農林水産業競争力アップ技術開発事業

「アユ種苗における冷水病対策技術の開発」

河合俊輔

目　　的

冷水病はアユの代表的な疾病であり，県内の養殖業者や河川において頻繁に発生しており，時に大量へい死を引き起こすため，アユ養殖業者や漁協の経営を圧迫する原因の一つとなっている。治療薬として経口投与の抗菌剤が承認されているが，感染の程度によっては効果を発揮しない場合や再発事例もあり，冷水病被害を十分に軽減できない状況にある。

本研究はアユ種苗の健全性診断技術を確立するとともに，冷水病菌の除菌技術や冷水病耐性を獲得したアユ種苗の作成技術を確立することにより，冷水病による経済的損失を軽減させることを目的としている。今年度は，新たに改良が加えられたワクチンについて，冷水病細菌による攻撃試験を行い，有効性を評価した。

方　　法

1.供試魚・試験区

供試魚は冷水病感染歴の無い人工産アユ（平均 6.8g）とした。設定区はワクチン接種区とワクチン非接種区（対照区）とし，これを 2 組（試験 1,2）設定した。各区約 190L の FRP 水槽を使用し，全ての水槽に供試魚を 27 尾ずつ収容した。

2.ワクチン

一般財団法人松岡科学研究所から提供を受けた冷水病菌体超音波処理ワクチン（Whole-Cell Sonicate vaccine：WCS ワクチン）と冷水病細菌由来のコラゲナーゼを使用した。WCS ワクチンは，冷水病細菌 SG08 株培養液を濃縮，ホルマリンによる不活化，さらに 10 分間の超音波処理により菌体の破砕処理を行い，保存剤として 0.3%ホルマリン，溶剤としてリン酸緩衝生理食塩水（PBS(-)）で調整して作成された。コラゲナーゼは大腸菌発現系（JM109/pUC18-fpcol）により得られ，大腸菌培養液を遠心して得られた上清中の菌体を 0.22μm のフィルターで完全に除去し，終濃度 0.3%となるようにホルマリンを添加して作成された。WCS ワクチンは原液の 10 倍希釈，コラゲナーゼは 20 倍希釈で，魚体重の 4 倍量のワクチン溶液に通気しながら供試魚を浸漬させて接種した。1 回の接種につき，コラゲナーゼ 30 分，次いで WCS ワクチン 30 分の順に浸漬し，2 週間後に再度 2 回目の接種を行った。

3.攻撃試験

攻撃試験の冷水病細菌には，滋賀県で分離された *Flavobacterium psychrophilum* SG-150804 株を使用した（一般財団法人松岡科学研究所提供）。SG-150804 株は 1/2CGY 液体培地 100ml で 15℃，48 時間培養した後，さらに 1L の 1/2CGY 液体培地に 1 回目の培養液を全量入れ，48 時間培養し希釈したものを攻撃菌液とした。攻撃は，2 回目のワクチン接種から 16 日後に，全ての供試魚に魚体重の 4 倍量の菌液で通気しながら 30 分間浸漬した。初回の攻撃によるへい死数が少なかったため，それから 17 日後に再度同じ方法で攻撃した。生菌数は，試験 1 では 1.7×10^{8}CFU/ml，試験 2 では 4.3×10^{8}CFU/ml であった。

4.攻撃後の飼育観察

1 回目の攻撃から 17 日間と 2 回目の攻撃から 3 週間飼育した。水温は 15.0±1℃となるよう注水量を調整し，供試魚のへい死数を記録した。へい死魚は症状を確認した後，鰓組織又は腎臓からの菌分離により得られたコロニーを PCR で冷水病菌かどうか同定した。終了後の累積へい死率から有効率（：RPS＝1-（ワクチン接種群のへい死率/ワクチン非接種群のへい死率）(%)）を算出した。すでに承認されているビブリオ病ワクチンの開発試験に

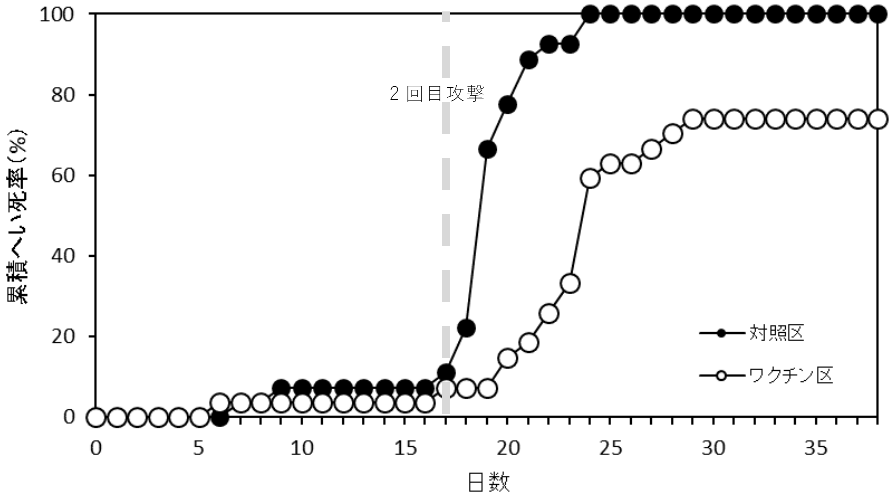
おける目標有効率は 60%[1]とされ，当試験でも 60%の有効率を目標とした。

結果及び考察

へい死魚は，口周辺又は体表に発赤の症状を呈し，PCR 検査により陽性が確認されたため，冷水病によるへい死であることが確認された。試験 1 では，対照区が 2 回目の感染から 7 日間で全数がへい死したのに対し，ワクチン区の累積へい死率は 74.1%となった。ワクチン区の累積へい死率は対照区に比べて有意に少ないことが確認され（フィッシャーの正確確率検定，$p < 0.01$），有効率は 25.9%となった。試験 2 では，対照区の累積へい死率が 66.7%に対し，ワクチン区は 55.6%となった。この結果は統計的に有意差がなく（フィッシャーの正確確率検定，$p > 0.05$），有効率は 16.9%となった。

いずれの試験も，ワクチン区のへい死率は対照区を下回り，累積へい死率のピークを迎えるのが対照区に比べて遅いことが確認されたが，目標の有効率 60%に達することはなく，平成 27 年度試験の結果（海産アユ:RPS=68.2%, 50%）[2]に比較しても有効率は低い結果となった。

冷水病ワクチンは注射による接種（アジュバンド添加）で高い有効率が得られており[3]，今回の浸漬による接種では，アユ体内へのワクチンの取り込み量が少ない可能性が示唆された。今後は，ワクチンの取り込み量を増やすため，ワクチンの不活化時間の調整や菌体の破砕方法等を改良することで，有効率が向上するか検討する余地があるものと考えられる。



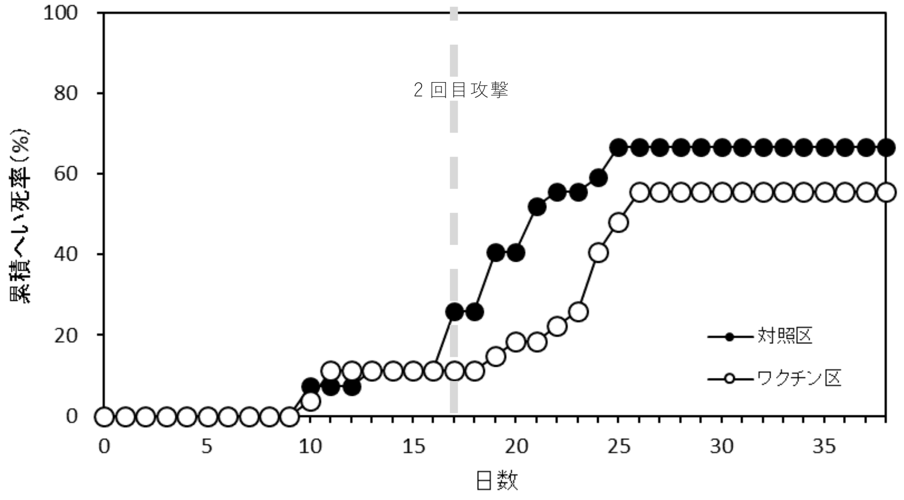


図 1　ワクチン試験における累積へい死率の推移

文　　献

1) 見奈美輝彦（1983）アユのビブリオ病に対するワクチン効果．昭和 56 年度和歌山県水産試験場事業報告, 45-50.

2) 中山仁志・葦澤崇博（2016）農林水産業競争力アップ技術開発事業「アユ種苗における冷水病対策技術の開発」．平成 27 年度和歌山県水産試験場事業報告, 66-69.

3) Rahman M. et al. (2000) Efficacy of Oil-adjuvanted Vaccine for Coldwater Disease in Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathology*, 35(4), 199-203