

アユ冷水病に対するワクチンの開発について

増養殖担当 谷本剛

Key word; アユ, ワクチン, 冷水病, アジュバント

本県のアユ養殖は非常に盛んであり, 1977 年以来全国 1 位の主産県となっています。しかしながら, 1987 ~ 1992 年頃に 5000 トンあった生産量が, 近年では 2000 トン以下にまで低下し, 最盛期の約 1/3 にまで落ち込んでいます。減産の一因には, 養殖過程で発症する魚病による被害があります。水産研究所に持ち込まれたアユの診断件数によると, 冷水病, シュードモナス病の 2 つの魚病による被害が大きく, 全診断検数の 8 割以上を占めています。特に冷水病は近年養殖アユに留まらず, 全国各地の河川の天然アユにも発生が確認されており遊漁等への影響を含め社会問題化している魚病です。また, 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おこなっています。

アユの診断件数および冷水病については, 過去の水試だより(51, 41 号)に掲載していますので参考にして下さい。

ワクチンの問題点

これまでの研究により, ワクチンの効果を増強させる物質であるオイルアジュバントを添加した注射ワクチンにおいて高い有効性が認められることがわかりました。しかしながら, その効果の反面, 注射法は小型の魚や数多くの放流アユにワクチン処理を施す場合には不向きな方法です。また, 表 1 は各種容量のオイルアジュバント添加ワクチンをアユに接種し, その残留状況を調べたものですが, ワクチン接種後 16 週目においても腹腔内に 30%を超える残留が観察されました。このため, 本ワクチンの接種は, 食品衛生上の観点からみても実用的ではないと考えられたことから, これらの問題点を解決した経口法, 浸漬法による投与法の早期開発が求められています。とは言うものの, 経口法は投与量の把握が難しく, またワクチンが胃などの消化作用を受けて変性するため効果が低いという問題点があります。浸漬法はその点優れた投与方法であり, アユビブリオ病ワクチンにおいて高い効果を示し, 実用化されているものの, 冷水病に対しては同ワクチンと同様の用量では全くといっていいほど効果がありません。

表 1 アジュバントの残留状況

ワクチン接種後(週目)	残留率(%)	
	20 μ 区	30 μ 区
12	36.7	43.3
14	30.0	43.3
16	26.7	36.7

設定水温20℃

効果的な冷水病経口、浸漬ワクチンの開発を目指して

当研究所も参加しているアユ冷水病対策協議会のワクチン開発関連研究グループでは、これまでも様々な手法により、冷水病経口、浸漬ワクチンの開発をおこなってきました。その結果、注射ワクチンに匹敵する有効性を示すワクチンは未だ開発されてはいないものの、ある程度の効果が認められるワクチンが開発されつつあります。そのようなワクチンに、本グループに参加している三重大学と福山大学が開発した経口、浸漬ワクチンがあります。本年度、当研究所においてこれらのワクチンを用いて、アユ冷水病に対する有効性試験をおこないましたのでご紹介します。

供試したワクチン

経口ワクチンは、三重大学が作成した油球に冷水病原菌を包埋した油球ワクチンと油球に包埋する抗原に水溶性のアジュバント(IMS)を添加した IMS 添加油球ワクチンを使用しました。油球ワクチンは、魚類やエビ類などが、数ミクロン以下の油球を腸管上皮細胞の貪食細胞や腸管上皮の油球吸収作用により体内に取り込むことを応用して、油球に病原体の抗原を包埋すれば、腸管上皮が油球を吸収することで効率的に抗原を吸収させることができると考えたものです。同時に、油球内に抗原を包埋しているため、ワクチンが胃などの消化作用を受けて変性し、効果が低下するという経口ワクチンの欠点を解消できるものと考えられます。また、前述のとおり冷水病注射ワクチンでは、アジュバントを添加することにより有効性が向上することが知られています。そこで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その効果が期待できると考えました。

浸漬ワクチンは、福山大学が作成した冷水病菌の粗リポ多糖(LPS)ワクチンとこれにウサギ赤血球膜を結合させたウサギ赤血球膜結合 LPS ワクチンを使用しました。LPS はアユに対して高い抗原性を有しており、さらにそれにアユ体表の粘液中に含まれる凝集素(レクチン)と良く結合することが明らかとなったウサギ赤血球膜を結合させてやれば、アユ体表からより効率良くワクチンを取り込ませることができると考えたものです。

ワクチン試験の方法

経口ワクチンは、各ワクチンを 1 日魚体重 1 kg 当たり 2 g 投与となるように配合飼料に展着させ、一晚乾燥させました。これを日間給餌率 1.5~2.0 %で 1 週間のうち 5 日間連続投与して、2 日間は無添加配合飼料を与える方法で 3 週間投与しました。

浸漬ワクチンは、各ワクチンを飼育水で 400~600 倍に希釈し、このワクチン液にアユを 60 分間通気しながら浸漬しました。7 日後、新たに作成したワクチンを用いて同様の方法により再度浸漬しました。

なお、陽性対照としてアジュバント添加冷水病注射ワクチンを 1 尾当たり 50 μ L 接種しました。対照区は無処理魚を用いました。

攻撃は、ワクチン投与終了日から 19 日後に冷水病菌液(生菌数 7.0×10^7 CFU/ml)に各試験魚を浸漬する方法で実施しました。攻撃後は、飼育水で 21 日間飼育し、その間の冷水病による死亡魚を計数しました。各試験区の死亡率から有効率(= $(1 - (\text{試験区の死亡率} / \text{対照区の死亡率})) \times 100$)を算出しました。

血中凝集抗体価は、ワクチン投与終了日から 20 日後にマイクロタイター法により測定しました。

ワクチン試験の結果

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、各試験区の血中凝集抗体価を表 3 に示しました。

その結果、LPS 単独区を除いた試験区において、対照区と比較して有意に死亡率が低下しました。特に経口、浸漬ワクチン区では、ワクチンを単独で使用した試験区よりアジュバントを加えたり、ウサギ赤血球膜を結合させたりした試験区でより低い死亡率を示しました。また、全ての経口、浸漬ワクチン区において血中凝集抗体価の上昇が確認され、その値は注射ワクチン区と同等の値を示しました。以上の結果から、本試験に用いた経口、浸漬ワクチンは、冷水病に対して有効なワクチンであると考えられました。しかし残念ながら、依然として注射ワクチンに匹敵するほどの有効性は確認できませんでした。本経口、浸漬ワクチンは、ワクチンの効果を高める工夫をした試験区でより低い死亡率を示したことから、作成方法や投与方法を改善することで、さらに有効性が向上する可能性が充分考えられます。そのため、今後も本経口、浸漬ワクチンをベースとして、実用化レベルの高い効果を示すワクチンの開発に取り組んでいく予定です。

表 2 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

試験区	供試尾数	経過日数																					死亡率 (%)	有効率 (%)	P	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21				計
油球単独1	25		1	4	3	3	2	2		1													16	64.0	24.3	
油球単独2	25		1	5	4	3	1	1	1		2												18	72.0	14.8	
計	50		2	9	7	6	3	3	1	1	2												34	68.0 *	19.5	0.0330
油球+IMS1	21			4	2	2	2	2	1		1												14	66.7	21.1	
油球+IMS2	22		1	1	1	1	2	2	1		1	1	1										12	54.5	35.4	
計	43		1	5	3	3	4	4	2		2	1	1										26	60.5 **	28.4	0.0053
LPS単独1	29		1	5	6	4	4	2		1													23	79.3	6.1	
LPS単独2	31		1	5	3	6	6	2	1														24	77.4	8.4	
計	60		2	10	9	10	10	4	1		1												47	78.3	7.3	0.2403
LPS+ウサ半膜1	34		1	3	4	2	1	1	1	2	3	1											19	55.9	33.9	
LPS+ウサ半膜2	24			6	3	2	1	2	1	2	1	1											18	75.0	11.2	
計	58		1	9	7	4	2	3	2	2	2	3	1	1									37	63.8 **	24.5	0.0094
注射1	39		1	4	2	1	5	2	2	1	1	1											20	51.3	39.3	
注射2	31		1	3	3	1		1	1			1	1										12	38.7	54.2	
計	70		2	7	5	2	5	3	3	1	1	1	2										32	45.7 **	45.9	0.0000
対照1	28		2	6	5	6	2			1	1	2											25	89.3	-5.7	
対照2	30		1	5	4	2	6	3	1			1	1										24	80.0	5.3	
計	58		3	11	9	8	8	3	1	1	1	2	1	1									49	84.5	0.0	

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

表 3 各試験区の血中凝集抗体価

試験区	各検体の凝集抗体価					幾何平均
	1	2	3	4	5	
油球単独	2	4	4	4	16	4.6
油球+IMS	2	4	4	8	16	5.3
LPS単独	4	4	4	8	16	6.1
LPS+ウサ半膜	2	2	4	8	8	4.0
注射	4	4	8	8	8	6.1
対照	<2	<2	<2	<2	<2	<2