

アユのシュードモナス病・冷水病アジュバント混合不活化ワクチンの予防効果

宇野悦央

アユの冷水病は1992年以降多発しており、多大な被害を及ぼし問題となっている。¹⁾さらに、シュードモナス病(=細菌性出血性腹水病²⁾)も1994年以降は冷水病に次いで発生が多いうえに、^{1) 3)}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、⁴⁾これらの疾病に対するワクチンの開発が強く求められている。このため、アユのシュードモナス病・冷水病アジュバント混合不活化ワクチンの腹腔内接種による安全性および有効性について検討した。なお、本試験は社団法人日本水産資源保護協会の委託事業である水産用医薬品調査事業として実施したものである。

試料および方法

試験期間 平成12年6月13日～9月5日(Ⅰ期:6月13日～7月11日,Ⅱ期:7月12日～8月8日,Ⅲ期:8月9日～9月5日)

供試魚 供試魚は、本県沿岸地先海面で採捕された海産稚アユを養成したもので、各区300尾ずつ用いた。Ⅰ期の平均体重はワクチン区13.0g,対照区13.1g,Ⅱ期はワクチン区19.2g,対照区19.5g,Ⅲ期はワクチン区30.8g,対照区29.8g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Ⅰ期0.2～0.4回/時,Ⅱ期0.5～0.7回/時,Ⅲ期0.7回/時とした。水温はⅠ期16.1～20.5℃(平均18.0℃),Ⅱ期18.0～21.2℃(平均19.6℃),Ⅲ期19.9～21.0℃(平均20.2℃)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3回/日与えた。

ワクチンの種類及び投与方法 供試ワクチンは、滋賀県のアユ病魚腎臓から分離されたシュードモナス病菌FPC941株⁵⁾と徳島県のアユから分離された冷水病菌FPC840株⁶⁾を用いて株式会社共立商事中央研究所が作製したアユシュードモナス病・冷水病2種混合アジュバント不活化ワクチンLot. 1で、平成12年6月13日に投与した。不活化ホルマリン濃度はシュードモナス病不活化ワクチンが0.8V/V%,冷水病不活化ワクチンが0.3V/V%で、不活化前生菌数はシュードモナス病不活化ワクチンが 1.7×10^{10} CFU/ml,冷水病不活化ワクチンが 6.1×10^8 CFU/mlである。供試ワクチンは、これら2種ワクチンの等量混合液を重量比で3容とアジュバント(ISA763A)7容を攪拌機で混合したものである。ワクチンの投与は、腹鰭基部後方の腹腔内にエッペンピペット4780を用いて1尾当たり0.05ml接種した。投与された不活化菌数はシュードモナス病不活化ワクチンが 1.3×10^8 CFU/尾,冷水病不活化ワクチンが 4.6×10^6 CFU/尾であり、対照区には生理食塩水を同様に接種した。

人為感染方法 シュードモナス病人為感染用菌株はワクチン作製株と同じFPC941株で、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当たり 1.4×10^5 CFUまたは 1.7×10^5 CFUの菌液を調整して、これらを生理食塩水で希釈し、所定の菌液を得た。冷水病人為感染用菌株

は平成4年4月に本県の養殖アユ病魚から分離された冷水病菌92F1-0423株で、改変サイトファガ寒天培地を用いて18℃で24時間培養を3回繰り返した後、滅菌淡水の希釈により、1ml当り 3.8×10^9 CFU、 6.8×10^9 CFUまたは 7.4×10^9 CFUの菌液を得、これらを滅菌淡水で希釈して所定の菌液を調整した。このように調整された各菌液を、免疫後4週目の供試魚（平均体重：各区約19g）、免疫後8週目の供試魚（平均体重：各区約30g）および免疫後12週目の供試魚（平均体重：ワクチン区45.3g、対照区44.3g）に、冷水病菌はツベルクリン注射器により背鰭後端と側線間の皮下に、シュードモナス病菌はエッペンピペット4780により腹腔内にそれぞれ0.05mlずつ接種し、その後2週間観察した。観察期間中の水温はシュードモナス病人為感染では4週目18.4～20.0℃（平均19.2℃）、8週目18.5～19.8℃（平均18.9℃）、12週目18.6～19.6℃（平均19.2℃）であり、冷水病人為感染では4週目16.2～16.8℃（平均16.5℃）、8週目17.1℃～18.3℃（平均17.7℃）、12週目16.3～16.7℃（平均16.5℃）であった。

結果および考察

飼育結果を表1に示した。へい死は各試験区ともなく、摂餌や成長も良好であった。しかし、人為感染後の供試魚の腹腔内には表2に示したようにアジュバントの残留が目視により認められたことから、食品衛生面からの検討が必要であると考えられる。

表1 飼育結果

試験区	I 期		II 期		III 期	
	ワクチン区	対照区	ワクチン区	対照区	ワクチン区	対照区
開始時総重量(kg)	3.89	3.94	3.46	3.51	1.82	1.79
" 尾数	300	300	180	180	59	60
" 平均体重(g)	13.0	13.1	19.2	19.5	30.8	29.8
終了時総重量(kg)	5.86	5.83	5.45	5.40	2.67	2.66
" 尾数	300	300	180	180	59	60
" 平均体重(g)	19.5	19.4	30.3	30.0	45.3	44.3
へい死尾数	0	0	0	0	0	0
生残率(%)	100	100	100	100	100	100
給飼量(kg)	2.410	2.410	2.365	2.365	0.74	0.755
増重量(kg)	1.97	1.89	1.99	1.89	0.85	0.87
飼料効率(%)	81.7	78.4	84.1	79.9	114.9	115.2
日間給飼率(%)	1.65	1.64	1.71	1.71	1.06	1.09
日間成長率(%)	1.35	1.29	1.44	1.37	1.22	1.26
増重倍率	1.5	1.5	1.6	1.5	1.5	1.5
飼育日数	29	29	27	27	28	28

表2 人為感染後のアジュバント残留率

免疫後日数	シュードモナス病感染群	冷水病感染群
4～6週	18.6	30.0
8～10週	31.0	13.3
12～14週	4.0	8.0

シュードモナス病人為感染結果を表3～5に示した。免疫後4週目におけるワクチン区の有効率はいずれの濃度とも50%以上あり、しかもFisherの直接確立計算法による検定で有意差が認められた。8週目においてもワクチン区の有効率は高濃度区で42.6%、低濃度区で84.5%を示し、それぞれ有意差が認められた。12週目においては有効率は17.4%と低下したが、対照区のへい死率が60%を越えた時点での有効率を算出するRPS60は52.9%あり、免疫後12週目までワクチンの有効性が持続していると考えられた。

表3 人為感染による成績（免疫後4週目）シュードモナス病

接種濃度 (CFU/尾)	試験 区分	供試 尾数	経過日数														総へい死 尾数	へい死 率(%)	RPS (%)	Fisherの直接 確立計算法
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13				
0.7×10 ³	ワクチン区	30					2	7	2	2							13	43.3	53.6	P<0.001
	対照区	30					3	18	5	2							28	93.3		
1.4×10 ³	ワクチン区	30					2	4	3						1		10	33.3	50.0	P<0.05
	対照区	30					6	11	1	1						1	20	66.7		

水温：18.4～20.0℃（平均19.2℃）

RPS = (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

表4 人為感染による成績（免疫後8週目）シュードモナス病

接種濃度 (CFU/尾)	試験 区分	供試 尾数	経過日数														総へい死 尾数	へい死 率(%)	RPS (%)	Fisherの直接 確立計算法
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13				
0.7×10 ³	ワクチン区	30*					2	8	2	1	1					1	15	53.6	42.6	P<0.01
	対照区	30					23	5									28	93.3		
1.4×10 ³	ワクチン区	30								2							2	6.7	84.5	P<0.01
	対照区	30					3	8	1							1	13	43.3		

水温：18.5～19.8℃（平均18.9℃）

* 内2尾は跳び出しによりへい死

表5 人為感染による成績（免疫後12週目）シュードモナス病

接種濃度 (CFU/尾)	試験 区分	供試 尾数	経過日数														総へい死 尾数	へい死 率(%)	RPS (%)	Fisherの直接 確立計算法
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13				
8.5×10 ³	ワクチン区	25					8	7	3	1							19	76.0	17.4	NS
	対照区	25					3	14	6								23	92.0		

水温：18.6～19.6℃（平均19.2℃）

* RPS60：52.9%（P<0.05 Fisherの直接確立計算法）

冷水病人為感染結果は表6～8に示したとおりである。免疫後4週目におけるワクチン区の有効率は高濃度区で60%であり、しかも有意差が認められた。8週目においてはワクチン区の有効率は低濃度区で77.8%であり、有意差が認められたが、高濃度区では対照区のへい死率が低かったため有効性を評価するには至らなかった。また、12週目においては有効率は31.3%と低く、有意差も認められなかった。

表6 人為感染による成績（免疫後4週目）冷水病

接種濃度 (CFU/尾)	試験 区分	供試 尾数	経過日数														総へい死 尾数	へい死 率(%)	RPS (%)	Fisherの直接 確立計算法	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13					14
1.9×10 ⁸	ワクチン区	30					1	1	2						2			6	20.0	60.0	P<0.05
	対照区	30					4	3	1	1					2		4	15	50.0		
1.9×10 ⁷	ワクチン区	30								2					1			3	10.0	57.1	NS
	対照区	30					1	1	2	1					1	1		7	23.3		

水温：16.2～16.8℃（平均16.5℃）

RPS = (1 - 試験区の冷水病によるへい死率 / 対照区の冷水病によるへい死率) × 100

表7 人為感染による成績（免疫後8週目）冷水病

接種濃度 (CFU/尾)	試験 区分	供試 尾数	経過日数														総へい死 尾数	へい死 率(%)	RPS (%)	Fisherの直接 確立計算法		
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13					14	
3.4×10 ⁸	ワクチン区	30			1	6	2	1							1	1		12	40.0	-71.4	NS	
	対照区	30			1	3	1				1						1	7	23.3			
3.4×10 ⁷	ワクチン区	30															1	1	2	6.7	77.8	P<0.05
	対照区	30					2	1	4	2								9	30.0			

水温：17.1～18.3℃（平均17.7℃）

表8 人為感染による成績（免疫後12週目）冷水病

接種濃度 (CFU/尾)	試験 区分	供試 尾数	経過日数														総へい死 尾数	へい死 率(%)	RPS (%)	Fisherの直接 確立計算法	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13					14
3.7×10 ⁸	ワクチン区	25					4	6		1								11	44.0	31.3	NS
	対照区	25					5	5	2	2					1		1	16	64.0		

水温：16.3～16.7℃（平均16.5℃）

このように、アユのシュードモナス病・冷水病アジュバント混合不活化ワクチンの安全性および有効性について試験したところ、生残率や成長は良好であったが、腹腔内にアジュバントの残留が認められたことから食品衛生面からの検討が必要であると考えられた。また、有効性についてはシュードモナス病に対して免疫後12週目まで免疫効果があり、冷水病についても有効性は認められるも

ののシュードモナス病より効果の持続性は低いと考えられた。しかし、冷水病に対する人為感染強度が低かったことから冷水病に対する有効性の評価は十分ではなく、さらに検討が必要であると思われる。

文 献

- 1) 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 1996; **21**: 19-24.
- 2) 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 1996; **31**: 239-240.
- 3) 宇野悦央, 奥山芳生, 加藤邦彰. 養殖水産動物保健安全対策. 平成10年度和歌山県和歌山県農林水産総合技術センター内水面漁業センター事業報告 2000; **24**: 21-27.
- 4) 宇野悦央, 加藤邦彰, 見奈美輝彦. 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 1999; **23**: 11-15.
- 5) 二宮浩司, 山本充孝. アユの細菌性出血性腹水病に対するオイルアジュバント添加ワクチンの予防効果. 魚病研究 2001; **36**: 183-185.
- 6) Wakabayashi, H., Toyama and T. Iida. A Study on Serotyping of *Cytophaga psychrophila* Isolated from Fishes in Japan. Fish Pathology 1994; **29**: 101-104.