

# アユ冷水病非注射(経口・浸漬)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、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な方法である。そのため、大量処理に適し、より簡便な投与方法である経口法、浸漬法によるワクチンの開発に取り組むことを目的とした。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のを防ぎ、かつ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とアユに対して高い抗原性を有する冷水病原菌の菌体外膜成分である粗リポ多糖(LPS)ワクチンを用いて有効性を検討した。

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. 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14代目の人工産アユを用いた。供試魚の平均体重は5.5 gであった。

### 2. 供試ワクチンとワクチン処理

ワクチン作製に用いた抗原は、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10倍に濃縮したものである(以下10倍濃縮FKCと称す)。なお、不活化前の生菌数は $1.0 \times 10^9$  CFU/mlである。

浸漬ワクチンは、10倍濃縮FKCより抽出した冷水病原菌の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ワクチンを使用した。これらワクチンは福山大学から提供していただいた。各ワクチンを19.0%の脱塩素水道水で400~600倍に希釈し、このワクチン液に供試魚を60分間通気しながら浸漬した。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た。

経口ワクチンは、10倍濃縮FKCとこれに水溶性アジュバント(IMS-1312)を添加したものを油球に包埋した2種類の油球ワクチンを使用した。なお使用した抗原は、超音波処理をして菌体を破壊したものである。これらワクチンは三重大学から提供していただいた。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し、一晩デンキ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3週間投与した。

注射ワクチンは、10倍濃縮FKCとオイルアジュバント(ISA763A)を重量比3:7で混合乳化したものである。これを供試魚の腹鰭基部後方の腹腔内に1尾当たり0.05 ml接種した。

ワクチン処理開始から攻撃試験をおこなうまで、各試験区の供試魚をそれぞれ200 Lの水槽に収容し、18.3~22.8%の脱塩素水道水で飼育した。

### 3. 試験区の設定

次のように6試験区を設定し、40 L水槽にワクチン処理魚を収容したものを2水槽設けた。同様に対照区には、未処理魚を収容したものを2水槽設けた。

- (1)LPSワクチン投与区(LPS区とする)
- (2)ウサギ赤血球膜結合LPSワクチン投与区(LPS+ウサギ膜区とする)
- (3)油球ワクチン投与区(油球区とする)
- (4)水溶性アジュバント添加油球ワクチン投与区(油球+IMS 区とする)
- (5)オイルアジュバント添加注射ワクチン区(注射区とする)
- (6)未処理対照区(対照区とする)

### 4. 攻撃試験

攻撃は、ワクチン投与終了日から19日後に以下の方法による冷水病原菌浸漬攻撃によっておこなった。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。これをMCY100 mlで15・24時間で浸漬培養した後、MCY4000 mlに全量添加して15・32時間通気培養した。この培養菌(生菌数 $7.0 \times 10^7$  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15.8 ~ 19.5 の脱塩素水道水で21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。

#### 5. ワクチンの有効性の判断

攻撃菌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(RSP) = { 1 - (ワクチン投与区の死亡率/対照区の死亡率) } × 100

また、Fisherの直接確率計算法により対照区とワクチン処理区の死亡率の差を統計的に検定した。

#### 6. 血中凝集抗体価の測定

ワクチン投与終了日から20日後に各試験区から無作為に5尾ずつ採取し、尾柄部から注射器を用いて採血した。得られた血液を4 × 24時間保存した後、4500 rpm・20分間遠心分離して血清を分離した。血清中の補体の非動化は、ヒートブロックに44 × 20分間静置しておこなった。血清は測定に供するまで-80 で凍結保存した。冷水病菌に対する血中凝集抗体価は、630 nm吸光度を0.8に調整したSG990302菌株のホルマリン死菌を用い、各検体の血清をマイクロタイター法により測定した。

## 結 果

#### 1. ワクチンの有効性試験

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LPS区78.3%、LPS+ウサギ膜区63.8%、油球区68.0%、油球+IMS区60.5%、注射区45.7%となり、LPS+ウサギ膜区、油球区、油球+IMS区および注射区において対照区の死亡率84.5%と比較して有意な差が認められた( $P < 0.01$ 、油球区のみ $P < 0.05$ )。また、各試験区の有効率は、LPS区7.3%、LPS+ウサギ膜区24.5%、油球区19.5%、油球+IMS区28.4%、注射区45.9%であった。

#### 2. 冷水病原因菌に対する血中凝集抗体価

各試験区の血中凝集抗体価の測定結果を表2に示した。試験区によって個体差はあるものの、全てのワクチン投与区において抗体価が上昇する検体が確認された。対照区はいずれの検体も凝集は確認されなかった。

## 考 察

ワクチンの有効性試験の結果、LPS区以外のワクチン投与区において対照区の死亡率と比較して有意な差が認め

られた。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た。特に、浸漬、経口ワクチン区ともにワクチンを単独で使用したものより、抗原にアジュバントやウサギ赤血球膜を加えた試験区でより低い死亡率を示した。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となり、経口ワクチンにおいても同様に、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示唆された。また、浸漬ワクチンにおいては、LPSと体表の粘液中に含まれる凝集素(レクチン)に高い凝集活性を示すウサギ赤血球膜を結合させることで、より効率良く体表からワクチンを取り込ませることが可能であることが判明した。今回の結果から、ウサギ赤血球膜結合LPSワクチンおよび水溶性アジュバント添加油球ワクチンは、冷水病に対してワクチンの効果があるものと考えられたが、依然として注射ワクチンに匹敵するほどの有効性を確認するまでには至らなかった。当所では、昨年マイクロカプセル(MC)を用いた経口ワクチンの有効性試験において、MCに含まれる抗原量が増加するに伴い、死亡率が低下することを確認している。そのため、油球ワクチンにおいても投与量を増やすことにより有効性が向上する可能性が期待できるものと思われる。同様にLPSワクチンにおいても、浸漬時間、浸漬回数、ワクチン濃度等を検討することにより、更なる有効性の向上が可能であると推察される。

表1 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 (%)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			計
LPS1	29	1	5	6	4	4	2				1												23	79.3	6.1
LPS2	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
LPS+ウサギ膜1	34	1	3	4	2	1	1	1	2		3		1										19	55.9	33.9
LPS+ウサギ膜2	24		6	3	2	1	2	1		2		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	
油球1	25	1	4	3	3	2	2		1													16	64.0	24.3	
油球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
油球+MS1	21		4	2	2	2	2	1		1													14	66.7	21.1
油球+MS2	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
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
対照1	28	2	6	5	6	2				1	1	2										25	89.3		
対照2	30	1	5	4	2	6	3		1				1	1									24	80.0	
計	58	3	11	9	8	8	3		1	1	1	2	1	1									49	84.5	

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

表2 ワクチン処理終了20日後の各試験区のアユ血中凝集抗体価

試験区	各検体の凝集抗体価					幾何平均
	1	2	3	4	5	
LPS	4	4	4	8	16	6.1
LPS+ウサギ膜	2	2	4	8	8	4.0
油球	2	4	4	4	16	4.6
油球+MS	2	4	4	8	16	5.3
注射	4	4	8	8	8	6.1
対照	<2	<2	<2	<2	<2	<2