

経口投与によるアユ冷水病ワクチンの有効性試験

谷本 剛・湯浅明彦

近年、アユの冷水病は、アユ養殖場のみならず全国各地の河川の天然アユにも発生が確認されており、その被害が社会的な問題になっている。また、冷水病はアユ養殖において最も被害の大きい魚病であることから、予防対策としてワクチンの開発研究を実施している。その結果、ワクチンの免疫効果を高める働きのあるオイルアジュバントを添加した注射投与により防御免疫が誘導されることが明らかになった。しかしながら、注射による投与は、小型の魚や数多くのアユにワクチン処理を施す場合には不向きである。一方、経口法による投与は、大量処理に適し、対象魚の大小を問わず投与ともなうストレスが少ないことなどから、アユ用ワクチンとして実用性が高い。

こうしたことから、本研究ではワクチンが胃液による変性を受けて効果が低下するという経口ワクチンの問題点を解決し、かつワクチンを効率的に腸管から吸収させるよう冷水病原菌を油球に包埋した油球ワクチンを中心とした経口ワクチンにより、アユに対する防御免疫の誘導の可能性について検討した。

なお、本研究はアユ冷水病対策研究会ワクチン開発関連研究グループの連絡試験として実施した。

材料と方法

1. アジュバント添加効果の検討

(1) 供試魚

徳島県栽培漁業センターで生産された海産系継代15代目の人工産アユを用いた。供試魚の平均体重は4.0 gであった。

(2) 供試ワクチンとワクチン処理

ワクチン作成に用いた抗原は、1999年に滋賀県でアユ病魚の腎臓から分離された冷水病原菌(*Flavobacterium psychrophilum*)SG990302菌株を、改変サイトファーガ液体培地(MCY)で培養し、0.3%ホルマリンで不活化した後、遠心分離により20倍に濃縮したものである(以下20倍濃縮FKCと称す)。なお、濃縮後の菌数は、不活化前の生菌数に換算して 2.0×10^9 CFU/mlである。

経口ワクチンは、20倍濃縮FKC(菌体の超音波破壊無し)、20倍濃縮FKC(菌体の超音波破壊有り)および水溶性アジュバント(Seppic社製IMS-1312)添加20倍濃縮FKC(菌体の超音波破壊有り)を油球に包埋した3種類の油球ワクチン(以

下それぞれ非破壊油球ワクチン、破壊油球ワクチンおよびIMS+破壊油球ワクチンと称す)を使用した。これらワクチンは養殖研究所から提供していただいた。各ワクチンを1日当たり魚体重1 kgに対し5 ml投与となるように配合飼料に展着し、一晩デシケータ内で乾燥させた後、日間給餌率2.0~3.0%で5日間連続投与して2日間休む方法で2週間(計10日間)投与した。

経口ワクチンと比較する目的で、注射ワクチン試験を並行して実施した。注射ワクチンは、20倍濃縮FKCとオイルアジュバント(Seppic社製ISA-763A)を容量比1:3で混合乳化したものである。これを供試魚の腹鳍基部後方の腹腔内に1尾当たり0.05 ml接種した。

(3) ワクチン試験区の設定

次のように5試験区設定し、各試験区40 L水槽にワクチン投与魚を収容したものを2水槽設けた。なお、対照区にはワクチン無投与魚を収容したものを2水槽設けた。

- 1)非破壊油球ワクチン投与区(非破壊油球区とする)
- 2)破壊油球ワクチン投与区(破壊油球区とする)
- 3)IMS+破壊油球ワクチン投与区(IMS+破壊油球区とする)
- 4)アジュバント添加注射ワクチン投与区(注射区とする)
- 5)ワクチン無投与区(対照区とする)

ワクチン投与開始から攻撃試験に供するまで、各試験区の供試魚を200 Lの水槽に収容し、14.8~16.3 の脱塩素水道水で飼育した。

(4) 攻撃試験

攻撃は、ワクチン投与終了日から14日後に以下の方法による冷水病菌浸漬法によって実施した。まず、-80 で凍結保存していたSG990302菌株の病原性を高めるために、アユへの筋肉注射と再分離を2回繰り返した菌を準備した(以下SG990302-2菌株と称す)。SG990302-2菌株を改変サイトファーガ液体培地(MCY)100 mlで18 下で24時間前培養した後、5000 mlのMCYに全量添加して18 下で32時間通気培養した。本培養菌(生菌数 1.2×10^{10} CFU/ml)を17.0 の脱塩素水道水で10倍に希釈した菌液に、各試験魚を通気しながら60分間浸漬した。

攻撃後は16.5~17.1 の脱塩素水道水で20日間飼育し、死亡魚を計数するとともに症状の観察と細菌検査をおこない攻撃による死亡かどうか判定した。

2. ワクチンの免疫持続性の検討

(1) 供試魚, (2) 供試ワクチンとワクチン処理, (3) ワクチン試験区の設定は「1. アジュバント添加効果の検討」と同様である。

(4) 攻撃試験

攻撃は、ワクチン投与終了日から42日後に以下の方法による冷水病菌浸漬法によって実施した。SG990302-2菌株をMCY 100 mlで18 下で24時間前培養した後、5000 mlのMCYに全量添加して18 下で30時間通気培養した。本培養菌(生菌数 6.0×10^8 CFU/ml)を18.0 の脱塩素水道水で10倍に希釈した菌液に、各試験魚を通気しながら60分間浸漬した。

攻撃後は17.5 ~ 19.9 の脱塩素水道水で20日間飼育し、死亡魚を計数するとともに症状の観察と細菌検査をおこない攻撃による死亡かどうか判定した。

3. ワクチン投与量および冷水病ホルマリン不活化菌(FKC)ワクチンの有効性の検討

(1) 供試魚

徳島県栽培漁業センターで生産された海産系継代15代目の人工産アユを用いた。供試魚の平均体重は8.7 gであった。

(2) 供試ワクチンとワクチン処理

供試した油球ワクチンは「1. アジュバント添加効果の検討」と同様である。各ワクチンを1日当たり魚体重1 kgに対し5 ml投与となるように配合飼料に展着(日間給餌率2 ~ 3 %)し、一晚デシケータ内で乾燥させた後、5日間連続投与して2日間休む方法で3週間(15日間)投与した。

FKCワクチン液は、SG990302-2菌株をMCY 100 mlで18 下で22時間前培養した後、5000 mlのMCYに全量添加して18 下で30時間通気培養した。本培養菌(生菌数 $3.6 \sim 9.8 \times 10^8$ CFU/ml)を0.3%ホルマリンで不活化させた後、遠心分離して集菌し、生理食塩水に0.1 g/mlとなるように菌体を懸濁して作成した。本ワクチンを1日当たり魚体重1 kgに対し5 ml投与となるように配合飼料に展着(日間給餌率2 ~ 3 %)し、一晚デシケータ内で乾燥させた後、5日間連続投与して2日間休む方法で2週間および3週間(10日間および15日間)投与した。

注射ワクチンは、FKCワクチン液(不活化前生菌数約 4.5×10^{10} CFU/ml)とオイルアジュバント(ISA763A)を容量比1 : 3で混合した。これを供試魚の腹鰭基部後方の腹腔内に1尾当たり0.1 ml接種した。

(3) ワクチン試験区の設定

次のように7試験区を設定し、各試験区40 L水槽にワクチン投与魚を収容したものを2水槽設けた。なお、対照区

にはワクチン無投与魚を収容したものを2水槽設けた。

- 1)非破壊油球ワクチン投与区(非破壊油球区とする)
- 2)破壊油球ワクチン投与区(破壊油球区とする)
- 3)IMS+破壊油球ワクチン投与区(IMS+破壊油球区とする)
- 4)FKCワクチン2週間投与区(FKC2W区とする)
- 5)FKCワクチン3週間投与区(FKC3W区とする)
- 6)アジュバント添加注射ワクチン投与区(注射区とする)
- 7)ワクチン無投与区(対照区とする)

ワクチン投与開始から攻撃試験に供するまで、各試験区の供試魚を200 Lの水槽に収容し、19.8 ~ 22.3 の脱塩素水道水で飼育した。

(4) 攻撃試験

攻撃は、ワクチン投与終了日から21日後(注射区はワクチン投与日から15日後)に以下の方法によって実施した。SG990302-2菌株をMCY100 mlで17 下で20時間前培養した後、3000 mlのMCYに全量添加して18 下で29時間通気培養した。本培養菌(生菌数 9.0×10^6 CFU/ml)を21.0 の脱塩素水道水で10倍に希釈した菌液に、各試験魚を通気しながら60分間浸漬した。その後、冷水病菌の浸漬攻撃による死亡率が低かったことから、攻撃開始6日目から冷水病による死亡魚を用いた病魚排水攻撃を追加しておこなった。

19.0 ~ 21.5 の脱塩素水道水で病魚排水攻撃期間中も含め20日間飼育し、死亡魚を計数するとともに症状の観察と細菌検査をおこない攻撃による死亡かどうか判定した。

有効性の判定

全試験におけるワクチンの有効率(RPS)は、冷水病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算出した。

$$RPS(\%) = \{1 - (\text{ワクチン投与区の死亡率} / \text{対照区の死亡率})\} \times 100$$

また、Fisherの直接確率計算法(片側検定)により対照区とワクチン投与区の死亡率の差の有無を統計的に検定した。

結果

1. アジュバント添加効果の検討

冷水病攻撃試験における各試験区の死亡状況、死亡率および有効率を表1に示した。なお、各試験区において2水槽間の死亡率に有意な差は認められなかったため、合計の死亡数で評価した。各試験区の死亡率は非破壊油球区83.1 %、破壊油球区75.4 %、IMS+破壊油球区65.7 %、注射区40.3 %となり、IMS+破壊油球区および注射区において対照区の死亡率81.3 %と比較して有意な差が認められた($P < 0.05$ および $P < 0.01$)。また、各試験区の有効率は、非破壊

油球区-2.2%，破壊油球区7.3%，IMS+破壊油球区19.2%，注射区50.4%であった。

2. ワクチンの免疫持続性の検討

冷水病攻撃試験における各試験区の死亡状況，死亡率および有効率を表2に示した。なお，各試験区において2水槽間の死亡率に有意な差は認められなかったため，合計の死亡数で評価した。各試験区の死亡率は非破壊油球区78.0%，破壊油球区73.4%，IMS+破壊油球区65.6%，注射区54.1%となり，注射区において対照区の死亡率75.0%と比較して有意な差が認められた($P < 0.05$)。また，各試験区の有効率は，非破壊油球区-4.0%，破壊油球区2.1%，IMS+破壊油球区12.6%，注射区27.9%であった。

3. ワクチン投与量および冷水病ホルマリノ不活化菌(FKC)経口ワクチンの有効性の検討

冷水病攻撃試験における各試験区の死亡状況，死亡率および有効率を表3に示した。なお，各試験区において2水槽間の死亡率に有意な差は認められなかったため，合計の死亡数で評価した。各試験区の死亡率は非破壊油球区37.1%，破壊油球区39.3%，IMS+破壊油球区40.3%，FKC2W区40.3%，FKC3W区40.0%，注射区31.7%となり，いずれの試験区においても対照区の死亡率41.9%と比較して有意な差は認められなかった。また，各試験区の有効率は，非破壊油球区11.5%，破壊油球区6.1%，IMS+破壊油球区3.8%，FKC2W区3.8%，FKC3W区4.5%，注射区24.2%であった。

考 察

注射ワクチンにおいてはアジュバントを添加することによりワクチンの有効性が高まることが明らかになっていることから，油球ワクチンにおいても同様の効果が得られるか検証した。その結果，水溶性アジュバントを添加した油球ワクチンは，アジュバント非添加油球ワクチンより高い有効率を示した。本結果は，昨年得られた結果と一致しており，水溶性アジュバントの添加効果が再確認される結果となった。このことから，注射ワクチンと同様に経口ワクチンにおいても，アジュバントを添加することによりワクチンの免疫効果が高まることが強く示唆された。しかしながら，依然としてその有効性はアジュバント添加注射ワクチンと比較して低く，実用化のレベルに著しく達していない。

一方，油球ワクチンと同様のコンセプトで作成されているマイクロカプセルワクチンでは，水溶性アジュバントの添加割合に伴い有効率が上昇したことが報告されている。そのため今後は，油球ワクチンにおいてもアジュバントの含有率を高めて有効性を検討する必要があると考えられ

る。

また，ワクチン抗原である冷水病菌体の超音波破壊の有無による有効性の違いを検討したところ，超音波破壊をした方が若干ではあるが有効率が高くなった。これは，超音波で破壊した菌体を油球に包埋することで油球ワクチンの小型化が図られ，腸管上皮からの吸収がより高まったことによると考えられた。したがって，油球ワクチンの吸収を高めるためには，魚類の脂肪球吸収特性に合わせた少径の油球ワクチンを作成する必要がある，そのためには菌体の超音波処理を施したほうがより効果的であることが示唆された。

次にワクチンの免疫持続性を検討するために，ワクチン投与終了後42日目に攻撃試験をおこなった。その結果，油球ワクチンにおいてはアジュバント添加ワクチンで最も高い有効率を示したものの，ワクチン投与終了後14日目の攻撃試験時と比較して，注射ワクチンを含め全てのワクチン投与区で有効率が低下した。このことから，本ワクチンの免疫持続性は比較的短いと考えられた。一般的に，経口ワクチンは注射ワクチンに比べ免疫持続性が短いことが欠点とされていることから，経口ワクチンの実用化にあたっては，この欠点を解消したワクチンを開発する必要がある。今後は，この欠点を補うために経口ワクチンの追加投与によるブースター効果等について検討する必要があると考えられる。

次にワクチン投与量を増加させることにより有効性が向上するか検討するため，油球ワクチンの投与期間を延べ5日間延長して15日間投与させた。その結果，非破壊菌体油球区では若干有効率が向上したものの，その他の油球ワクチン投与区では有効性を確認することができなかった。

また，FKC経口ワクチンについては既報により高い有効性が確認されていることから，本県で作成したワクチンも同様の効果が得られるか検討した。その結果，FKC2W区およびFKC3W区の両試験区とも有効性は確認されなかった。なお，本試験では，攻撃方法を当初冷水病菌による浸漬感染でおこなったが，攻撃強度が低かったため急遽，冷水病による死亡魚を用いた病魚排水攻撃を追加して実施した。このことにより，対照区の死亡率が先の試験と比較して著しく低いものとなったと考えられたことから，本試験においてはワクチンの正しい評価がなされなかった可能性がある。これまで，冷水病経口ワクチンについては，投与量を増加させることにより有効性が向上した事例が報告されており，油球ワクチンについても同様の効果が充分期待されることから，再検討が必要である。

FKC経口ワクチンについては，ワクチン抗原の菌株および培養法等が既報の方法と異なっていた。これによれば，冷水病菌は対数増殖期の菌が最も病原性が高く，ワクチン

を作成する材料となる菌体もこの時期のものが高い
抗原性を有する可能性があることを報告しているこ

とから、条件を一致させた方法により再現性が得られるか
検討したい。

表1 冷水病攻撃試験（アジュバント添加効果の検討）における各試験区の死亡状況，死亡率および有効率

試験区	供試尾数	経過日数																				計	死亡率 (%)	有効率 (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			
非破壊菌体1	35		4	8	10	1	1			1	3										28	80.0	1.6	
非破壊菌体2	30	1	6	5	10	2					1				1						26	86.7	-6.6	
計	65	1	10	13	20	3	1			1	4				1						54	83.1	-2.2	
破壊菌体1	35		7	5	14	2					1										29	82.9	-1.9	
破壊菌体2	30		4	6	5	1	1		1						1	1					20	66.7	18.0	
計	65		11	11	19	3	1		1	1					1	1					49	75.4	7.3	
破壊菌体+MS1	40	1	2	4	8	1		2	2			1	1		2	1					25	62.5 *	23.1	
破壊菌体+MS2	30		4	4	7	3		1	1	1											21	70.0	13.9	
計	70	1	6	8	15	4		3	3	1		1	1		2	1					46	65.7 *	19.2	
注射1	31		1		3	3	2	1	2	1											13	41.9 **	48.4	
注射2	31				3	4	2	2	1												12	38.7 **	52.4	
計	62		1		6	7	4	3	3	1											25	40.3 **	50.4	
対照1	34		5	7	11	4		1													28	82.4		
対照2	30		5	5	12	2															24	80.0		
計	64		10	12	23	6		1													52	81.3		

* :P <0.05 , ** :P <0.01 (Fisherの直接確立計算法による)

表2 冷水病攻撃試験（ワクチン効果持続期間の検討）における各試験区の死亡状況，死亡率および有効率

試験区	供試尾数	経過日数																				計	死亡率 (%)	有効率 (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			
非破壊菌体1	29		1	5	4	2	1	2	2	1	3		1	1	1						24	82.8	-10.3	
非破壊菌体2	30		2	5	6	2	2	2	1	1		1	1								22	73.3	2.2	
計	59		3	10	10	4	3	4	3	1	4		2	1	1						46	78.0	-4.0	
破壊菌体1	32		1	5	7	3	2	2	2	1											23	71.9	4.2	
破壊菌体2	32			6	7	3	1	2	1		1	1	1	1							24	75.0	0.0	
計	64		1	11	14	6	3	4	3	1	1	1	1	1							47	73.4	2.1	
破壊菌体+MS1	30		3	4	3	3	2	2	1		1										19	63.3	15.6	
破壊菌体+MS2	31		4	3	8	2		2	2												21	67.7	9.7	
計	61		7	7	11	5	2	4	3		1										40	65.6	12.6	
注射1	33		2	4	3	2	2	1	1	1	2										18	54.5 *	27.3	
注射2	28		2	3	3	3	1	2	1												15	53.6 *	28.6	
計	61		4	7	6	5	3	3	2	1	2										33	54.1 *	27.9	
対照1	32		2	7	9	4		1	1	1	1										26	81.3		
対照2	36		3	5	8	2	3	1		1	1		1		1						25	69.4		
計	68		5	12	17	6	3	2		2	1	2		1							51	75.0		

* :P <0.05 (Fisherの直接確立計算法による)

表3 冷水病攻撃試験（ワクチン投与量およびFKCワクチンの有効性の検討）における各試験区の死亡状況，死亡率および有効率

試験区	供試尾数	経過日数																				計	死亡率 (%)	有効率 (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			
非破壊菌体1	31				2	1		1	1		1	1		2		1	1		1		12	38.7	7.6	
非破壊菌体2	31					1	2		1	1		1		1	1	1			1	1	11	35.5	15.3	
計	62				2	2	2	1	2	1	1	2		3	1	2	1		2	1	23	37.1	11.5	
破壊菌体1	30			1		2	1	1	2	1	1			1		1	1				12	40.0	4.5	
破壊菌体2	31			2		1		1	1	1	1		1	1		1	1		1	1	12	38.7	7.6	
計	61			3		3	1	2	3	2	1	1	1	1	1	1	1		2	1	24	39.3	6.1	
破壊菌体+MS1	31				1	2		1	1	2	1	1		1		1	1			1	13	41.9	-0.1	
破壊菌体+MS2	31				1	2	1		1	1	2	1		1	1		1				12	38.7	7.6	
計	62				1	3	2	2	1	3	2	3	1	1	1	2	1	1		1	25	40.3	3.8	
FKC (2W)	32		1		1		2	1	1		1	1	1		1				2	1	14	43.8	-4.4	
FKC (2W)	30			1		1	1	1	1	2	1		1		1		1				11	36.7	12.5	
計	62		1		2		3	2	2	1	3	2	1	2		2		1	2	1	25	40.3	3.8	
FKC (3W)	32			1		2	1	1	1	1	1	1		1		2		1			13	40.6	3.0	
FKC (3W)	33					1	2	2		1	3		1	1	1		1		1		13	39.4	6.0	
計	65			1		2	2	3	3	1	2	4		2	1	3		2			26	40.0	4.5	
注射1	32				1	1	1		1	2	1			1		1		1		1	10	31.3	25.4	
注射2	31				1	1	1	1	1	2		1		1		1					10	32.3	23.0	
計	63				2	2	2	1	2	4	1	1		2		2		1			20	31.7	24.2	
対照1	32				2	1	1	1	2		1		2		1		1	1	1		14	43.8		
対照2	30			1		1	2	1		1	1	1		1		1	1	1		1	12	40.0		
計	62			1	2	2	3	2	2	1	1	1	3		2		2	2	1	1	26	41.9		