

アユの冷水病に対するワクチンの予防効果 - I

宇野悦央

アユの冷水病は平成4年以降多発しており、多大な被害を与えている。¹⁾ 本疾病に対しては主に投薬による治療が行われているが、へい死は減少するものの再発する場合が多く、ワクチンの開発が強く求められている。このため、ワクチンとして植物性オイルアジュバントを添加したものと無添加のものを用いて、腹腔内接種による冷水病の予防効果について検討した。

材料および方法

試験期間 平成11年7月7日～9月1日

(I期: 7月7日～8月4日, II期: 8月5日～9月1日)

供試魚 平成11年3月に搬入した海産稚アユを養成したもので、病歴および投薬歴はなく、平均体重はいずれのワクチン区とも9.9g, 対照区9.7gであり各区100尾ずつ供試した。

飼育条件 飼育池は3×2×0.5m(水深0.33m, 水量2.0m³)で、十分通気を行った。用水は河川伏流水で、換水率はI期0.3～0.5回/時, II期0.5～0.7回/時とした。水温はI期16.3～20.6℃(平均18.2℃), II期17.3～18.9℃(平均18.2℃)であった。飼料は市販のアユ用配合飼料を用い、自動給飼機により4回/日与えた。

ワクチンの種類および投与方法 供試ワクチンは、平成4年4月に本県の養殖アユ病魚から分離された92F1-0423株を用いて当センターが作製したアユ冷水病不活化ワクチンであり、平成11年7月7日に投与した。不活化ホルマリン濃度は0.3v/v%で、不活化前生菌数は 3.5×10^9 CFU/mlであり、投与時まで4℃で保存した。菌液は、改変サイトファガ寒天培地で18℃4日間培養したものを改変サイトファガブイオンで18℃2日間培養した後、馬血清10%添加改変サイトファガ寒天培地で18℃、3日間培養した菌体を懸濁し、さらに24時間培養することにより得た。アジュバントの添加は、ワクチン3に対してアジュバント7の体積割合で接種直前に連結針付きの注射器により乳化するにより行った。アジュバントはセピック社(仏)の植物性オイルアジュバントであるMontanide ISA711を用いた。なお、このアジュバントは水産庁養殖研究所から分与されたものである。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尾当り0.05ml接種した。投与した不活化菌数はアジュバント添加ワクチン区(以下アジュバント区と称す)で 5.0×10^7 CFU/尾, アジュバントを添加していないワクチン区(以下無添加区と称す)で 1.7×10^8 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 使用菌株はワクチン作成株と同じ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 3.4×10^9 CFUまたは 2.8×10^9 CFUの菌液を調整して、これを滅菌淡水で10倍段階希釈して所定の菌液を得た。このように調整された各菌液を、免疫後4週目の供試魚(平均体重約18g)および免疫後8週目の供試魚

(平均体重約35g) にツベルクリン注射器で背鰭後端と側線の間0.05mlずつ皮下接種し、その後2週間程度観察した。観察期間中の水温は1回目15.7~16.9℃(平均16.3℃)、2回目15.8~16.7℃(平均16.1℃)であった。

結果および考察

飼育結果を表1に示した。アジュバント区で接種後5日目から5日間程度摂餌が劣ったもののその後は良くなった。へい死はいずれの試験区ともなく、成長や飼料効率も良好であった。

表1 飼育結果

試験区	I期			II期		
	アジュバント区	無添加区	対照区	アジュバント区	無添加区	対照区
開始時総重量(kg)	0.99	0.99	0.97	0.47	0.46	0.44
" 尾数	100	100	100	25	25	25
" 平均体重(g)	9.9	9.9	9.7	18.8	18.4	17.6
終了時総重量(kg)	1.81	1.81	1.72	0.9	0.89	0.85
" 尾数	100	100	100	25	25	25
" 平均体重(g)	18.1	18.1	17.2	36.0	35.6	34.0
へい死尾数	0	0	0	0	0	0
生残率(%)	100	100	100	100	100	100
給飼量(kg)	0.82	0.845	0.845	0.369	0.369	0.369
増重量(kg)	0.82	0.82	0.75	0.43	0.43	0.41
飼料効率(%)	100.0	97.0	88.8	116.5	116.5	111.1
日間給飼率(%)	2.02	2.08	2.17	1.92	1.95	2.04
日間成長率(%)	2.02	2.02	1.92	2.24	2.28	2.27
増重倍率	1.8	1.8	1.8	1.9	1.9	1.9
飼育日数	29	29	29	28	28	28

人為感染結果を表2, 3および図1, 2にそれぞれ示した。免疫後4週目の人為感染結果では,

表2 人為感染による成績 (免疫後4週目)

接種菌量 (CFU/尾)	試験 区分	供試 尾数	経過日数														へい死 尾数	へい死率 (%)	RPS (%)	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13				14
1.7×10 ⁸	アジュバント区	25			1	7	3		1									12	48	50
	無添加区	25				14	4	1				1			1			21	84	13
	対照区	25			1	15	4	2					1			1		24	96	—
1.7×10 ⁷	アジュバント区	25					1	1										2	8	82
	無添加区	25					1	3	2	2	2	1						11	44	0
	対照区	25					3	4	2				1	1				11	44	—
1.7×10 ⁶	アジュバント区	25								1								1	4	50
	無添加区	25																0	0	100
	対照区	25								1	1							2	8	—

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

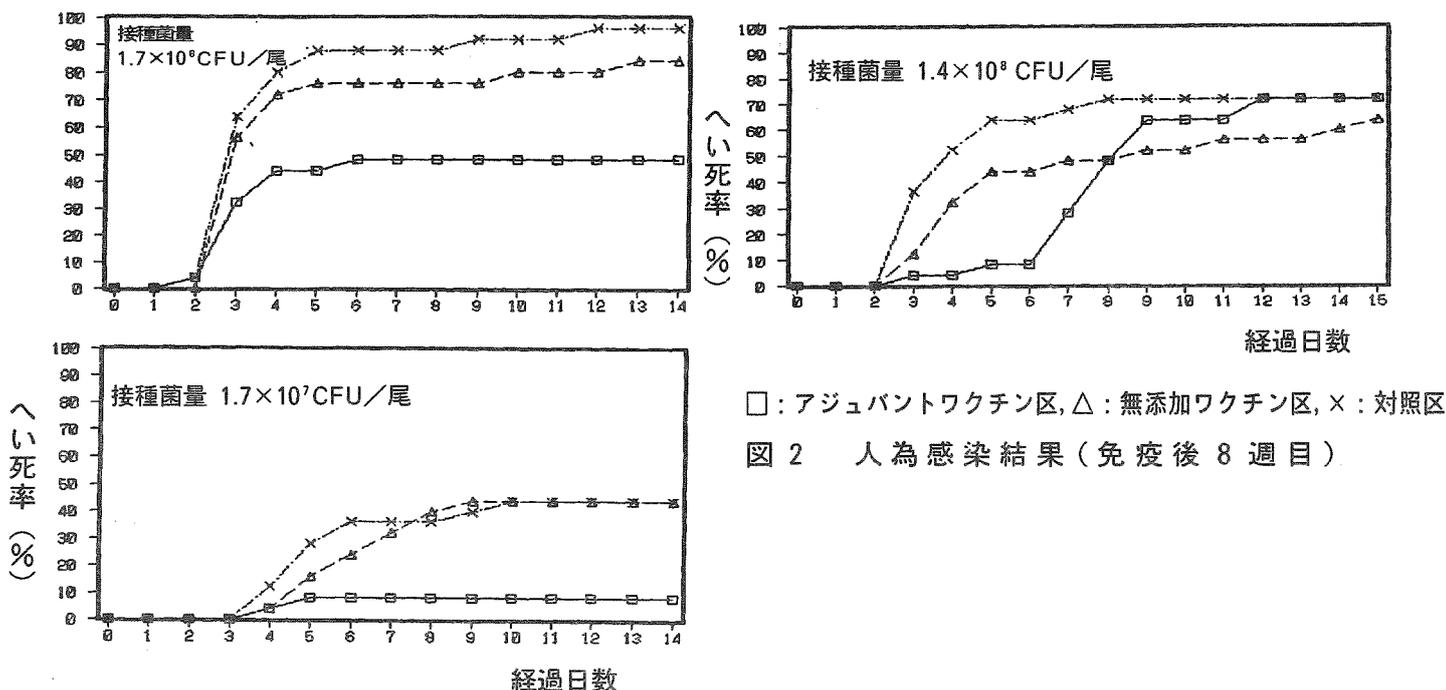
表3 人為感染による成績 (免疫後8週目)

接種菌量 (CFU/尾)	試験 区分	供試 尾数	経過日数															へい死率 (%)	RPS (%)	RPS60 (%)	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14				15
1.4×10 ⁸	アジュバント区	25				1		1		5	5	4						2	72(8)	0(88)	88
	無添加区	25					3	5	3		1		1			1	1		64(44)*	11(31)	12
	対照区	25					9	4	3		1	1							72(64)		

* () 内は6日目までの値

アジュバント区の有効率は接種菌量が1.7×10⁸CFU/尾で50%, 1.7×10⁷CFU/尾で82%であり, へい死尾数の差をFisherの直接確立計算法により検定すると有意差 (それぞれP<0.001, P<0.01) が認められた。一方, 無添加区では有効性は認められなかった。免疫後8週目においては, アジュバント区および無添加区ともに15日間のへい死尾数では有意差はなかったが, アジュバント区において, 7~12日目のへい死魚から冷水病菌が分離されたものの, へい死魚には体のスレや膨満が顕著でありチョウチン病による影響が強いと考えられた。このため, 感染後6日目までのへい死尾数から有効率を求めると, アジュバント区の有効率は88%であり, へい死尾数の差をFisherの直接確立計算法により検定すると有意差 (P<0.001) が認められた。なお, 無添加区では有意差はなかった。また, 対照区のへい死率が60%を越えた時点で有効率を算出するRPS60はアジュバント区では88%であり, アジュバント添加ワクチンの有効性が示された。さらに, 人為感染後の生残魚について保菌検査を行ったところ (表4), アジュバント区においては冷水病菌が検出されなかったのに対し, 無添加区および対照区では高率に分離され, このことからアジュバント添加ワクチンの有

効性が示された。



□: アジュバントワクチン区, △: 無添加ワクチン区, ×: 対照区

図 1 人為感染結果 (免疫後 4 週目)

表 4 生残魚の冷水病菌保菌検査結果

試験区	検査尾数	検査部位			
		潰瘍	穴あき	腎臓	計
アジュバント区	7	0/2	-	0/7	0/7
無添加区	9	4/4	3/3	2/9	7/9(78)*
対照区	7	2/2	3/3	2/7	5/7(71)

*分離尾数/検体数, () : 割合 (%)

このように、植物性オイルアジュバントを添加したワクチンと無添加のワクチンを用い、腹腔内接種による冷水病の予防効果について検討したところ、アジュバントを添加したワクチンでは接種後 8 週目まで有効であると考えられたが、アジュバントを添加していないワクチンの有効性は認められなかった。

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, 21, 19-24.
- 2) 宇野悦央, 奥山芳生, 加藤邦彰 (2000) : 養殖水産動物保健安全対策, 平成10年度和歌山県内水面漁業センター事業報告, 24, 21-27.