

アユのシュードモナス病に対するワクチンの予防効果－II

宇野悦央

アユのシュードモナス病（細菌性出血性腹水病¹⁾）は本県においては1991年頃から発生がみられ、1994年以降は冷水病に次いで発生が多くなっている。^{2, 3)} また、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、ワクチンの開発が強く求められている。

このため、腹腔内接種法および浸漬法によるアユシュードモナス病不活化ワクチンの安全性および有効性について検討した。

実験1. 腹腔内接種法について

全国湖沼河川養殖研究会アユ冷水病研究部会の連絡試験として、ワクチンの腹腔内接種法について検討した。

材 料 お よ び 方 法

試験期間 平成9年11月6日～12月4日

供試魚 平成9年3月に搬入した海産稚アユを養成したもので、病歴および投薬歴はなく、電照により成熟を抑制した。供試尾数および平均体重は免疫区150尾（34.7g）、対照区140尾（34.3g）である。

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、換水率は約0.65回/時とした。水温は14.9～15.6℃（平均15.2℃）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。

ワクチンの種類と投与方法 ワクチン作製株は、アユ病魚から分離された*Pseudomonas* sp. FPC941株で、社団法人動物用生物学的製剤協会から提供されたアユシュードモナス病不活化ワクチンを用いて平成9年11月6日に投与した。不活化ホルマリン濃度は0.8V/V%で、不活化前生菌数は 1.7×10^{10} CFU/mlである。ワクチンの投与は、ワクチン原液をツベルクリン注射器で腹腔内に0.1ml/尾接種した。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製株と同一で、1回魚体通過後使用した。攻撃菌は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、1ml当り 3.0×10^{10} CFUの菌液を作成した。この菌液を飼育水で10倍段階希釈して、4段階の菌液を1ℓずつ調整した。このように調整された菌液に、免疫後28日目の供試魚20尾を15分間浸漬後、21日間観察した。浸漬中の水温は14.6～16.0℃であった。

採血および抗体価の測定 採血および抗体価の測定は開始時、免疫後14日目および28日に行い、尾数および大きさは表1に示したとおりである。また、人為感染後の生残魚についても抗体価を測定し、その尾数および大きさを表2に示した。採血は尾柄部の脊椎骨直下の血管からツベル

クリン注射器を用いて行い、採取した血液は4℃で1夜放置後10,000rpm. 5分間遠沈し、血清を分離採取した。その後測定に供するまで-80℃で保存した。抗体価の測定はマイクロタイター法により行った。抗原液はワクチン作製株と同一株で作成し、その濃度は5 mg/mlとした。

結果および考察

飼育結果を表3に示した。ワクチン接種後、供試魚に異常遊泳やへい死はなかったが、免疫区の飼料効率および成長率是对照区に比べて低かった。今回、ワクチン接種液として原液を使用したことから、接種濃度が高すぎたことによる影響とも考えられ、ワクチンの安全性についてさらに検討する必要があると思われる。

免疫後28日目の人為感染結果を表4に、へい死率の推移を図1にそれぞれ示した。菌浴濃度 3.0×10^5 CFU/mlで、対照区のシュードモナス病によるへい死率が45%であったのに対し、免疫区では10% ($P < 0.05$, 有効率78)であり、ワクチンの有効性が認められた。免疫区における抗体価を図2に示した。対照区の抗体価はすべて4より低かったのに対し、免疫区では免疫後14日目、28日目ともに平均25であり抗体価の上昇が認められた。免疫後28日目に人為感染させ

表1 抗体価測定尾数および大きさ

試験区	採血日	尾数	体重 (g)	体長 (cm)
免疫区	開始時	15	32.5±4.9	13.3±0.62
	14日目	25	33.6±6.2	13.7±0.74
	28日目	26	40.6±6.4	14.2±0.65
対照区	14日目	15	38.4±5.7	14.1±0.63
	28日目	15	43.1±4.1	14.4±0.42

表2 人為感染後の抗体価測定尾数および大きさ

試験区	菌液濃度 (CFU/ml)	尾数	体重 (g)	体長 (cm)
免疫区	10^8	3	40.6±9.6	14.7±0.69
	10^7	6	34.4±3.4	14.0±0.49
	10^6	8	39.0±8.6	14.7±0.69
	10^5	18	39.6±6.9	14.8±0.73
対照区	10^7	2	41.6±0.6	14.6±0.35
	10^6	6	39.9±8.4	14.7±0.96
	10^5	11	38.8±6.6	14.6±1.03

表3 飼育結果

試験区	免疫区	対照区
開始時総重量 (kg)	5.20	4.80
“ 尾数	150	140
“ 平均体重 (g)	34.7	34.3
終了時総重量 (kg)	5.50	5.85
“ 尾数	120	125
“ 平均体重 (g)	45.8	46.8
供試尾数	30	15
供試魚総重量 (kg)	1.00	0.58
へい死尾数	0	0
生残率 (%)	100	100
給飼量 (kg)	1.810	1.810
補正増重量 (kg)	1.30	1.63
補正飼料効率 (%)	71.8	90.1
補正日間給飼率 (%)	1.02	1.09
補正日間成長率 (%)	0.73	0.98
補正増重倍率	1.25	1.34
飼育日数	28	28

表4 人為感染による成績 (免疫後28日目)

菌浴濃度 (CFU/ml)	試験 区分	供試 尾数	へい死 尾数	へい死率 (%)	有効率	Fisherの直接 確立計算法
3.0×10^8	免疫区	20	17	85	15	NS
	対照区	"	20	100		-
3.0×10^7	免疫区	20	15	75	17	NS
	対照区	"	18	90		-
3.0×10^6	免疫区	20	11	55	21	NS
	対照区	"	14	70		-
3.0×10^5	免疫区	20	2	10	78	$P < 0.05$
	対照区	"	9	45		-

水温 : 13.8~15.4°C (平均14.5°C)

有効率 = (1 - 試験区のシュードモナス病によるへい死率 / 対照区のシュードモナス病によるへい死率) × 100

た後の生残魚の抗体価は図3に示したとおりで、免疫区では免疫後28日目の抗体価とあまり差はなかったが、対照区では少し上昇が認められた。

このように、アユのシュードモナス病不活化ワクチンの腹腔内接種により免疫後28日目までワクチンの有効性が認められ、抗体価も高い値を示した。しかし、免疫区の飼料効率や成長率が低かったことから、接種濃度等についてさらに検討する必要があると思われる。

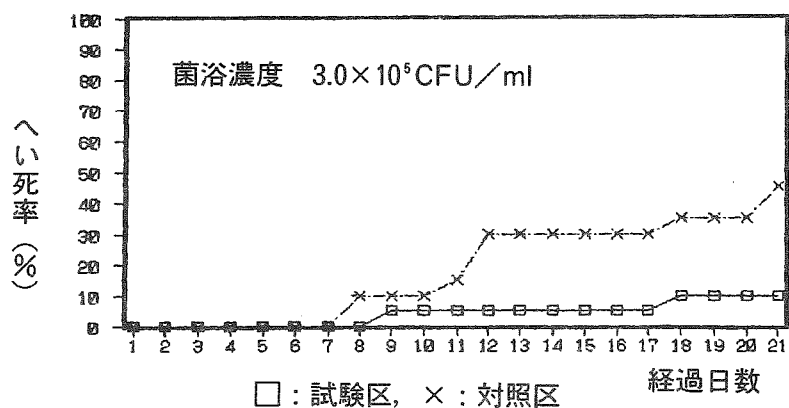


図1 人為感染によるへい死率の推移 (免疫後28日目)

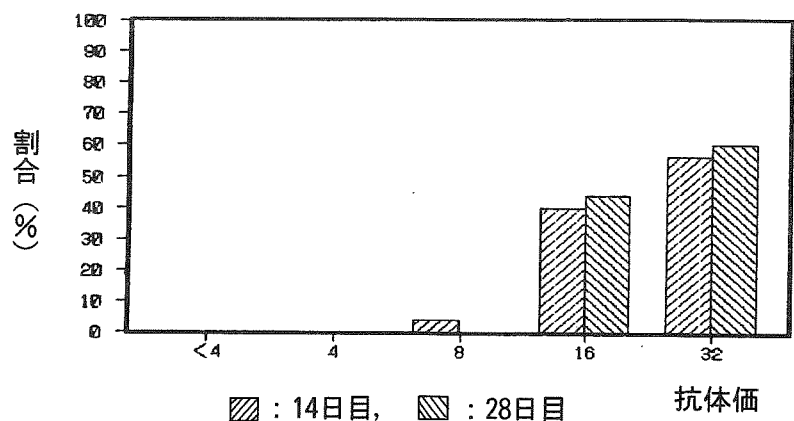


図2 免疫区における抗体価

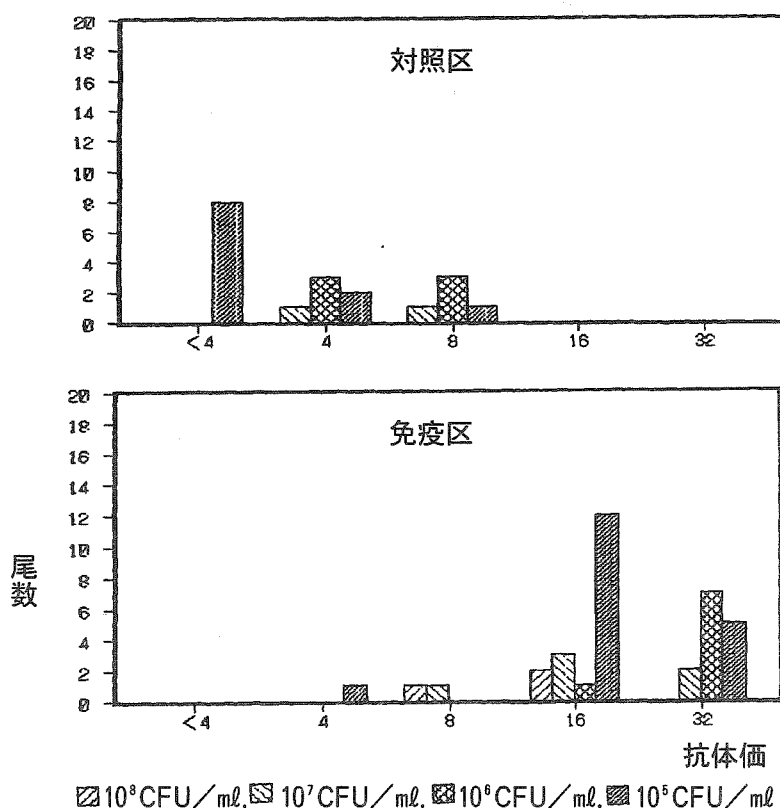


図3 人為感染後の生残魚の抗体価

実験2. 100倍希釈液10分間浸漬法について

全国湖沼河川養殖研究会アユ冷水病研究部会の連絡試験として、100倍希釈ワクチン液に10分間浸漬する方法および同法による追加免疫について検討した。

材料および方法

試験期間 平成10年6月22日～9月2日（Ⅰ期：6月22日～7月21日，Ⅱ期：7月22日～8月20日，Ⅲ期：8月21日～9月2日）

供試魚 平成10年2月に搬入した海産稚アユを養成したもので、病歴および投薬歴はなく、平均体重は免疫区9.8g，対照区9.3gであり、各区300尾供試した。

飼育条件 換水率はⅠ期：0.3～0.5回/時，Ⅱ・Ⅲ期：0.5～0.7回/時とした。水温はⅠ期：15.8～20.3℃（平均17.5℃），Ⅱ期：16.3～20.1℃（平均17.9℃），Ⅲ期：17.3～20.1℃（平均18.4℃）であり、その他の条件は実験1と同様である。

ワクチンの種類と投与方法 供試ワクチンは実験1と同じ方法で作製されたアユシュードモナス病不活化ワクチンLot3で、不活化前生菌数は 2.3×10^{10} CFU/mlであり、平成10年6月22日と7月22日に投与した。投与方法は、ワクチン原液200mlを飼育水で100倍希釈した使用ワクチン液を20ℓ作成し、一度に供試魚2.95kgを通気しながら10分間浸漬した。浸漬中の水温は17.0～18.0℃であった。対照区はワクチン液の代わりに飼育水を用いて10分間同様に処理し、水温は16.7～17.3℃であった。追加免疫区では、1回目の免疫から31日後に同様のワクチン処理による追加免疫を行い、対照

区ではワクチン液の代わりに飼育水を用いて10分間同様に処理した。浸漬中の水温はいずれも18.6～19.3℃であった。

人為感染方法 使用菌株はワクチンと同一株で、1回魚体通過したものをを用い、実験1と同じ方法で攻撃菌の培養および菌浴を行った。人為感染は免疫後30,60,73日目に行い、浸漬中の水温は30日目19.5～20.0℃、60日目20.0～20.6℃、73日目19.8～19.9℃であった。

採血および抗体価の測定 採血は免疫後30,60,73日目に行った。採血および抗体価の測定方法は実験1と同じで、測定尾数および大きさは表5に示したとおりである。

表5 抗体価測定尾数および大きさ

試験区	採血日	尾数	体重 (cm)	体長 (cm)
1回免疫区	30日目	15	20.5±1.8	11.2±0.41
	60日目	25	32.1±3.8	13.4±0.59
	73日目	23	39.4±4.6	14.1±0.61
追加免疫区	30日目	15	20.0±1.6	11.2±0.27
	60日目	24	31.7±5.0	13.3±0.50
	73日目	25	41.1±6.5	14.3±0.60
対照区	30日目	13	18.1±3.3	10.6±0.86
	60日目	15	30.2±4.7	13.0±0.49
	73日目	15	45.8±7.5	14.6±0.65

結果および考察

表6 飼育結果

試験区	I期 (6/22～7/21)			II期 (7/22～8/20)			III期 (8/21～9/2)		
	1回免疫区	追加免疫区	対照区	1回免疫区	追加免疫区	対照区	1回免疫区	追加免疫区	対照区
開始時総重量 (kg)	2.95	2.95	2.80	3.75	3.80	3.60	3.40	3.75	3.95
” 尾数	300	300	300	208	209	209	108	109	119
” 平均体重 (g)	9.8	9.8	9.3	18.0	18.2	17.2	31.5	34.4	33.2
終了時総重量 (kg)	5.50	5.50	5.40	6.95	7.15	6.90	4.30	4.75	5.00
” 尾数	300	300	300	208	209	209	108	109	119
” 平均体重 (g)	18.3	18.3	18.1	33.4	34.2	33.0	39.8	43.6	42.0
へい死尾数	0	0	0	0	0	0	0	0	0
生残率 (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
給飼量 (kg)	3.165	3.165	3.165	3.730	3.730	3.730	0.930	0.970	1.030
増重量 (kg)	2.55	2.55	2.60	3.20	3.35	3.30	0.90	1.00	1.05
飼料効率 (%)	80.6	80.6	82.1	85.8	89.8	88.5	96.8	103.1	101.9
日間給飼率 (%)	2.50	2.50	2.57	2.32	2.27	2.37	1.86	1.76	1.77
日間成長率 (%)	2.10	2.10	2.22	2.08	2.13	2.19	1.82	1.84	1.83
増重倍率	1.86	1.86	1.93	1.85	1.88	1.92	1.26	1.27	1.27
飼育日数	30	30	30	30	30	30	13	13	13

飼育結果を表6に示した。100倍希釈ワクチン液に10分間浸漬中およびその後、供試魚に異常やへい死はなく、また、成長や飼料効率にも差がなかったことから、供試ワクチンは安全であると考えられた。

人為感染結果を表7～9および図4にそれぞれ示した。免疫後30日目の菌浴濃度 7.0×10^5 CFU/mlで対照区のシュードモナス病によるへい死率が53%であったのに対し、1回免疫区では8% (P

表7 人為感染による成績 (免疫後30日目)

菌浴濃度 (CFU/ml)	試験区分	供試 尾数	チョウチン病魚を 除いた供試尾数	へい死 尾数	へい死率* ² (%)	有効率	Fisherの直接 確立計算法
7.0×10^6	1回免疫区	25	20	11	55	31	NS
	追加免疫区	"	21	13	62	23	NS
	対照区	"	25	20	80	—	—
7.0×10^5	1回免疫区	25	25	2	8	85	P<0.01
	追加免疫区	"	22	3	14	74	P<0.05
	対照区	"	19	10	53	—	—
7.0×10^4	1回免疫区	25	9	5	56	7	NS
	追加免疫区	"	20	4	20	67	P<0.05
	対照区	"	15	9	60	—	—

*1 水温: 16.7~18.5°C (平均17.6°C)

*2 チョウチン病魚を除いた割合

表8 人為感染による成績 (免疫後60日目)

菌浴濃度 (CFU/ml)	試験区分	供試 尾数	チョウチン病魚を 除いた供試尾数	へい死 尾数	へい死率* ² (%)	有効率
6.0×10^6	1回免疫区	25	20	18	90	-32
	追加免疫区	"	23	19	83	-53
	対照区	"	25	17	68	—
6.0×10^5	1回免疫区	25	13	7	54	-3
	追加免疫区	"	19	9	47	10
	対照区	"	21	11	52	—
6.0×10^4	1回免疫区	25	10	3	30	-170
	追加免疫区	"	10	1	10	10
	対照区	"	9	1	11	—

*1 水温: 18.2~19.3°C (平均18.7°C)

*2 チョウチン病魚を除いた割合

表9 人為感染による成績 (免疫後73日目)

菌浴濃度 (CFU/ml)	試験区分	供試 尾数	チョウチン病魚を 除いた供試尾数	へい死 尾数	へい死率* ² (%)	有効率
3.0×10^6	1回免疫区	20	20	18	90	-17
	追加免疫区	"	17	13	76	1
	対照区	"	13	10	77	-
3.0×10^5	1回免疫区	20	16	12	75	-5
	追加免疫区	"	8	6	75	-5
	対照区	"	14	10	71	-
3.0×10^4	1回免疫区	20	11	4	36	27
	追加免疫区	"	7	3	43	14
	対照区	"	8	4	50	-

*1 水温: 17.4~18.9°C (平均18.2°C)

*2 チョウチン病魚を除いた割合

<0.01, 有効率85), 追加免疫区では14% (P<0.05, 有効率74)であり, ワクチンの有効性が認められた。また, 菌浴濃度 7.0×10^4 CFU/mlの追加免疫区 (へい死率20%, P<0.05, 有効率67)においても有効性が認められた。しかし, 免疫後60日目および73日目には, チョウチン病による影響も考えられるもののワクチンの有効性は認められず, また追加免疫による効果もみられなかった。

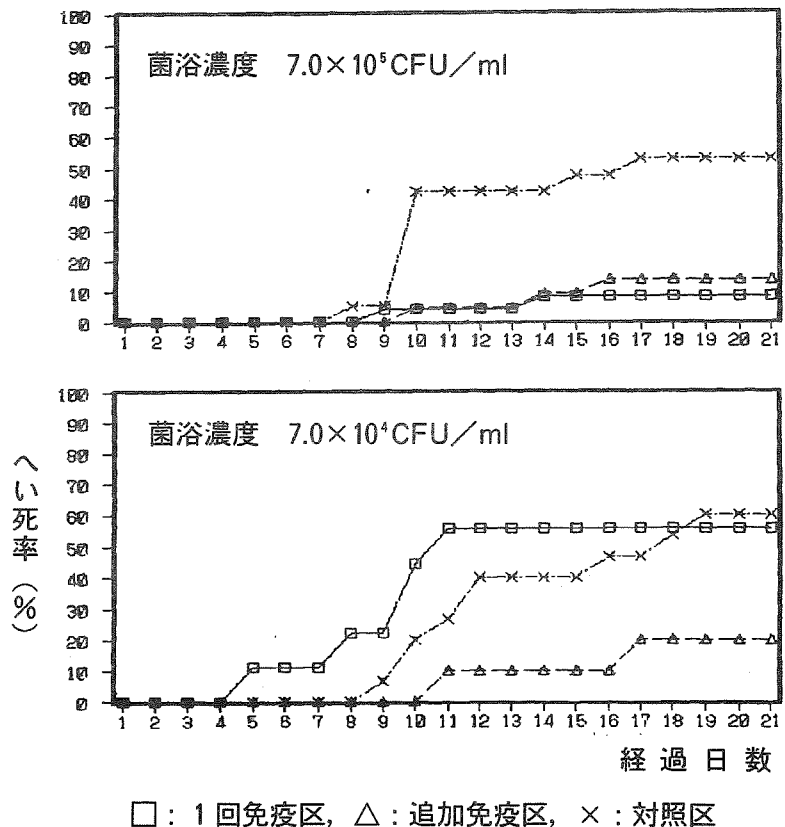


図4 人為感染によるへい死率の推移 (免疫後30日目)

免疫後30, 60, 73日目の抗体価の推移を図5に示した。免疫後30日目の抗体価は各免疫区ともに8以上の割合が50%みられたが、60日目以降は4以下の低い値がほとんどであり、抗体価が低下していた。免疫後60日目および73日目における免疫区間の抗体価の比較を図6に示した。追加免疫区の抗体価は60日目より73日目の方が高い傾向にあるが、追加免疫による効果はあまりないと考えられた。なお、抗体価は実験1の腹腔内接種と比較してかなり低かった。

このように、アユのシュードモナス病不活化ワクチンの100倍希釈10分間浸漬法により、免疫後30日目まではワクチンの有効性が認められ、抗体価もある程度上昇した。しかし、60日目以降はワクチンの有効性は認められず、しかも抗体価が低下しており効果は持続しなかった。また、初回免疫から30日目に同じ方法で追加免疫を実施したが効果はあまり認められなかった。

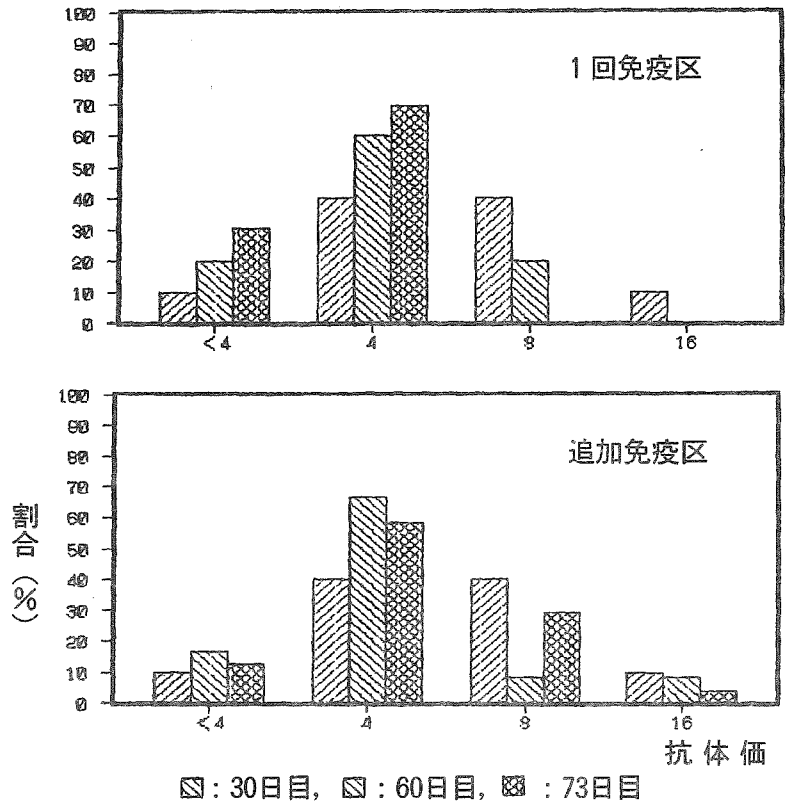


図5 抗体価の推移

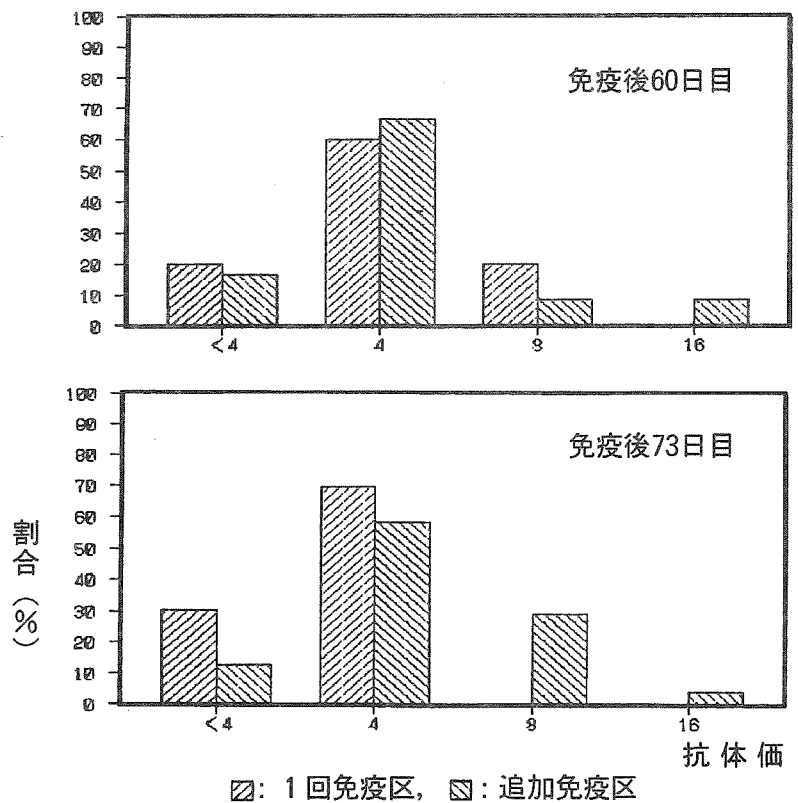


図6 抗体価の比較

実験3. 1,000倍希釈液24時間浸漬法について

社団法人 日本水産資源保護協会から委託を受けて、平成11年度水産用ワクチン推進化事業のうちの水産用ワクチンの効果比較試験研究を実施した。研究はシュードモナス病不活化ワクチンのアユに対する安全性および有効性について評価するもので、1,000倍希釈ワクチン液に24時間浸漬を1回行った場合の効果並びに初回免疫から30日後に追加免疫した場合の効果について検討した。

材料および方法

試験期間 平成11年6月28日～8月27日

(Ⅰ期：6月28日～7月27日，Ⅱ期：7月28日～8月27日)

供試魚 平成11年3月に搬入した海産稚アユを養成したもので、病歴および投薬歴はなく、平均体重8.3gのものを各区300尾ずつ供試した。

飼育条件 換水率はⅠ期0.3～0.5回/時，Ⅱ期0.5～0.7回/時とした。水温はⅠ期16.0～20.9℃(平均18.5℃)，Ⅱ期16.9～20.3℃(平均18.5℃)であり，その他の条件は実験1と同じである。

ワクチンの種類と投与方法 供試ワクチンは実験1と同じ方法で作製されたアユシュードモナス病不活化ワクチンLot. 4で，不活化前生菌数は 1.5×10^{10} CFU/mlであり，平成11年6月28日と7月28日に投与した。1回免疫区の投与方法は，ワクチン原液400mlを飼育水で1,000倍希釈した使用ワクチン液400lを500lパンライト水槽に調整し，24時間餌止めした供試魚2.5kg，300尾を通気しながら24時間浸漬した。供試魚を収容した約2時間後から排泄物により黄白色に濁った状態となり，さらに約20時間後には黄茶色を呈し濁りが著しくなった。しかし，供試魚には異常はみられなかった。浸漬中の水温は18.7～19.6℃で，水を入れたビニール袋を適宜ワクチン液に浸して水温上昇を抑えた。対照区はワクチン液の代わりに飼育水を用いて24時間同様に処理した。対照区においても免疫区と同様に飼育水が濁ったが，供試魚に異常はみられなかった。浸漬中の水温は18.5～19.4℃であった。追加免疫は1回免疫後30日目に供試魚1.33kg，100尾について初回免疫と同様にワクチン処理を行った。1回免疫区ではワクチン液の代わりに飼育水を用いて供試魚1.42kg，100尾を24時間同様に処理した。各区とも1回目と同様に水が濁ったが，魚に異常はみられなかった。浸漬中の水温は追加免疫区で17.9～19.5℃，1回免疫区で17.8～19.4℃であった。

人為感染方法 使用菌株はワクチン作製株と同じ株で，1回魚体通過したものをを用いて実験1と同じ方法で攻撃菌の培養および菌浴を行った。人為感染は免疫後28,59日に行い，1回目は21日間，2回目は15日間観察した。浸漬中の水温は1回目20.7～21.1℃，2回目20.5～21.0℃であった。

結果および考察

飼育結果を表10に示した。1,000倍希釈ワクチン液に24時間浸漬中およびその後，供試魚に異常やへい死はみられなかった。さらに，成長や飼料効率もほとんど差がなかったことから，供試ワクチンは安全であると考えられた。ただし，供試魚が飼育池の付着藻類を摂餌しており，その排泄物に

よりワクチン液が非常に濁ったことからワクチンの効果に影響があったことも考えられる。このため、あらかじめ付着藻類のない水槽で餌止め後にワクチン処理する必要がある。

表10 飼育結果

試験区	I期		II期		
	1回免疫区	対照区	1回免疫区	追加免疫区	対照区
開始時総重量 (kg)	2.50	2.50	1.42	1.33	1.37
“ 尾数	300	300	100	100	100
“ 平均体重 (g)	8.3	8.3	14.2	13.3	13.7
終了時総重量 (kg)	4.15	4.05	2.8	2.75	2.78
“ 尾数	300	300	100	100	100
“ 平均体重 (g)	13.8	13.5	28	27.5	27.8
へい死尾数	0	0	0	0	0
生残率 (%)	100	100	100	100	100
給飼量 (kg)	2.025	2.025	1.293	1.213	1.293
増重量 (kg)	1.65	1.55	1.38	1.42	1.41
飼料効率 (%)	81.5	76.5	106.7	117.1	109.0
日間給飼率 (%)	2.03	2.06	1.98	1.92	2.01
日間成長率 (%)	1.65	1.58	2.11	2.25	2.19
増重倍率	1.7	1.6	2.0	2.1	2.0
飼育日数	30	30	31	31	31

人為感染結果を表11, 12, 図7にそれぞれ示した。免疫後28日目の有効率は22以下であり、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は認められなかった。観察日数を21日間としたが、菌浴濃度が 3.2×10^5 CFU/mlでは15日目以降に再感染と思われるへい死が増加して

表11 人為感染による成績 (免疫後28日目)

菌浴濃度 (CFU/ml)	試験区分	供試尾数	へい死尾数	へい死率 (%)	有効率
3.2×10^7	1回免疫区	30	28	93	7
	対照区	“	30	100	
3.2×10^6	1回免疫区	30	24	80	0
	対照区	“	24	80	
3.2×10^5	1回免疫区	30	11	37(27)* ²	22(43)* ²
	対照区	“	14	47(47)	

*1 水温: 17.4~18.8°C (平均18.0°C)

*2 人為感染後14日目までの結果

表12 人為感染による成績（免疫後59日目，追加免疫後27日目）

菌浴濃度 (CFU/ml)	試験区分	供試 尾数	へい死 尾数	へい死率 (%)	有効率
3.6×10^7	1回免疫区	30	30	100	0
	追加免疫区	"	30	100	0
	対照区	"	30	100	
3.6×10^6	1回免疫区	30	30	100	0
	追加免疫区	"	29	97	3
	対照区	"	30	100	
3.6×10^5	1回免疫区	30	27	90	-8
	追加免疫区	"	27	90	-8
	対照区	"	25	83	

水温：18.9~19.8℃（平均19.2℃）

いることから，14日目までの有効率を求めると43と高くなったものの有意差は認められなかった。追加免疫後27日目の有効率は3以下であり，追加免疫による効果は認められなかった。ただし，水温が平均19.2℃と1回目より1℃余り高かったことから病原性が強くなり過ぎたためにへい死率に差が出なかったことも考えられる。

このように，1,000倍希釈ワクチン液に24時間浸漬並びに同じ方法で追加免疫を実施した場合の安全性および有効性について検討したところ，供試ワクチンは安全であると考えられたが，有効性は認められなかった。しかし，今回の試験ではワクチン処理中に水の濁りが著しかったうえに人為感染時の病原性が強すぎたことから，ワクチンの有効性評価についてはさらに検討する必要があると考えられる。

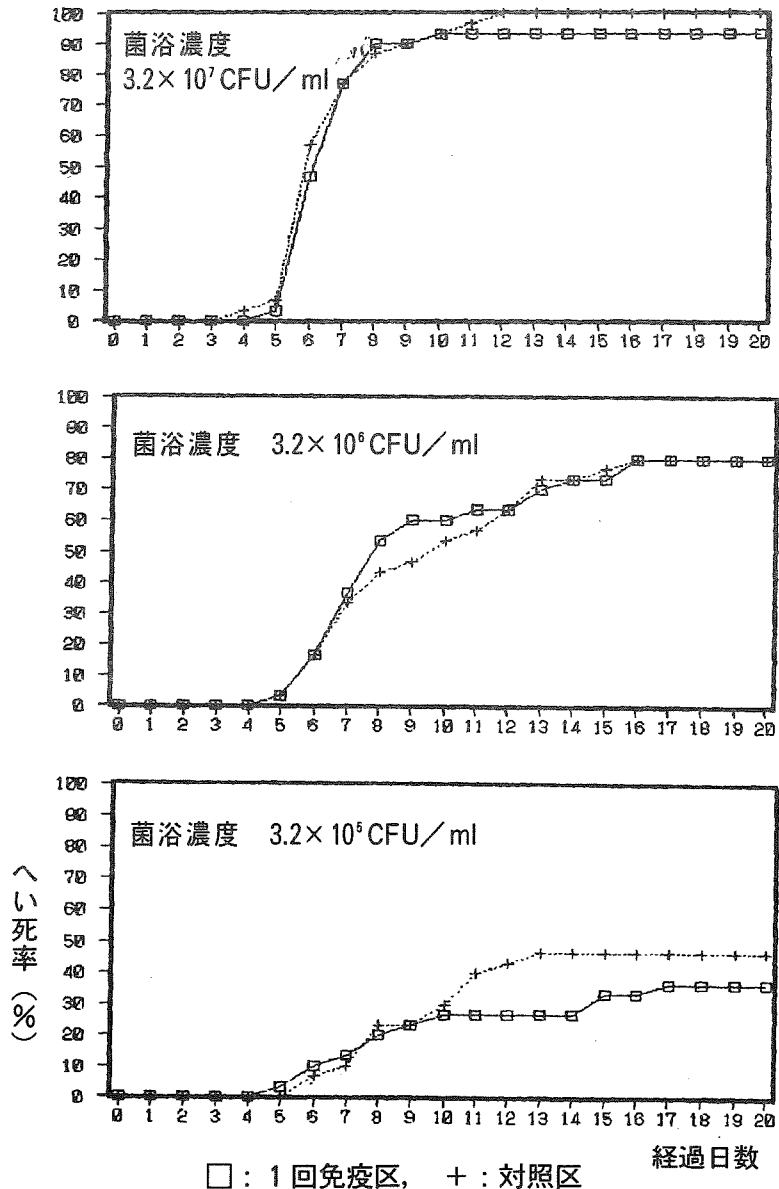


図7 人為感染結果（免疫後28日目）

ま と め

アユのシュードモナス病不活化ワクチンの安全性および有効性について、腹腔内接種法、100倍希釈ワクチン液に10分間浸漬、1,000倍希釈ワクチン液に24時間浸漬および追加免疫について検討した。浸漬法による供試ワクチンの安全性は認められたが、腹腔内接種法では成長の低下がみられ、接種濃度等について検討する必要があると考えられた。有効性については、腹腔内接種法および100倍希釈ワクチン液に10分間浸漬する方法でワクチン処理後約4週間目まで効果が認められたが、1,000倍希釈ワクチン液に24時間浸漬する方法では効果は認められなかった。また、追加免疫についてもあまり効果はみられなかった。前報⁴⁾においても浸漬法(100倍希釈液に5時間浸漬と10分間浸漬)で同様な結果が得られており、今後、持続性の向上方法について検討する必要がある。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 宇野悦央 (1999) : アユのシュードモナス病に対するワクチンの予防効果, 平成9年度和歌山県内水面漁業センター事業報告, 23, 16-19.