区	300	11.7	19.9	1.70	27	9.0
			対照区	300	12.0	18.4	1.53	0	0.0

* 平均値

表3 アジュバント残留率

免疫後経過	残留率 (%)
3~17日	32.1
1~3週	41.2
2~4週	17.5
4~6週	16.7
32~46日	8.3
計	23.0

表4 シュードモナス病人為感染後の死亡状況

免疫後 経過	接種菌量 (CFU/尾)	試験 区分	供試 尾数	経過日数														死亡率 計 (%)
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
3日目	3.1×10 ²	ワチン区	30					5	9	4							18	60.0
		対照区	30			18	8	2									28	93.3
	6.2×10 ¹	ワチン区	30				2	3	1								6	20.0
		対照区	30			2	8	4	1								15	50.0
1週目	2.7×10 ²	ワチン区	30				5	3		1							9	30.0
		対照区	30			11	12	1									24	80.0
	5.4×10 ¹	ワチン区	30												1		1	3.3
		対照区	30					17	5	1							23	76.7
2週目	4.2×10 ²	ワチン区	30				5	1	2								8	26.7
		対照区	30			1	9	14	1	1	1						27	90.0
	8.4×10 ¹	ワチン区	30				1	1									2	6.7
		対照区	30					12	4								16	53.3
4週目	4.3×10 ²	ワチン区	30				7	8	2					1			18	60.0
		対照区	30				15	12	1								28	93.3
	8.6×10 ¹	ワチン区	30					5	2								7	23.3
		対照区	29					5	12								17	58.6
32日目	3.7×10 ²	ワチン区	30					4	2							1	7	23.3
		対照区	30					17	4								21	70.0
	7.4×10 ¹	ワチン区	30					1									1	3.3
		対照区	30					10	4	3							17	56.7

表5 免疫後のシュドモナス病に対する有効性

攻撃強度	免疫後経過	死亡率 (%)		RPS (%)	有意差	RPS60 (%)	有意差
		ワチン区	対照区				
高濃度	3日目	60.0	93.3	35.7	p<0.01	100.0	p<0.001
	1週目	30.0	80.0	62.5	p<0.001	78.3	p<0.001
	2週目	26.7	90.0	89.7	p<0.001	79.2	p<0.001
	4週目	60.0	93.3	35.7	p<0.01	44.4	p<0.001
	32日目	23.3	70.0	66.7	p<0.001	81.0	p<0.001
低濃度	3日目	20.0	50.0	60.0	p<0.05	—	—
	1週目	3.3	76.7	95.7	p<0.001	100.0	p<0.001
	2週目	6.7	53.3	87.6	p<0.001	—	—
	4週目	23.3	58.6	60.2	p<0.01	—	—
	32日目	3.3	56.7	94.2	p<0.001	—	—

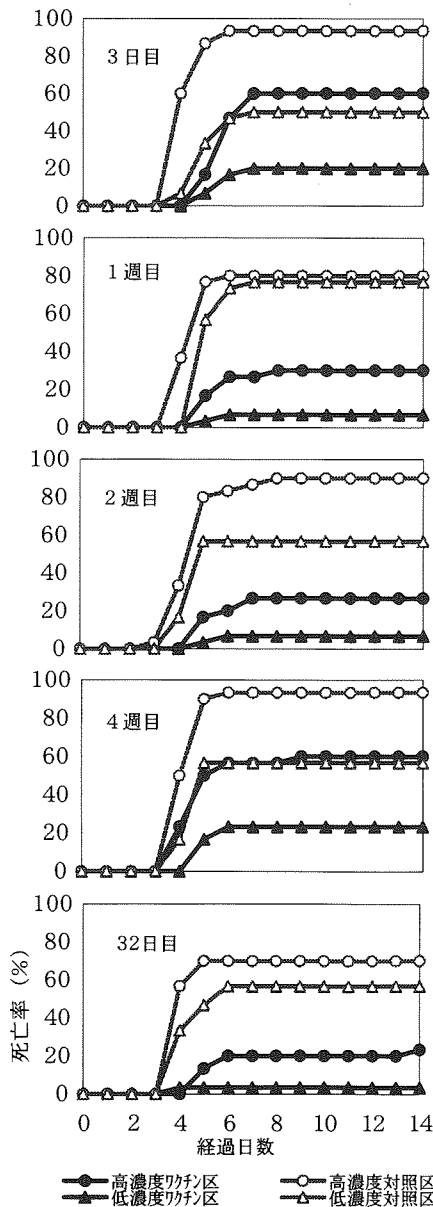


図1 シュドモナス病人為感染後の死亡率の推移

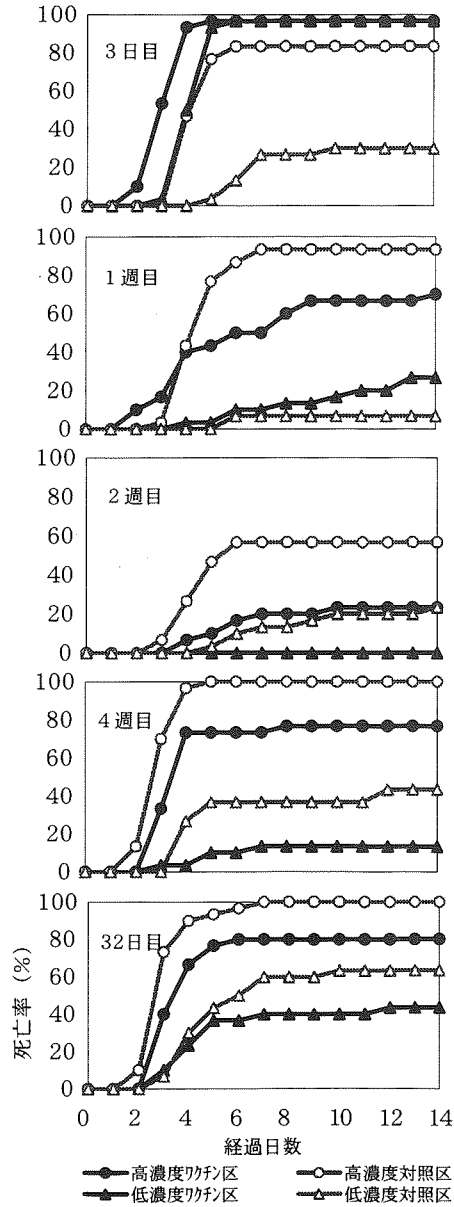


図2 冷水病人為感染後の死亡率の推移

表6 冷水病人為感染後の死亡状況

免疫後経過	接種菌量 (CFU/尾)	試験区分	供試尾数	経過日数														死亡率		
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	計 (%)	
3日目	1.6×10^8	ワチン区	30		3	13	12	1										29	96.7	
		対照区	30				14	9	2									25	83.3	
	1.6×10^7	ワチン区	30			1	14	13	1									29	96.7	
		対照区	30						1	3	4			1				9	30.0	
1週目	3.6×10^7	ワチン区	29		3	2	7	1	2			3	2				1	21	72.4	
		対照区	30			1	12	10	3	2								28	93.3	
	3.6×10^6	ワチン区	30				1		2			1		1	1		2	8	26.7	
		対照区	30							2								2	6.7	
2週目	1.4×10^7	ワチン区	30				2	1	2	1				1				7	23.3	
		対照区	30			2	6	6	3									17	56.7	
	1.4×10^6	ワチン区	30																0	0.0
		対照区	30						1	2	1		1	1			1	7	23.3	
4週目	2.5×10^7	ワチン区	30				10	12						1				23	76.7	
		対照区	30			4	17	8	1									30	100.0	
	2.5×10^6	ワチン区	30				1		2			1						4	13.3	
		対照区	30					8	3								2	13	43.3	
32日目	2.6×10^8	ワチン区	30				12	8	3	1								24	80.0	
		対照区	30			3	19	5	1	1	1							30	100.0	
	2.6×10^7	ワチン区	30				3	4	4		1					1		13	43.3	
		対照区	30				2	7	4	2	3				1			19	63.3	

表7 免疫後の冷水病に対する有効性

攻撃強度	免疫後経過	死亡率 (%)		RPS (%)	有意差	RPS60 (%)	有意差
		ワチン区	対照区				
高濃度	3日目	96.7	83.3	-16.1	NS	-26.1	NS
	1週目	72.4	93.3	22.4	NS	41.6	p<0.05
	2週目	23.3	56.7	58.9	p<0.01	-	-
	4週目	76.7	100.0	23.3	p<0.05	52.4	p<0.01
	32日目	80.0	100.0	20.0	p<0.05	45.4	p<0.01
低濃度	3日目	96.7	30.0	-222.3	p<0.001	-	-
	1週目	26.7	6.7	-298.5	NS	-	-
	2週目	0.0	23.3	100.0	p<0.05	-	-
	4週目	13.3	43.3	69.3	p<0.05	-	-
	32日目	43.3	63.3	31.6	NS	33.3	NS

確立計算法による検定で有意差 (p<0.05, p<0.01またはp<0.001) が認められた。冷水病人為感染結果を表6および図2に、冷水病に対する有効性を表7に示した。免疫後3日目の有効性はなかったが、1週目以降は有効率が低いものの同検定から有意差 (p<0.05またはp<0.01) が認められた。

このように、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安全性、有効性および免疫発現時期について試験したところ、ワクチン接種区で水カビ病が認められた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の検討が必要である。次に、有効性についてはシュードモナス病に対しては免疫後3日目頃から免疫が発現し始め32日目まで持続していた。しかし、冷水病に対しては免疫後1週目以降低いながらも有効性は認めらるものの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の

検討が必要である。

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) 宇野悦央, 高橋芳明, 加藤邦彰, 田上伸治(2002): 魚類防疫推進対策, 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, 26, 12-17.
- 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, 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.