

アユのビブリオ病に対するワクチンの予防効果

堀江 康浩, 辻村 明夫, 中西 一

アユビブリオ病研究部会の連絡試験として, *Vibrio anguillarum* (血清型A型) と複数の共通抗原を有する *V. ordalii* に対する *V. anguillarum* (血清型A型) を元株としたワクチンの予防効果を検討した。

材料および方法

試験期間 昭和62年7月8日～10月16日

供試ワクチンの種類と投与方法 1. 供試ワクチンの種類 ホルマリン不活化ワクチン (元株: *V. anguillarum* PT-479株 (血清型A型))

2. 投与年月日 昭和62年7月8日

3. 投与方法 試験区はワクチン原液0.5ℓを飼育水で10倍に希釈し, 使用ワクチン液5ℓを調整して, 1回に供試魚2.1Kgを通気しながら2分間浸漬しワクチネーションした。浸漬時の使用ワクチン液の水温は17.3～18.1℃であった。対照区は無処理とした。

供試魚 昭和61年10月当センターで生産した人工アユ (ワクチン処理時の平均体重各3.5g) で, 病歴・投薬歴のないものを試験区, 対照区とも各600尾を用いた。

攻撃試験 1. 供試菌株 *V. ordalii* と推定されるV-1株および *V. anguillarum* と推定されるV-2株を用いた。両株の由来を表1に, 主な性状を表2に示した。なお, 両株はともに *V. anguillarum* (血清型A型) の診断用抗血清に凝集反応を示した。

表1 供試菌株の由来

| 菌株 | V-1 | V-2 |
|-------|-----------|----------|
| 分離年月日 | 62. 7. 24 | 62. 9. 7 |
| 場所 | 白浜町 | 岩出町 |
| 魚種 | 湖産アユ | 湖産アユ |
| 体重(g) | 22 | 10 |
| 分離部位 | 腎臓 | 腎臓 |

表2 供試菌株の性状

| 菌株 | V-1 | V-2 |
|---------|-----|-----|
| インドール | — | + |
| V P | — | + |
| アルギニン | — | — |
| リジン | — | — |
| オルニチン | — | — |
| O N P G | — | + |

2. 攻撃方法 免疫64日目と88日目の2回にわたり攻撃試験を実施した。

1) 第1回目(免疫64日目)

(1) V-1株 0.5%ブドウ糖加血液寒天培地を用い、25°C 24時間培養し、1%食塩水に懸濁させ、1ml当り 9.5×10^7 個の菌液を調整して、10倍段階希釈し、5段階の菌液に調整した。このように調整された各菌液を供試魚30尾を用い、1尾当り0.05mlとなるように腹腔内接種し、14日間観察した。

(2) V-2株 1%食塩と0.5%ブドウ糖加ハートインフュージョンブイヨンを用い、25°C 24時間培養し、1ml当り 1.6×10^7 個の菌液を調整して、これを1%食塩水で10倍段階希釈し、3段階の菌液2ℓを調整した。このように調整された各菌液に供試魚30尾を通気しながら10分間浸漬して、14日間観察した。

2) 第2回目(免疫88日目) 第1回目のV-1株と同様にV-1, 2株を培養し、V-1株を1ml当り 6.0×10^9 個、V-2株を 2.7×10^8 個の菌液に調整して、10倍段階希釈し、V-1株を4段階、V-2株は1段階の菌液を各2ℓ調整した。以下、両株とも第1回目のV-2株と同様に攻撃し観察した。

飼育条件 飼育池は $2 \times 5 \times 0.5\text{m}$ (水量 3m^3) のものを使用し、1日に2~3回魚体重の約1%の配合飼料を給餌した。

結 果

飼 育 飼育期間中は試験区、対照区ともビブリオ病や他の病害の発生もなく、摂餌状況や魚群の行動等についても異常はみられなかった。

攻撃試験 1. 第1回目(免疫64日目) 攻撃試験成績を表3, 4に示した。V-1株の斃死率は 9.5×10^6 個/魚の攻撃菌数では、両区とも100%で、 $9.5 \times 10^5 \sim 10^2$ 個/魚においていずれも試験区は対照区と比べ低い斃死率を示した。有効率は 9.5×10^5 , 10^4 , 10^3 個/魚においてそれぞれ6.7, 31.1, 24.9となり、いずれの攻撃菌数も60以下となった。V-2株の斃死率は 1.6×10^4 個/mlの攻撃菌数では、試験区が10%, 対照区が93.3%, 1.6×10^3 個/mlでは試験区が0%, 対照区が60%, また 1.6×10^2 個/mlでは両区とも0%であった。有効率は 1.6×10^4 , 10^3 個/mlではそれぞれ89.3, 100を示し、両攻撃菌数において有効率60を越え、ワクチンの明らかな効果がみられた。

表3. 免疫64日目におけるV-1株の腹腔接種による攻撃試験成績

| 攻撃菌数 (個/魚) | 試験区分 | 供試尾数 | 経過日数 | | | | | | | | | | | | ビブリオ病による 斃死尾数 | ビブリオ病による 斃死率(%) | 有効率 | | |
|-------------------|------|------|------|----|----|----|---|---|---|---|---|----|----|----|------------------|--------------------|-----|------|------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | | | 13 | 14 |
| 9.5×10^6 | 試験区 | 30 | | 2 | 22 | 6 | | | | | | | | | | | 30 | 100 | |
| | 対照区 | 30 | | 17 | 12 | 1 | | | | | | | | | | | 30 | 100 | |
| 9.5×10^5 | 試験区 | 30 | | | 8 | 13 | 7 | | | | | | | | | | 28 | 93.3 | 6.7 |
| | 対照区 | 30 | | | 24 | 4 | | 2 | | | | | | | | | 30 | 100 | |
| 9.5×10^4 | 試験区 | 30 | | | 1 | 7 | 9 | 3 | | | | | | | | | 20 | 66.6 | 31.1 |
| | 対照区 | 30 | | | 5 | 20 | 4 | | | | | | | | | | 29 | 96.7 | |
| 9.5×10^3 | 試験区 | 30 | | | | 4 | 6 | 4 | 1 | | | | | | | | 15 | 50.0 | 24.9 |
| | 対照区 | 30 | | | 1 | 6 | 8 | 5 | | | | | | | | | 20 | 66.6 | |
| 9.5×10^2 | 試験区 | 30 | | | | 2 | 1 | | 1 | | | | | | | | 4 | 13.3 | |
| | 対照区 | 30 | | | | | 7 | 1 | 3 | | | | | | | | 11 | 36.7 | |

供試魚平均体重：6.7g，水温：18.6～20.3℃

表4 免疫64日目におけるV-2株の浸漬による攻撃試験成績

| 攻撃菌数 (個/ml) | 試験区分 | 供試尾数 | 経過日数 | | | | | | | | | | | | ビブリオ病による 斃死尾数 | ビブリオ病による 斃死率(%) | 有効率 | | |
|-------------------|------|------|------|---|---|----|----|---|---|---|---|----|----|----|------------------|--------------------|-----|------|------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | | | 13 | 14 |
| 1.6×10^4 | 試験区 | 30 | | | | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | 3 | 10.0 | 89.3 |
| | 対照区 | 30 | | | | 11 | 11 | 5 | 1 | | | | | | | | 28 | 93.3 | |
| 1.6×10^3 | 試験区 | 30 | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0 | 100 |
| | 対照区 | 30 | | | | | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 4 | 4 | | | 18 | 60.0 | |
| 1.6×10^2 | 試験区 | 30 | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0 | 31.1 |
| | 対照区 | 30 | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0 | |

供試魚平均体重：4.9g，水温：19.3～20.7℃

2. 第2回目(免疫88日目)攻撃試験成績を表5, 6に示した。V-1株の斃死率は 6.0×10^7 個/mlの攻撃菌数では試験区が20%，対照区が33.3%， 6.0×10^6 個/mlでは試験区が6.7%，対照区3.3%，また 6.0×10^5 ， 10^4 個/mlでは両区とも0%であり，各攻撃菌数において斃死率は低く，両区間に大差はみられなかった。V-2株の斃死率は試験区で0%，対照区では53.3%となり，有効率は対照区の斃死率が60%に達せず算定できなかった。

表5 免疫88日目におけるV-1株の浸漬による攻撃試験成績

| 攻撃菌数 (個/ml) | 試験区分 | 供試尾数 | 経過日数 | | | | | | | | | | | | | | ビブリオ 病による 斃死尾数 | ビブリオ 病による 斃死率(%) | 有効率 |
|-------------------|------|------|------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----------------------|------------------------|------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | | | |
| 6.0×10^7 | 試験区 | 30 | | | | 1 | 1 | 3 | | 1 | | | | | | | | 6 | 20.0 |
| | 対照区 | 30 | | | | 3 | 4 | 2 | 1 | | | | | | | | | 10 | 33.3 |
| 6.0×10^6 | 試験区 | 30 | | | | | | 1 | 1 | | | | | | | | | 2 | 6.7 |
| | 対照区 | 30 | | | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 | 3.3 |
| 6.0×10^5 | 試験区 | 30 | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0 |
| | 対照区 | 30 | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0 |
| 6.0×10^4 | 試験区 | 30 | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0 |
| | 対照区 | 30 | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0 |

供試魚平均体重：6.2g，水温：19.8～20.6℃

表6 免疫88日目におけるV-2株の浸漬による攻撃試験成績

| 攻撃菌数 (個/ml) | 試験区分 | 供試尾数 | 経過日数 | | | | | | | | | | | | | | ビブリオ 病による 斃死尾数 | ビブリオ 病による 斃死率(%) | 有効率 |
|-------------------|------|------|------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----------------------|------------------------|------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | | | |
| 2.7×10^5 | 試験区 | 30 | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0 |
| | 対照区 | 30 | | | | 2 | 7 | 2 | 2 | 2 | | 1 | | | | | | 16 | 53.3 |

供試魚平均体重：6.1g，水温：20.0～20.4℃

考 察

*V. anguillarum*と推定されるV-2株については、第1回目の攻撃試験においてワクチンの有効性が認められ、第2回目においても、有効率は算定できなかったが試験区と対照区の斃死率には明らかな差がみられ、また対照区の斃死率が60%に近いことから、免疫88日目においてもワクチンはほぼ有効であったと考えられる。一方、V-1株については第1回目の攻撃試験において若干高い有効率を示したが、腹腔内接種による方法は浸漬と比べ信頼性が低いことや第2回目において試験区と対照区との斃死率に大差がなく、*V. ordalii*に対するワクチンの顕著な効果は認められなかった。