

経口投与によるアユ稚魚用冷水病ワクチンの有効性試験

湯浅明彦

アユの冷水病は養殖場で最も被害の大きな感染症である。近年では河川のアユが発病し、被害が全国的に問題になっており、予防法の早急な開発が望まれている。こうした背景のもと、アユの冷水病ワクチンの開発研究を平成13年から本県他6県と養殖研究所が共同して進めている。昨年、各県が共通試験として実施した三重大学が開発した経口油球ワクチンの有効性試験では、明確な効果が認められなかった。有効性（有効率1%）は低い、水溶性アジュバントを添加した油球ワクチンで効果が認められた。効果が低い原因として抗原液（ホルマリン不活化菌液）と油の比率が適切でなく、油球に包埋される抗原量が少なかったことが指摘された。三重大学では油球に包埋する抗原量を飛躍的に増大させるために、油球ワクチンの作成方法を改良した。この改良型経口油球ワクチンの有効性を明らかにするために試験を実施した。また、他の魚病で有効性が確認されているリポソーム経口ワクチンについても有効性試験を実施した。

材料と方法

1. 試験魚

徳島県栽培漁業センターで河川の産卵親魚の受精卵から孵化飼育した人工種苗を16代に渡って継代飼育した人工種苗を試験に用いた。試験魚の平均体重（ワクチン投与開始時）は約7.5gであった。

2. 供試ワクチンの種類と投与方法

改良型油球ワクチンは、三重大学から作成方法の指導をいただき、次の方法で作成した。抗原として養殖研究所から分与された冷水病強毒株PH0424をCGY培地で17、26時間培養した後（OD=0.170、推定 10^8 CFU/mL）、0.3%になるようにホルマリンを添加して不活化した菌液を使用した。油球ワクチンは2種類（型、型と称する）を作成した。いずれも1g当たり推定 10^9 CFUの抗原を含有している。

型(O/Wタイプ)：不活化菌液を50倍に濃縮した菌液に、タラ肝油（乳化剤を5%添加）を等量混合して作成した。

型(W/O/Wタイプ)：不活化菌液を800倍に濃縮したペレットを15倍量の乳化剤添加タラ肝油に混合した後に、等量のDWと混合した。

2種類の油球ワクチンを1日魚体重1kg当たり5gとなるように配合飼料に展着し（日間給餌率2%）、一晩真空デシケータ内で乾燥させた後7日間連続して投与した。

リポソームワクチンは養殖研究所で作成したものを用いた。1日魚体重1kg当たり7.7mLになるようにリポソームワクチンを配合飼料に展着し（日間給餌率2~3%）、一晩真空デシケータ内で乾燥させた後、5日間連続して投与した。

免疫効果が高いアジュバント注射ワクチンを次の方法で作成し、経口ワクチンと効果を比較する対照ワクチンとした。50倍濃縮FKC（改変サイトファーガ培地で23時間培養、OD=0.203、濃縮前菌濃度 1.2×10^8 CFU/mL）とオイルアジュバント（Seppic社製ISA763A）を容量比1:3で混合した。このワクチンを、供試魚の腹鰭基部後方の腹腔内に1尾当たり0.03ml接種した。

ワクチンは夏至前に投与を終えることが望ましいが、ワクチンの作成が遅れたために8月上旬から下旬に投与を開始した。成熟を抑制するために、夏至以降の試験魚の飼育管理には電照を実施した。

3. 試験区の設定

次の5試験区を設定し、各試験区にそれぞれ40L水槽を2槽設けてワクチンを投与した試験魚を各20尾収容した。陰性対照区としてワクチンを投与しない試験魚を収容した水槽を設けた。

- (1)リポソームワクチン区
- (2)油球ワクチン 型区
- (3)油球ワクチン 型区
- (4)アジュバント注射ワクチン区
- (5)対照区

4. 攻撃試験

9月23日に、次の方法で冷水病の浸漬法による攻撃試験を実施した。ワクチン投与終了後の経過日数はリポソームワクチンが28日、油球ワクチンが17日およびアジュバント注射ワクチンが43日であった。

-80℃で凍結保存していたPH0424株の病原性を高めるために、筋肉注射による魚体通過を2回実施した。分離された菌株を改変サイトファーガ（MCY）液体培地100mLで予備培養（17、旋回培養100rpm）した後、同液体培地10Lに添加して17、24時間通気培養した。培養菌液（菌

数 5.5×10^8 CFU/mL, OD=0.354) を, 塩素を除去した水道水で5倍に希釈し攻撃用の菌液とした。菌液10 L に, 各試験区の試験魚40尾を通気しながら約30分間浸漬した。

5. 有効性の判定

攻撃試験後の死亡率から次式により有効率を算出した。

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

また, Fisherの正確確率計算法により対照区とワクチン区の死亡率の有意差の検定(片側検定)を行った。

ワクチン投与の開始が夏至から約2ヶ月遅れたが, 電照飼育を実施したためにワクチン試験終了時点で試験魚の生殖腺の発達は認められなかった。ワクチン投与が終了してから攻撃試験までの期間が長くなったアジュバント注射ワクチン区とリボソームワクチン区では, 試験魚にチョウチン症が認められた。アジュバント注射ワクチン区は攻撃試験までに治癒したが, リボソームワクチン区では完全に治癒しなかったことから浸漬攻撃に対する感受性が高くなり, 生残率が低下した可能性がある。

結果

表1に攻撃試験後の死亡魚数の推移, 死亡率および有効率を示した。死亡率の比較では, 油球ワクチン型とアジュバント注射ワクチンは1%以下の危険率で対照区と有意差が認められた。また, リボソームワクチンと油球ワクチン型は5%以下の危険率で有意差が認められた。有効率はアジュバント注射ワクチンが69.5%で最も高く, 油球ワクチン型, リボソームワクチン, 油球ワクチン型の順に低くなった。リボソームワクチンと油球ワクチン型の有効率は30%以下であった。

表1 攻撃試験による各試験区の死亡尾数の推移と死亡率および有効率

試験区	試験魚数	日間死亡尾数															死亡率 (%)	有効率 (%)	P	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15				計
リボソームワクチン	20		2	3	3	2	2			1							13	65.0	18.8	
	20			3	2	2			1		1			1			10			
計	40		2	6	5	4	2		1	1	1			1			23	57.5 *	28.1	0.0263
油球ワクチン	21			3		7	1	1									12	57.1	28.6	
	21			2	4		2										8			
計	42			5	4	7	3	1									20	47.6 **	40.5	0.0015
油球ワクチン	21			3	4	2	1		1			1		1			13	61.9	22.6	
	20			1	5	3	1		1	1							12			
計	41			4	9	5	2		2	1		1		1			25	61.0 *	23.8	0.0441
アジュバント注射 ワクチン	21			1		1		1			1						4	19.0	76.2	
	20					2		1	1		1				1		6			
計	41			1		3		2	1		2				1		10	24.4 **	69.5	<0.001
対 照	20		2	3	3	6	1	2	1					1			19	95.0		
	20		1	1	5	1	2		2	1							13			
計	40		3	4	8	7	3	2	3	1				1			32	80.0		

*:P < 0.05, **:P < 0.01(Fisherの正確確立計算法による)