

アユの魚病ワクチンの有効性試験結果

湯浅明彦・谷本 剛

近年、アユ養殖業に甚大な被害をもたらしている冷水病とシュードモナス病（細菌性出血性腹水症）は、薬剤の投与により冷水病を治療した後にシュードモナス病が発病するケースが多い。シュードモナス病原菌は多剤耐性があり、ほとんどの薬剤に感受性がないことから治療が困難である。この二つの疾病を効果的に予防することは、アユ養殖業の経営改善にとって喫緊の課題である。そこで、平成8年からシュードモナス病ワクチンを平成11年から冷水病ワクチンの開発試験に取り組んでいる。平成12年度には、アジュバンドを添加したシュードモナス病と冷水病の2価アジュバンド添加混合ワクチンの有効性試験を実施した。今年度は同様にシュードモナス病と冷水病2価アジュバンド添加混合ワクチンの有効投与量について検討した。

材料と方法

1 供試魚の飼育方法

徳島県栽培漁業センターで飼育した海産系11継代の親魚から採卵育成した種苗を平成12年1月29日に移送し、所内で飼育したものを供試魚として用いた。飼育は0.5m³の水槽に地下水を注水し、魚体重の1~2%の配合飼料を与えた。ワクチンの投与は、飼育日数153日平均体重8.7gで実施した。飼育管理が不適切であったために一部の個体では生殖腺が発達した、そこで成熟が進んだものは供試魚として用いなかった。

2 ワクチンの種類と投与法

1994年に滋賀県の感染アユの腎臓から分離したシュードモナス病原菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) FPC941株と、1987年に徳島県の感染アユの腎臓から分離した冷水病病原菌 (*Flavobacterium psychrophilum*) FPC840株を抗原として共立商事㈱が作成したワクチンを用いた。FPC941株の生菌 1.7×10^{10} CFU/ml を含む培養液を0.8%ホルマリンで不活化したものと、FPC840株の生菌 6.1×10^8 CFU/ml を含む培養液を0.3%ホルマリンで不活化したものを等量混合し、この混合液3溶とMONTANIDE - ISA763A (Seppic社製) オイルアジュバンド7溶を混合しエマルジョンにしたものをアジュバンド添加2価混合ワクチンとした。

麻酔薬 (FA100) を0.015%飼育水に添加して供試魚を麻酔し、腹鰭基部後方の腹腔内に、2価混合ワクチン10 μ L、

25 μ L、50 μ Lを各210尾の供試魚に接種した。

3 攻撃試験

ワクチン接種31日後にシュードモナス病原菌 (菌株FPC941) による腹腔内注射攻撃を実施した。マイナス80で凍結保存していた菌株をTSA培地で25、17時間培養した菌体を滅菌生理食塩水で希釈し、5倍階段希釈系列で3種類の濃度の菌液を作成した。一尾当たり 3.2×10^3 CFU、 6.3×10^2 CFU、 1.3×10^1 CFUになるように供試魚の腹鰭基部後方腹腔内に菌液を50 μ L接種した。一方、ワクチン接種40日後に冷水病病原菌 (菌株PT98099:1998年に徳島県の病魚体表患部から分離) による皮下注射攻撃を実施した。改変サイトファーガ寒天培地で48時間培養した菌体を用いて改変サイトファーガ液体培地で10倍階段希釈系列の菌液を作成した。50 μ Lを供試魚の背鰭基部皮下に注射し、一尾当たり 1.3×10^8 CFU、 1.3×10^7 CFU、 1.3×10^6 CFUの菌量を接種した。攻撃試験の供試魚は各試験区とも30尾とした。

攻撃後14日間経過を観察し死亡魚を計数するとともに症状の観察と細菌検査を行い、冷水病による死亡かどうかを判定した。攻撃後の飼育水は、シュードモナス病の場合は地下水 (水温22~23) を、冷水病の場合は冷却した地下水 (水温17.4~18.4) を用いた。

4 ワクチンの有効性の判定

攻撃菌の感染以外の死因による死亡数を除いた死亡率から次式により有効率を算出した。

有効率 (RPS) = (1 - (ワクチン投与区の死亡率 / 対照区の死亡率)) \times 100

対照区の死亡率が60%以上の試験区については、対照区の死亡率が60%に達した時点の死亡率を用いて算出した有効率 (RPS60) を示した。また、Fisherの直接確率計算法により、対照区とワクチン投与区の死亡率の差を統計的に検定した。

5 アジュバンドの残留性

アジュバンドの残留を確認するために、攻撃試験終了後の生残魚と攻撃試験に使用しなかったワクチン投与魚を引き続き飼育した。ワクチン接種51日後、64日後及び92日後に10又は20尾を解剖し、腹腔内のアジュバンドの残留を目視で確認するとともに、不明瞭な場合はスライドガラスに取って顕微鏡で確認した。

結果

1 ワクチンの安全性について

ワクチン接種後、数日間残餌が見られるなど摂餌量が低下したが、それ以降は通常の摂餌量に回復した。ワクチン接種に起因すると思われる死亡は認められなかった。

2 シュードモナス病ワクチンの有効性試験

攻撃後2週間の死亡状況、有効率と死亡率の差の検定結果を表1に示した。各試験区とも攻撃後2日目から典型的なシュードモナス病の症状を呈する死亡魚が見られた。ほとんどの死亡は5日後まで起こった。平均死亡日数は攻撃菌量による差が無く、2.5～3.5日であった。死亡魚からシュードモナス病原菌が分離されない場合があり、その数は多い試験区で5尾であった。対照区の死亡率は、攻撃菌量に比例し 3.2×10^3 、 6.3×10^2 、 1.3×10^1 CFU/尾でそれぞれ、90%、83.3%、53.3%であった。各ワクチン投与量における死亡率は、攻撃菌量が 3.2×10^3 CFU/尾では10,50,25 μ Lの順に 6.3×10^2 CFU/尾では50,10,25 μ Lの順に、 1.3×10^1 CFU/尾では25,10,50 μ Lの順にそれぞれ少なくなっている。死亡率が少ないほど有効率は高く、10 μ L投与区の 3.2×10^3 CFU/尾の攻撃菌量を除く全てのワクチン投与区で対照区と比較して死亡率に有意な差が認められた(危険率5%以下)。

3 冷水病ワクチンの有効性試験

攻撃後2週間の死亡状況を表2に、死亡魚から冷水病菌が分離された場合の死亡数とそれによる有効率と有意差の検定の結果を表3に示した。攻撃菌量が 1.3×10^8 CFU/尾では、ほとんどの死亡が攻撃の翌日に生じた。攻撃菌量が少なくなると死亡までの日数が長くなる傾向にあり、菌量が10分の1になると平均死亡日数は1.0～1.2日、1.6～1.9日、4.1～5.2日というように順次長くなった。冷水病の場合死亡魚から原因菌が分離されないことがしばしばあり、多い場合は試験区当たり13尾に達した。攻撃菌量が少なく死亡までの経過日数が長いほど、冷水病菌が分離されない傾向があった。

対照区の死亡率は攻撃菌量に比例し、菌量が 1.3×10^8 、 1.3×10^7 、 1.3×10^6 CFU/尾でそれぞれ86.7%、63.3%、36.7%であった。死亡率が対照区を上回るワクチン投与区が3区あり、有効率は最も高いもので43.6%でしかなかった。全てのワクチン投与区で、対照区の死亡率との間に有意な差が認められなかった。

4 アジュバンドの残留

供試魚のアジュバンドの残留率を表4に示した。投与量の増加に比例して残留率が高くなる傾向にあり、50 μ L投与区でワクチン投与後51日では80%の残留率を示し、腹腔内

表2 冷水病攻撃試験における死亡状況

試験区*	攻撃菌量 (CFU/尾数)	経過日数														計
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
50 μ L投与区	1.3×10^8	30	24	3		1		1								29
25 μ L投与区	1.3×10^8	30	25	5												30
10 μ L投与区	1.3×10^8	30	25	4	1											30
対照区		30	29	1												30
50 μ L投与区	1.3×10^7	30	13	13	2											28
25 μ L投与区	1.3×10^7	30	7	17	2	1			1							28
10 μ L投与区	1.3×10^7	30	6	14	3	1	1		1	1						27
対照区		30	13	10	1		1		1							26
50 μ L投与区	1.3×10^6	30		4	1	2	3		1	1				1		13
25 μ L投与区	1.3×10^6	29	3	3	5	2	2	3				2				20
10 μ L投与区	1.3×10^6	29	1	1	3	2	2		2	1		1		1	1	14
対照区		30	4	3	2	3	1				1		1	1		16

の幽門垂や肛門の周辺に白色粒状のアジュバンドワクチンが残留していた。10 μ L投与区では64日後に残留率が20%に増加するが、92日後には5%に低下した。ワクチン投与92日後でも5～35%の残留が認められた。

考察

ワクチン投与から攻撃までの期間は28日の予定であったが、準備が遅れたためにシュードモナス病では31日、冷水病では40日になった。過去の知見からワクチン接種40日後でも免疫が持続する期間であることから、攻撃の遅れによる影響は少ないと考えられる。供試魚の一部(主に雄魚)の生殖腺が成熟していたことは獲得免疫の成立にとって障害になり、成熟が進んだアユ供試魚にワクチンを投与した場合、免疫獲得が不十分で有効性が低くなる可能性がある。また、技術的な問題からワクチンを50 μ L投与した場合に注射針を刺した部分からワクチンが漏れることがあった。こうしたことが影響して、結果がばらつきたり有効率を低くする要因として働いた可能性がある。こうしたことを考慮して試験結果を検討すれば、アジュバンド添加2価

表4 アジュバンドの残留状況

試験区	ワクチン投与後のアジュバンドの残留率(%)		
	51日後	64日後	92日後
10 μ L投与区	10.0 (1/10) *	20.0 (4/20)	5.0 (1/20)
25 μ L投与区	40.0 (4/10)	30.0 (6/20)	25.0 (5/20)
50 μ L投与区	80.0 (8/10)	75.0 (15/20)	35.0 (7/20)

* 残留が確認された尾数/検査尾数

混合ワクチンはシュードモナス病に対し10~50 μ Lのいずれの投与区においても比較的高い有効性を示した。しかし、冷水病に対しては全ての投与区で有効性が確認できなかった。この原因として考えられるのは、混合することで抗原量が減少するとともに、冷水病原菌では6.1 \times 10⁸CFU/mlを含む培養液から不活化ワクチン液が作られ

ていること、一方シュードモナスワクチンは生菌1.7 \times 10¹⁰CFU/mlを含む培養液から作られていることから冷水病の抗原量比率が少ないことである。冷水病とシュードモナス病のアジュバンド添加ワクチンの最小有効抗原量をそれぞれ明らかにした上で、不活化菌液の混合比を決定する必要がある。

表1 死亡状況とシュードモナス病に対するアジュバンド添加2価混合ワクチンの有効性

(攻撃試験における死亡状況)														(有効率と有意差の検定)							
試験区	攻撃菌量 (CFU/尾)	供試尾数	経過日数											平均死亡日数	試験区	死亡率 %	有効率 %	RPS60 %	P*		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11							12	13
50 μ L投与区	3.2 \times 10 ³	30	5	9	1	1				1					17	3.4	50 μ L投与区	56.7	37.0	46.2	0.0037**
25 μ L投与区		30	4	6	1					1					12	3.4	25 μ L投与区	40.0	55.6	61.5	0.00005***
10 μ L投与区		30	2	15	3	1									21	3.1	10 μ L投与区	70.0	22.2	34.6	0.1
対照区		30	1	16	9			1						27	2.5	対照区	90.0				
50 μ L投与区	6.3 \times 10 ²	30	3	9	3	1					1				17	3.5	50 μ L投与区	56.7	32.0	47.8	0.023*
25 μ L投与区		30	1	7										8	2.9	25 μ L投与区	26.7	68.0	65.2	0.00001***	
10 μ L投与区		30	2	3	3	1	1						1	11	5.5	10 μ L投与区	36.7	56.0	78.3	0.0002***	
対照区		30	1	14	8	2								25	2.5	対照区	83.3				
50 μ L投与区	1.3 \times 10 ¹	30	1	1	1									3	3.0	50 μ L投与区	10.0	81.3		0.0003***	
25 μ L投与区		30	1	1	2	1	1							6	3.0	25 μ L投与区	20.0	62.5		0.0075**	
10 μ L投与区		30		2	2									4	3.5	10 μ L投与区	13.3	75.0		0.0011**	
対照区		30	4	7	4	1								16	3.1	対照区	53.3				

※Fisherの直接確率計算法
*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001

表3 死亡状況と冷水病に対するアジュバンド添加2価混合ワクチンの有効性

(攻撃試験における死亡状況)														(有効率と有意差の検定)						
試験区	攻撃菌量 (CFU/尾)	供試尾数	経過日数											平均死亡日数	試験区	死亡率 %	有効率 %	RPS60 %	P*	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11							12
50 μ L投与区	1.3 \times 10 ⁸	30	22	2	1									25	1.2	50 μ L投与区	83.3	3.8	12.0	
25 μ L投与区		30	22	5										27	1.2	25 μ L投与区	90.0	-3.8	12.0	
10 μ L投与区		30	23	1										24	1.0	10 μ L投与区	80.0	7.7	8.0	0.365
対照区		30	25	1										26	1.0	対照区	86.7			
50 μ L投与区	1.3 \times 10 ⁷	30	12	11	2									25	1.6	50 μ L投与区	83.3	-31.6	-38.9	
25 μ L投与区		30	7	12	2									21	1.8	25 μ L投与区	70.0	-10.5	-16.7	
10 μ L投与区		30	5	7	2	1								15	1.9	10 μ L投与区	50.0	21.1	22.2	0.217
対照区		30	10	7	1	1								19	1.7	対照区	63.3			
50 μ L投与区	1.3 \times 10 ⁶	30		3	1	2	1							7	4.1	50 μ L投与区	23.3	36.4	36.4	0.199
25 μ L投与区		29	3			1	2				1			7	5.1	25 μ L投与区	24.1	34.2	34.2	0.223
10 μ L投与区		29		2	1	2					1			6	5.2	10 μ L投与区	20.7	43.6	43.6	0.143
対照区		30	4	2	2	1				1		1	11	4.4	対照区	36.7				

※Fisherの直接確率計算法
*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001