

アユの冷水病に対するワクチンの予防効果－Ⅱ

宇野悦央

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は、腹腔内接種により接種後8週目まで有効性が認められることは前報¹⁾のとおりであるが、アジュバントの残留性が懸念されている。そこで、残留性が少ないと考えられる水溶性アジュバントを添加した冷水病不活化ワクチンと無添加のものを用いて、腹腔内接種による冷水病の予防効果について検討した。なお、本研究は、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。

試料および方法

試験期間 平成12年6月15日～8月10日（Ⅰ期：6月15日～7月13日，Ⅱ期：7月14日～8月10日）

供試魚 供試魚は、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、平均体重はいずれのワクチン区とも14.2 g，対照区13.8 gであり、各区130尾ずつ用いた。

飼育条件 飼育池は3×2×0.5 m（水深0.33 m，水量約2.0 m³）で、十分通気を行った。用水は河川伏流水で、換水率はⅠ期0.1～0.5回/時，Ⅱ期0.5～0.7回/時とした。水温はⅠ期15.5～20.9℃（平均18.4℃），Ⅱ期18.1～20.5℃（平均19.7℃）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3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月に本県の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12年6月15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 2.2×10^8 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18℃5日間培養したものを、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。アジュバントの添加は、ワクチン1に対してアジュバント1の体積割合で接種直前にスターラーで数分間泡立たない程度に攪拌して行った。アジュバントは水溶性アジュバントであるIMS-1312を用いた。なお、このアジュバントは水産庁養殖研究所から分与されたものである。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0.05 ml接種した。投与した不活化菌数はアジュバント添加ワクチン区（以下アジュバント区と称す）で 5.5×10^6 CFU/尾，アジュバントを添加していないワクチン区（以下無添加区と称す）で 1.1×10^7 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 使用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、滅菌淡水の希釈により、1 ml当たり 2.2×10^9 CFUまたは 1.4×10^{10} CFUの菌液を調整し、さらに滅菌淡水で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4週目の供試魚（平均体重：アジュバント区20.4 g，無添加

区 20.3 g, 対照区 19.2 g) および免疫後 8 週目の供試魚 (平均体重: アジュバント区 37.3 g, 無添加区 36.3 g, 対照区 35.4 g) 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 ずつ皮下接種し, その後 2 週間観察した。観察期間中の水温は 4 週目 16.4 ~ 17.5°C (平均 16.8°C), 8 週目 17.1 ~ 18.8°C (平均 18.1°C) であった。

結果および考察

飼育結果を表 1 に示した。へい死はいずれの試験区ともなく, 摂餌や成長も良好であり, また, アジュバントワクチン及び無添加ワクチンは目視では残留性が認められなかった。したがって, これらのワクチンは安全であると考えられた。

表 1 飼育結果

試験区	I 期			II 期		
	アジュバント区	無添加区	対照区	アジュバント区	無添加区	対照区
開始時総重量(kg)	1.84	1.85	1.79	1.19	1.20	1.17
" 尾数	130	130	130	55	56	56
" 平均体重(g)	14.2	14.2	13.8	21.6	21.4	20.9
終了時総重量(kg)	2.72	2.72	2.61	2.05	2.03	1.98
" 尾数	130	130	130	55	56	56
" 平均体重(g)	20.9	20.9	20.1	37.3	36.3	35.4
へい死尾数	0	0	0	0	0	0
生残率(%)	100	100	100	100	100	100
給飼量(kg)	1.06	1.06	1.06	0.920	0.920	0.920
増重量(kg)	0.88	0.87	0.82	0.86	0.83	0.81
飼料効率(%)	83.0	82.1	77.4	93.5	90.2	88.0
日間給飼率(%)	1.60	1.60	1.66	2.03	2.03	2.09
日間成長率(%)	1.33	1.31	1.29	1.90	1.84	1.84
増重倍率	1.5	1.5	1.5	1.7	1.7	1.7
飼育日数	29	29	29	28	28	28

人為感染結果を表 2, 3 に示した。免疫後 4 週目のへい死率は, いずれの試験区とも 40% 以下で

表 2 人為感染による成績 (免疫後 4 週目)

接種濃度 (CFU/尾)	試験区分	供試尾数	経過日数												総へい死尾数	へい死率 (%)	RPS (%)	Fisher の直接確立計算法		
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11					12	13
1.1×10 ⁸	アジュバント区	25			1	7	1		1								10	40	0	NS
	無添加区	25				4		1		3			1				9	36	10	NS
	対照区	25				2	6								1		10	40	—	—
1.1×10 ⁷	アジュバント区	25						2		1						1	4	16	56	NS
	無添加区	25						2	1		1				1	1	6	24	33	NS
	対照区	25					1	1	2		4		1				9	36	—	—
1.1×10 ⁶	アジュバント区	25															0	0	100	NS
	無添加区	25															0	0	100	NS
	対照区	25										1					1	4	—	—

水温: 16.4 ~ 17.5°C (平均 16.8°C)

RPS = (1 - 試験区の冷水病によるへい死率 / 対照区の冷水病によるへい死率) × 100

表3 人為感染による成績（免疫後8週目）

接種濃度 (CFU/尾)	試験 区分	供試 尾数	経過日数												総へい死 尾数	へい死 率(%)	RPS (%)	Fisherの直接 確立計算法			
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11					12	13	14
7.0×10 ⁸	アジュバント区	25			1	1	1	1	1	1	1	1	1				8	32.0	0.0	NS	
	無添加区	25				4	1		2	1			2		1		11	44.0	-37.5	NS	
	対照区	25				2	3				1	1		1			8	32.0	-	-	
7.0×10 ⁷	アジュバント区	25					1					6	1	2	2	3	15	60.0	-25.0	NS	
	無添加区	25					1					1					2*	16.7	63.6	NS	
		25			1										1	1		3	12.0	75.0	P<0.05
		25			1										1			2*	8.3	81.8	P<0.01
対照区	25			1	2	2	3					1	1	1	1		12	48.0	-	-	
				1	2	2	3					1	1	1				11*	45.8	-	-

水温：17.1～18.8℃（平均18.1℃）

*：冷水病によるへい死尾数

あり、しかもへい死尾数に有意差は認められなかった。免疫後8週目においても、高濃度接種区ではいずれの試験区ともへい死率は44%以下と低いうえに、へい死尾数にも有意差は認められなかった。低濃度接種区ではアジュバント区でチョウチン病が発生したため、ワクチンの効果については十分評価できなかったが、無添加区の有効率は81.8%であり、へい死尾数の差をFisherの直接確立計算法により検定すると有意差（P<0.01）が認められた。

このように、水溶性アジュバントを添加したワクチンと無添加のワクチンを用い、腹腔内接種による冷水病の予防効果について検討したところ、アジュバント添加ワクチンおよび無添加ワクチンの安全性は認められたが、対照区のへい死率が低かったため、ワクチンの有効性については十分評価できなかった。ただし、免疫後8週目において有効性の認められた試験区もあり、適切な感染強度のもとでさらに検討する必要があると考えられる。

文 献

- 1) 宇野悦央. アユの冷水病に対するワクチンの予防効果-I. 平成11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 2001; 25: 37-40.