

ブリ類結節症ワクチン開発試験—II*

小 川 健

海産魚ワクチン開発研究検討会に参加し、前年度に引続き試験を行った。本年度は動物用生物学的製剤協会（以下動生協という）で試作されたブリ類結節症ワクチンを用いて、ブリ稚魚に対する浸漬法による安全性試験と人為感染による有効性試験および海面小割生簀における自然感染による有効性試験を実施したので報告する。

1 安全性試験

材料および方法

供試ワクチン：動生協試作ホルマリン死菌類結節症ワクチンPKD-61-A

供 試 魚：ブリ稚魚，各区50尾。平均体重 7.97 ± 3.91 g，平均尾叉長 8.51 ± 0.58 cm，平均肥満度 12.69 ± 1.09 のもの。

供試魚は1986年6月10日熊野灘で採捕され，白浜町堅田で蓄養中の平均体重2.76 gのモジャコで，試験場へは6月12日に約600尾を搬入し，7月2日まで500 lパンライト水槽で25 l/分の流水飼育を行ったものである。蓄養中は無給餌で，問題となる斃死はなく，予備飼育中は1日2回，朝夕に市販栄養剤添加イカナゴミンチを100~400 gづつ給餌した。この間，6月13日の斃死魚にピブリオ病がみられたので6月14日から5日間OTCを 0.5 g/kg·BW/日を投与したところ6月21日には終息した。予備飼育中の総斃死尾数は45尾で約7.5%の斃死率であった。また水温は $21.5 \sim 23.6$ °C，海水比重は $1.0229 \sim 1.0244$ であった。

試 験 区：浸漬ワクチン液濃度 10^9 ， 10^8 区および対照区の3区。

試験方法：各濃度のワクチン液は砂濾過海水を40 μ ネットで濾過した海水で調整し10 lとした。対照には同じ海水10 lを用いた。浸漬魚体重量の浸漬液に占める率は約4%であった。

30 lパンライト水槽に入れたワクチン液に供試魚を5分間浸漬した後直ちに流水飼育槽に移し，遊泳状態等を観察した。浸漬中はエアレーションを施し，溶存酸素量の測定も行った。

なお，供試魚は1週間目に各区より25尾をとりあげ攻撃試験に供し，以後は各区25尾で飼育をつづけた。

試験期間：'86年7月3日~7月23日

飼育方法：各区200 lパンライト水槽（水量150 l）を用い，約5 l/分の流水飼育とし，エアレーションも行った。ワクチン液浸漬当日は夕方1回，翌日からは1日2回9:00および16:00に

* 浅海増養殖試験費による。

栄養剤添加イカナゴミンチや解凍イカナゴを成長に応じて魚体重の30~12% 給餌した。

結果および考察

各濃度のワクチン液に浸漬中の供試魚の状態については、10°区で他区に比較して興奮状態がみられ、清水に戻したとき体色がやや黄色味を呈していたが、20分後には回復しており、10°区では対照区と全く変わらなかった。またワクチンネーション当日の夕方の摂餌も各区とも良好であった。

試験期間中各区とも斃死はなく、成長も表1に示したとおりであり、前述の10°区のワクチン液浸漬中の状態がみられたものの、安全性については問題がないと思われる。

なお、浸漬ワクチン液の水温は24.8~24.9℃、溶存酸素量は6.0~6.3ppmであった。また試験中の飼育水温は23.1~26.7℃の範囲であった。

表1 各区の成長

区	開 始 時		7 日 後 (7 月 10 日)			終 了 時 (7 月 23 日)	
	尾 数	平均体重 g	尾 数	総 重 量 g	平均体重 g	総 重 量 g	平均体重 g
10° 区	50	7.97±3.91	25	340	13.6	790	31.6
10° 区	50		25	330	13.2	730	29.2
対照区	50		25	340	13.6	700	28.0

2 有効性試験

1) 人為感染試験

材料および方法

供試ワクチン：安全性試験と同じ

供 試 魚：安全性試験でワクチンネーションを行った供試魚を、ワクチンネーション後1週間目、および安全性試験終了時（3週間目）に供試魚として用いた。

試 験 区：浸漬ワクチン液濃度10°、10°区および対照区についてそれぞれ1週間目および3週間目の攻撃区を設定した。

試験方法：攻撃試験用菌株 (NGT-8202) 凍乾品を2% NaCl BHI ブイヨンに溶解し25℃48hr 培養後2% NaCl BHI プレートに塗抹し、さらに48hr 培養して発育したコロニーを白金耳でかき取り、湿菌重量で10mgを2% NaCl加PBS (pH7.2) 10mlに懸濁し、これを濾過海水に加えて攻撃用菌液を作製した。菌濃度は $1.0\sim 1.2 \times 10^4$ CFU/mlであった。

作成した菌液に供試魚を5分間浸漬した後、魚だけを飼育水槽に戻した。菌浴中はエアレーション

ンを行い、菌液の量は、1週間目の攻撃には5ℓ、3週間目には7.5ℓとした。また、菌液の水温は24.6、26.2℃であった。

攻撃後、各区とも飼育を継続し、以後の斃死状態を調べ、ワクチンの効果について検討した。斃死魚はすべて解剖し、症状の観察と腎臓・脾臓からの菌分離を行い、類結節症による斃死であるか否かを確認した。

試験期間：'86年7月3日～8月20日

飼育方法：安全性試験に同じ。ただし、攻撃当日は無給餌とした。

結果および考察

1週間目の攻撃試験結果を表2、図1に、3週間目の結果を表3、図2に示した。各区の成長は表4に、試験期間中の水温変化を図3に示してある。

1週間目の攻撃試験では攻撃後3日目から斃死がみられ8日目に終息した。この間の各区の斃死率は10°区40%、10°区36%、対照区72%となり、ワクチネーション区の斃死率は対照区の約半分であった。これに対し3週間目の攻撃試験では斃死が少なく、10°区と対照区に2尾ずつみられただけであった。これは図3に示すように、飼育水温が攻撃時すでに26℃以上になっていたことが大きな原因と思われ、ワクチン効果についての判断はできなかった。

なお、この供試魚を用いて8月7日（ワクチネーション5週間目）に、7月28日に当场で分離した*P. piscicida*を用いて攻撃試験を行ってみたが全く感染しなかった。

各区の成長については特に問題はなかったが、1週間目攻撃試験各区が3週間目の各区よりも成長がよく、1週間目の中でも対照区の成長がよいのは、試験期間が長かったこともあり、飼育密度の差が大きく現われたと考えられる。

表2 ワクチネーション後1週間目攻撃試験結果 (7月10日攻撃)

区	攻撃時 尾数	類結節症による斃死尾数										斃死率 %
		7月/11日	12	13	14	15	16	17	18	7/19~8/20	計	
10 ⁹	25	0	0	1	6	2	1	0	0	0	10	40.0
10 ⁸	25	0	0	0	3	4	1	1	0	0	9	36.0
対照	25	0	0	1	8	5	3	0	1	0	18	72.0

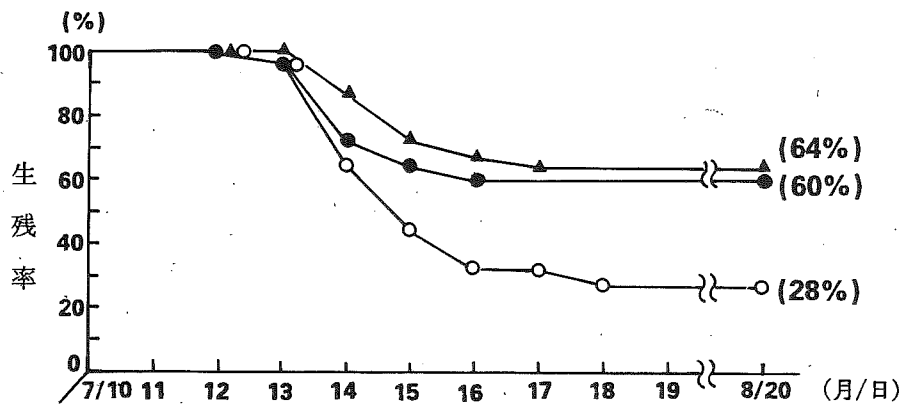


図1 ワクチネーション後1週間目攻撃試験における生残率 (%)

▲ : 10⁸区 ● : 10⁹区 ○ : 対照区

表3 ワクチネーション後3週間目攻撃試験結果 (7月24日攻撃)

区	攻撃時 尾数	類結節症による斃死尾数										斃死率 %
		7月/25日	26	27	28	29	30	31	8/1	8/2~20	計	
10 ⁹	25	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	8.0
10 ⁸	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
対照	25	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	8.0

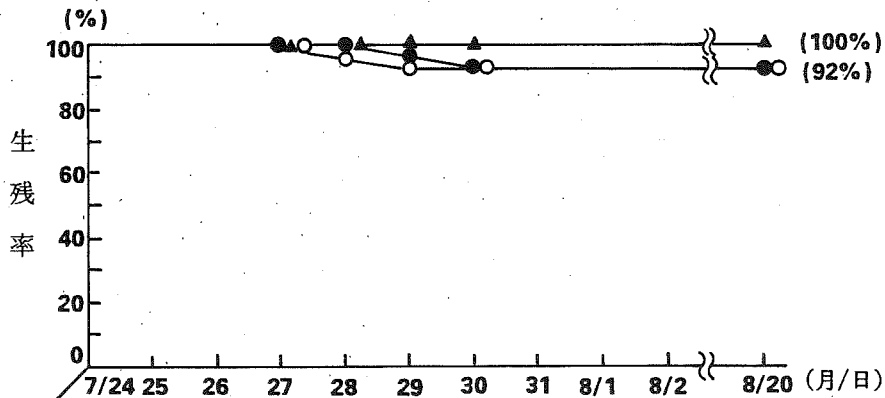


図2 ワクチネーション後3週間目攻撃試験における生残率 (%)

▲ : 10⁸区 ● : 10⁹区 ○ : 対照区

表4 攻撃試験各区の成長

区	攻 撃 時			終 了 時			
	尾数	総重量 g	平均体重 g	尾数	総重量 g	平均体重 g	
1 週間目 攻 撃	10 ⁹ 区	25	370	14.8	15	1,936	129.1±37.1
	10 ⁸ 区	25	360	14.4	16	1,668	112.2±35.2
	対照区	25	390	15.6	7	1,007	143.9±34.3
3 週間目 攻 撃	10 ⁹ 区	25	790	31.6	23	2,124	92.4±25.2
	10 ⁸ 区	25	730	29.2	25	2,045	81.8±19.6
	対照区	25	700	28.0	23	1,898	82.5±28.4

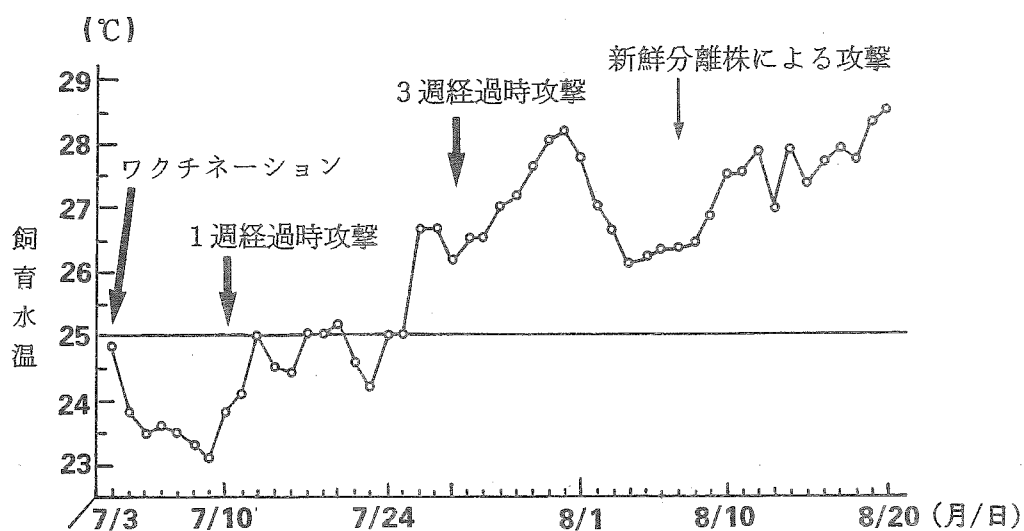


図3 試験期間中の水温変化

2) 自然感染試験

材料および方法

供試ワクチン：安全性試験と同じ

供 試 魚：平均体重8.24gのブリ稚魚各区55尾。供試魚の由来等は安全性試験と同じ。

試 験 区：浸漬ワクチン液濃度10⁹、10⁸区および対照区。

試験方法：ワクチネーションの方法等は安全性試験と同じ。ワクチネーション終了後200ℓパンライトの流水飼育槽に收容し、全区終了後、当場の試験後の小割まで運搬した。

類結節症の感染は試験後における自然感染とし、発病後の斃死状況を観察してワクチン効果を検討した。なお斃死魚は培検と菌分離により類結節症感染の有無を確かめた。

試験期間：'86年7月3日～8月12日

飼育方法：1.5m角小割網を用い、魚体重の30～10%の栄養剤添加イカナゴミンチや解凍イカナゴを1日2回9：00および16：00に分けて給餌した。

結果および考察

試験結果を表5, 図4に示した。試験後における試験期間中の水温は図3に示した陸上水槽よりも0.5~1.0℃高目に推移していた。また各区の成長を表6に示した。

類結節症の自然感染による斃死は7月3日のワクチネーション後6日目の7月9日に10°区ではじめてみられ, ついで9日目に対照区, 10日目に10°区でみられた。10°は7月22日で斃死が終息し, 10°区は7月21日に終息したが, 対照区は7月28日まで斃死がみられた。斃死率は表5のとおり, ワクチン区が両区とも18.2%であったのに対し, 対照区は32.7%となった。発病中は投薬等はもちろん行っていないが, 斃死率がこのように比較的良かった原因は, やはり環境水温の上昇による可能性が大きい。しかしワクチン区と対照区の斃死率の差は攻撃試験の1週間目のその差よりは小さいものの, 一応ワクチン効果とみることができよう。

7月29日以降は, 10°区で1尾, 10°で3尾, 対照区で1尾斃死がみられたが, いずれも類結節症の症状もなく, 原因菌も分離できなかったため斃死原因は別のものと判断し表5, 図4の斃死尾数から除外した。

なお, 各区の成長は表6に示すとおり, 順調であった。

表5 自然感染試験結果 (ワクチネーション7月3日)

区	開始時 尾数	類結節症による斃死尾数											斃死率 %											
		7/9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		20	21	22	23	24	25	26	27	28	7/29日~合計	
10°	55	0	0	0	1	0	2	0	1	0	2	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	10	18.2
10°	55	1	0	0	0	0	2	1	0	1	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	10	18.2
対照	55	0	0	1	0	1	0	2	1	0	3	2	4	1	1	0	1	0	0	0	1	0	18	32.7

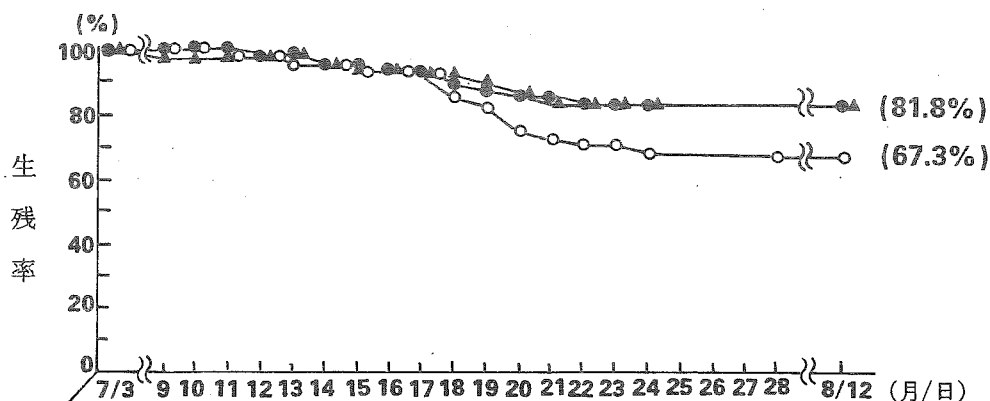


図4 自然感染試験における生残率 (%)

▲ : 10°区 ● : 10°区 ○ : 対照区

小川：ブリ類結節症ワクチン開発試験－II

表6 自然感染試験各区の成長

区	開始時			終了時		
	尾数	総重量g	平均体重g	尾数	総重量g	平均体重g
10 ⁹	55	480	8.73	44	7,100	161.4
10 ⁸	55	420	7.64	42	7,200	171.4
対照	55	460	8.36	36	5,830	161.9