

Ⅳ ワクチン実用化研究

あゆビブリオ病ワクチンの効能拡大

小 川 健

目 的

魚類養殖の進展に伴って防疫対策の必要性が高まり、その効果的な手段であるワクチンの開発が強く望まれている。しかし、現在、水産用ワクチンとして認可されているのは、あゆおよびにじますビブリオ病不活化ワクチンだけであり、他の魚種、疾病に対するワクチン開発が急がれている。海産魚でもブリの類結節症、連鎖球菌症、ヒラメのエドワジェラ症などの研究が行なわれているが、実用化には至っていないのが現状である。

本研究では、既に実用化されたあゆビブリオ病不活化ワクチンを用いて、ヒラメ稚魚に対する安全性試験、臨床試験および薬理試験と、シマアジ稚魚に対する薬理試験を実施し、これらの魚種への効能拡大のための知見の集積を図る。

1. ヒラメ安全性試験

ヒラメ稚魚にワクチンを投与し、その安全性について検討した。

材 料 お よ び 方 法

供試ワクチン：あゆビブリオ病不活化ワクチン（日生研製）。ビブリオ アングイラルム A型菌，PT-479株 不活化前生菌数 10^{11} 個以上。以後の試験は全て同じワクチンを使用。

供試魚：ヒラメ稚魚平均全長 44.7 mm（大型群）および 27.2 mm（小型群）の2群。

試験区および尾数：ワクチン原液区，10倍希釈（ 10^{-1} ）区および対照区。各区大型群は20尾，小型群は50尾。

ワクチン投与方法：ワクチン区は浸漬率20%で10分間浸漬，対照区は無処理。ワクチン浸漬中は O^2 ガスを通気。

安全性の判定方法：ワクチン浸漬中および以後2週間の体色，遊泳状態，摂餌等に及ぼす影響を観察し，安全性を判定。

飼育方法：ワクチン投与後，30ℓ水槽で配合飼料を給餌し，流水で飼育。

試験期間：平成4年4月2日から4月15日まで。

結果 および 考察

ワクチン投与時のヒラメ稚魚の反応を表1に示した。ワクチン液温度は18.6~19.3°Cで、両群とも浸漬中は興奮遊泳がみられ、10⁻¹区では浸漬終了まで続いた。原液区では1分後には静止するに至ったが、音や振動の刺激には敏感に反応した。

表1 ワクチン投与時のヒラメ稚魚の反応

経過時間 (分)	小型群 (27.2 mm)		大型群 (44.7 mm)	
	10 ⁻¹ 区 (19.3°C)*	原液区 (19.0°C)	10 ⁻¹ 区 (18.8°C)	原液区 (18.6°C)
0	興奮遊泳	興奮遊泳	興奮遊泳	興奮遊泳
1	〃	静止, 刺激には敏感	〃	静止, 刺激には敏感
5	〃	〃	〃	〃
10	〃	〃	〃	〃
清水に戻す	数尾ふらつく 他は着底 1~2分で回復 体色異常なし	全魚沈下3尾反転 2分以内に回復 体色異常なし	全魚直ちに着底 体色異常なし	全魚直ちに着底 体色異常なし
60	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし

*: ワクチン液温度

浸漬終了後、清水に戻すと、小型群の10⁻¹区で数尾ふらつく魚があり、原液区では全部の魚がゆっくりと沈下し、うち3尾は反転したままであったが、いずれも2分以内に回復した。これに対し大型群では全魚直ちに着底した。体色の異常は全ての区でみられなかった。

60分後にも全区異常なく、当日夕方の摂餌も通常どおりであった。

ワクチン浸漬後2週間の飼育結果を表2に示した。期間中の水温は16.3~19.3°C, 平均18.0°C

表2 ヒラメ安全性試験結果

区	内容	経過日数														計	斃死率 (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
1	小型群対照	0 ^{*1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	〃 10 ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	〃 原液	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 ^{*2}	0	0	0	1	2
I	大型群対照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	〃 10 ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	〃 原液	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*1: 斃死尾数

*2: 共食いによる斃死

であった。小型群原液区で11日目に1尾斃死がみられたが、これは水槽内の大きい個体に頭部を噛まれ、狂奔斃死したものであった。その他の区に斃死はなく、全区とも異常は認められなかった。

ワクチン浸漬中小型群の原液区で前述のような状態がみられたものの、回復は速やかであり、 10^{-1} 区でみられた様子は通常の選別や取り上げ作業時のストレスによってもみられること、また浸漬後の飼育期間中も異常は認められないことから、あゆビブリオ病ワクチンのヒラメ稚魚に対する安全性には、とくに問題はないと思われた。

2. ヒラメ臨床試験

放流用として中間育成されている種苗にワクチンを投与し、飼育現場における有効性を検討した。

材 料 お よ び 方 法

供試魚：海面小割生簀で育成中の平均全長 29.6 mm の稚魚。

試験区および尾数：ワクチン区 6,012尾，対照区 6,041尾。

ワクチン投与方法：ワクチン区は100倍希釈 (10^{-2}) 液に浸漬率20%で10分間浸漬，対照区は無処理。

有効性の判定方法：自然発病による斃死率の差によって判定し，発病のない場合は放流前に一部を取上げて攻撃試験を実施。

飼育方法：海面の筏に設置した $3 \times 3 \times 2$ m のモジ網小割に収容し，配合飼料を給餌。なお斃死は朝夕に取り上げ，鮮度のよいものは検鏡と菌分離により斃死原因調査を行なう。

試験期間：平成4年3月27日から約2カ月間。

結 果

ワクチン浸漬は 15.2°C で行ない，浸漬終了後直ちに小割網に戻したところ20～30尾が緩慢な遊泳状態を示したが，約20分後には回復した。

両区ともビブリオ病（血清型A）の自然発病はなく，成育は順調であったが，4月下旬からともに原因不明の斃死が始り，5月末の放流予定時以降も続いた。生残率がワクチン区17.3%，対照区22.7%となったため，攻撃試験用の供試魚としては不相当と判断して臨床試験を中止した。

3. ヒラメ薬理試験

臨床試験によるヒラメ稚魚に対するワクチンの有効性が検討できなかったため，別途試験場内で飼育していた稚魚を用いて薬理試験を行なった。

材 料 お よ び 方 法

供試魚：平均全長 88.0 mm の稚魚。

試験区および尾数：ワクチン区 100尾，対照区 100尾。

ワクチン投与方法：100倍 (10^{-2}) 希釈ワクチン液に20%の浸漬率で10分間浸漬，対照区は無処理。
 有効性判定方法：ワクチン投与後，2カ月間飼育したのち，両区とも1群20尾，3群ずつ取り上げ，*Vibrio anguillarum* SG-7754の真空凍結乾燥株から起こした1% NaCl B H I ブイヨン培養菌を用いて， 10^3 ， 10^4 および 10^5 CFU/尾を培地共に背部筋肉に接種し，それぞれ2週間飼育して，ビブリオ病による斃死率の差により有効性を判定する。

なお，真空凍結乾燥した *V. anguillarum* SG-7754株は，共立商事(株)が，アユにおけるビブリオ病ワクチンの攻撃試験に使用したもので，同商事より分与を受けた。

飼育方法：ワクチン投与後は500ℓ水槽，攻撃後は100ℓ水槽を用い，配合飼料を給餌して，流水で飼育する。

試験期間：平成4年6月9日から8月21日(6月9日ワクチン投与，8月8日攻撃)

結果および考察

試験期間中の水温は21.2～28.2℃で，攻撃後は26.2～27.4℃で推移した。

攻撃後の斃死状況を表3に示した。ワクチン区，対照区ともに斃死が全くなく，ワクチンの有効性については検討できなかった。

表3 ヒラメ薬理試験攻撃後の斃死状況

区	内容	攻撃菌濃度	経過日数														斃死率 (%)	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		計
1	ワクチン区	8.9×10^5	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	〃	8.9×10^4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	〃	8.9×10^3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	対照区	8.9×10^5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	〃	8.9×10^4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	〃	8.9×10^3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*：斃死尾数

攻撃に先立ち実施した予備試験では， $10^4 \sim 10^6$ CFU/尾の菌浴では発病せず，ヒラメに対する病原性はそれほど強くないことが推察された。しかし， 10^7 CFU/尾の腹腔内接種では3日間で100%の斃死率が得られたことから，攻撃は $10^4 \sim 10^6$ CFU/尾の筋肉内接種で十分と考え実施した。本試験では結果的に攻撃菌数はやや少なくなり，1オーダー低下したものの，斃死が全くでなかったことは，*V. anguillarum* (血清型A)のヒラメに対する病原性について，魚体のサイズによる違いや飼育水温の影響等，あらためて検討する必要があると思われた。

4. シマアジ薬理試験

シマアジに対するあゆビブリオ病不活化ワクチンの有効性について，薬理試験により検討した。

材料および方法

供試魚：平均全長121.5 mm，平均体重20.7 gの人工種苗0年魚。

試験区および尾数：ワクチン区 1群20尾計3区，対照区1群20尾計3区。

ワクチン投与方法：100倍希釈 (10^{-2}) ワクチン液に20%の浸漬率で10分間浸漬，対照区は無処理。

有効性判定方法：ワクチン投与後2カ月間飼育し，*V. anguillarum* SG-7754株を用いて攻撃方法について予備試験を行ない，適切な攻撃方法による両区の斃死率の差で有効性を判定する。

飼育方法：200ℓ水槽を用い，配合飼料を給餌して流水飼育した。なお，斃死魚は朝夕取り上げ，腎臓から菌分離を行なって斃死原因を調べる。

試験期間：平成4年6月18日から8月30日（6月18日ワクチン投与，8月17日攻撃）

結果および考察

試験期間中の飼育水温を図1に示した。攻撃方法の予備試験は8月13日から実施し，その結果を図2に示した。 $1.1 \times 10^5 \sim 10^7$ CFU/mlの菌液に浸漬した区では斃死はみられず， $10^5 \sim 10^7$ CFU/尾の腹腔内接種区で20~100%の斃死率が得られたので，この菌量での腹腔内接種が攻撃方法として適当と思われた。

薬理試験攻撃後の斃死状況を表4，図3に示した。接種菌数は設定した菌数の約1/2程度となったが，病原性は逆に強く現れ， 10^6 区でワクチン区100%，対照区95%， 10^5 区でワクチン区85%，対照区95%の斃死率となった。また 10^4 区ではワクチン区0%，対照区10%と斃死率は低くなり，いずれの接種菌量でもワクチンの有効性を検討する適当な斃死率は得られなかった。

シマアジにおいてもヒラメと同じく，アユと比較して極めて大量の菌を接種しなければ斃死しないことから，あゆビブリオ病不活化ワクチンの効力確認のための薬理試験は，病

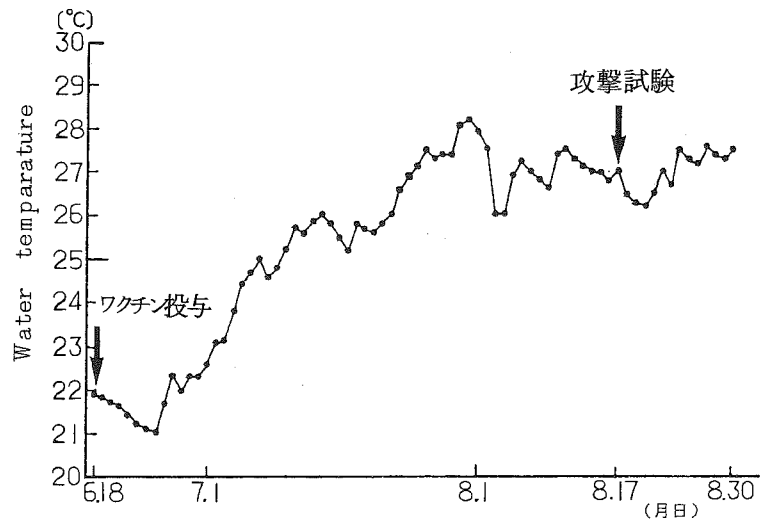


図1 試験期間中の飼育水温

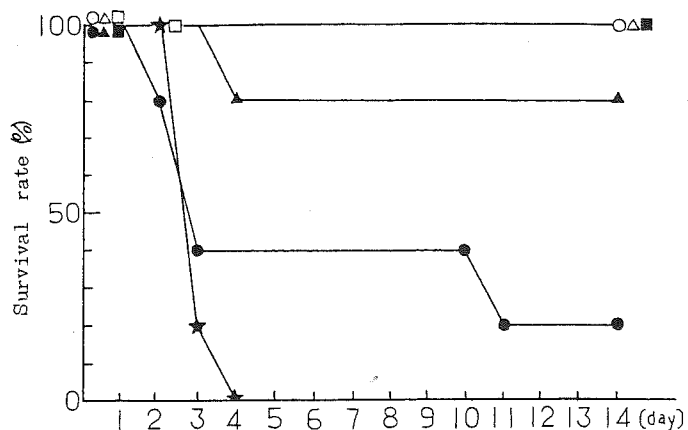


図2 シマアジ攻撃予備試験結果

- : 1.1×10^7 CFU/ml 菌液浸漬区
- △: " 10^6 " "
- : " 10^5 " "
- : 1.1×10^6 CFU/Fish 腹腔内接種区
- ▲: " 10^5 " "
- : " 10^4 " "
- ★: " 10^7 " "

表4 シマアジ薬理試験攻撃後の斃死状況

区	内容	攻撃菌濃度															斃死率		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	計	(%)	
1	ワクチン区	4.6×10^6	19*	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	100
2	〃	4.6×10^5	10	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	85
3	〃	4.6×10^4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	対照区	4.6×10^6	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	95
5	〃	4.6×10^5	17	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	95
6	〃	4.6×10^4	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10

*:斃死尾数

原性について検討したうえで攻撃方法を確立し、あらためて行なう必要があると思われる。それとともに、シマアジやヒラメ、トラフグ、マダイなどに強い病原性を持つ、血清型Cタイプの *V. anguillarum* のワクチンについても、今後検討する必要もあると考えられる。

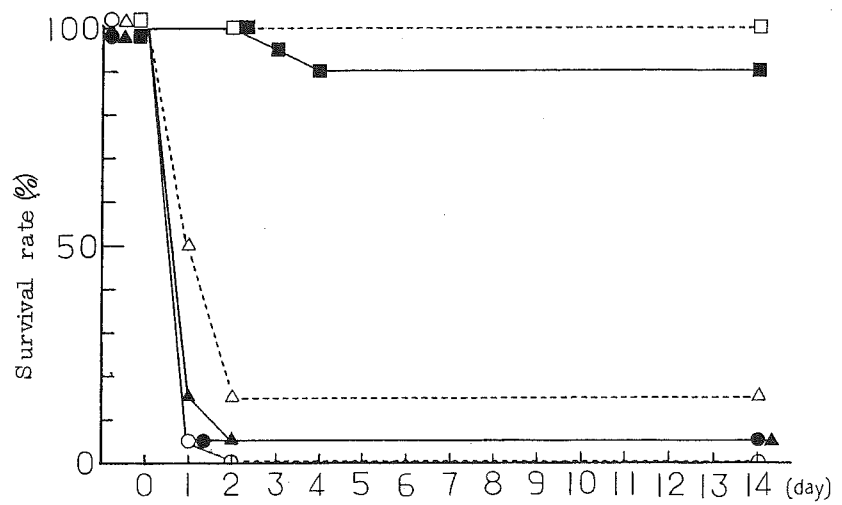


図3 シマアジ攻撃試験結果

○: ワクチン区 4.7×10^6 CFU/Fish ●: 対照区 4.7×10^6 CFU/Fish
 △: " 10^5 " ▲: " 10^5 "
 □: " 10^4 " ■: " 10^4 "

調査結果登載印刷物

平成4年度魚病対策技術開発研究成果報告書 平成5年9月(予定)(社)日本水産資源保護協会