

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

近年アユ冷水病は、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、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がおこなわれている。その結果、ワクチンの免疫効果を高める働きのあるアジュバントを添加したワクチンの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あることから、大量処理に適し、より簡便な投与方法の開発が求められている。この点において経口法は理想的な投与方法であるが、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されている。そこで、本試験はアユ冷水病非注射(浸漬・経口)ワクチンの有効性の向上を目的に、より効率良く抗原を取り込ませることのできるワクチン内包腸溶性マイクロカプセル(MC)を用いて経口ワクチン試験をおこなった。また、抗原の取り込み部位の異なる経口ワクチンと浸漬ワクチンを組み合わせることで有効性が高まるかどうか併せて検討した。

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13代目の人工産アユを用いた。供試魚の平均体重は3.9 gであった。

2. 供試菌

供試菌には1999年に滋賀県のアユ冷水病魚の腎臓から分離された*Flavobacterium psychrophilum* SG990302株を用いた。ワクチンの作製には、-80℃で凍結保存していた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回繰り返した菌を用いた。

3. ワクチンの作製

供試菌の培養は、改変サイトファーガ液体培地(以下MCYと称す)50 mlで18℃・24時間で浸漬培養した後、MCY 3000 mlに全量添加して18℃・32時間通気培養した。この培養液に0.3%ホルマリンを加え4℃・48時間静置して不活化させた(以下FKCと称す)。経口ワクチンは、不活化前生菌数が 6.4×10^8 CFU/mlのFKCを8000 rpm、15分間遠心分離した後、上澄みを除去して10倍に濃縮させた

菌液を原(2000)の方法により腸溶解性マイクロカプセルに内包して作製した(以下10倍濃縮FKCMCと称す)。浸漬ワクチンは、不活化前生菌数が 8.0×10^8 CFU/mlのFKCを飼育水で10倍に希釈して作製した(以下10倍希釈FKCと称す)。また、注射ワクチンは、共立製薬株式会社により作製されたアジュバント添加冷水病ホルマリン不活化ワクチン(以下アジュバント添加FKCと称す)を用いた。なお、このワクチンはオイルアジュバンド(MONTANIDOLISA763A:Seppic社製)と冷水病ホルマリン不活化抗原(不活化前生菌数 6.0×10^8 CFU/ml、SG990302株)を重量比7対3で混合したものである。

4. 試験区の設定

試験区は、10倍濃縮FKCMCを1日魚体重(kg)あたり0.5 g、1.0 gおよび2.0 gを週に5日間連続投与後、2日間休止する方法で4週間(合計20日間)投与したものを、それぞれ経口1区、経口2区および経口3区とした。10倍濃縮FKCMCは配合飼料に混合し、給餌量に対し5%のフィードオイルで展着させたものを投与した。経口1区、経口2区および経口3区と同様の処理を施し、翌日に10倍希釈FKCに5分間通気しながら浸漬したものをそれぞれ併用1区、併用2区および併用3区とした。また、陽性対照として1尾あたり50 μ lのアジュバント添加FKCを腹鰭基部後方の腹腔内に注射接種したものを注射区とし、無処理魚を対照区とした。ワクチン投与後は、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、17.8~23.2の脱塩素水道水で飼育した。

5. 攻撃試験

攻撃は、ワクチン投与終了日から経口区は33日後、併用区および注射区は32日後に病魚排水導入法によっておこなった。すなわち、-80℃で保存した冷水病凍結病魚または同病による斃死魚を供試魚150尾を飼育している100 L水槽に投入して冷水病を発生させ、その飼育排水を各試験区30尾ずつ収容した25 Lの試験水槽に200 ml/分となるように注水することによっておこなった。なお、注射区および対照区は試験水槽を各2水槽とした。攻撃後は16.5~19.2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を判定した。

6. 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。

7. 血中凝集抗体価の測定

ワクチン投与終了日から33日後に、各試験区の供試魚の尾柄部から注射器を用いて採血し、4℃・24時間保存した後、4500 rpm・20分間遠心分離して血清を得た。血清は測定を行うまで-80℃で凍結保存した。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。冷水病原菌に対する血中凝集抗体価は各試験区の供試魚2尾分の血清を1検体として5検体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、注射区および対照区は2水槽の合計で計算した。各試験区の死亡率は経口1区で33.3%、経口2区で30.0%、経口3区で26.7%、併用1区で36.7%、併用2区で20.0%、併用3区で16.7%となり、経口区および併用区のいずれの試験区においても対照区の死亡率と比較して有意な差は認められなかった。一方、注射区では死亡率が10.0%となり、対照区の死亡率と比較し

て有意に低下した(危険率1%)。

2. 冷水病原菌に対する血中凝集抗体価

各試験区の供試魚の血中凝集抗体価を表2に示した。各試験区の抗体価の幾何平均値は経口1区で3、経口2区で2、経口3区で2、併用1区で3、併用2区で2、併用3区で3、注射区で11であり、いずれのワクチン投与区においても抗体価が上昇した検体が認められた。なお、対照区の抗体価は全検体とも検出限界値以下であった。

考察

ワクチンの有効性試験の結果、注射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。一方、経口区および併用区はいずれの試験区においても対照区の死亡率と比較して有意な差は認められなかった。しかしながら、経口区、併用区ともにMCに含まれる抗原量が増加するに伴い、死亡率が低下する傾向がみられた。さらに、経口ワクチンと浸漬ワクチンを組み合わせることで有効性が高まるかどうか検討したところ、併用2、3区では経口同区と比較して死亡率が低下した。また、血中凝集抗体価の測定の結果、経口区、併用区ともに検体によるばらつきはみられるものの、いずれの試験区においても抗体価が上昇する検体が確認され、特に経口2区、併用3区において比較的高い値を示す検体がみられた。以上の結果から、経口ワクチンの抗原量を増やすことにより効果が向上し、さらに浸漬ワクチンと組み合わせることによって相乗効果が期待できる可能性が示唆された。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おり、経口および浸漬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ことから、今後は経口および浸漬ワクチンに適したアジュバントの検索が必要である。また、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が報告されていることから、ワクチンを作成する抗原についての培養法なども併せて検討する必要があるだろう。

表2 血中凝集抗体価測定結果

試験区	各検体の凝集抗体価					幾何平均
	2	4	4	2	2	
経口1	2	4	4	2	2	3
経口2	8	<2	<2	2	<2	2
経口3	2	2	4	<2	2	2
併用1	2	2	2	4	4	3
併用2	4	2	<2	2	2	2
併用3	8	2	4	<2	4	3
注射	8	8	16	32	4	11
対照	<2	<2	<2	<2	<2	<2

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																				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			
経口1	30							1	1	2	1	1									1	10	33.3	13.0
経口2	30						2	1	1	2	1							1		1		9	30.0	21.7
経口3	30							1		1		3	1		1		1					8	26.7	30.4
併用1	30				1	2				2	2	1	1					1		1		11	36.7	4.3
併用2	30								1	1		1	2				1					6	20.0	47.8
併用3	30									1	1			1	1			1				5	16.7	56.5
注射	30										1				1					1		3	10.0	73.9
注射	30											1				1				1		3	10.0	73.9
計	60										2				2				1	1		6	10.0	* 73.9
対照	30					1		1	1	1	2	1	3	1					1			12	40.0	
対照	30					1	1		2	1		2	1	2				1				11	36.7	
計	60					2	1	1	3	2	2	3	4	3			1		1			23	38.3	

*: P < 0.01 (Fisherの直接確立計算法による)