

アユのシュードモナス病・冷水病混合ワクチンの有効性試験

谷本 剛・湯浅 明彦

近年養殖アユはシュードモナス病と冷水病の2つの病害による被害が大きく、この2つの疾病を効果的に予防することは、アユ養殖業の経営改善にとって喫緊の課題である。このため、同時に複数の病気に対するワクチンを接種することが可能である注射法を用いたシュードモナス病と冷水病の混合ワクチンの開発に取り組んでいる。これまで、シュードモナス病と冷水病のワクチンを等量混合したものにアジュバントを添加し、アジュバンド添加2種混合ワクチンとして両疾病に対するワクチンの有効性について検討してきたが、シュードモナス病には比較的高い有効性を示したものの、冷水病では効果が認められなかった。そこで、今年度はシュードモナス病と冷水病の両疾病に高い効果の期待できるワクチンの最適な混合比率について検討した。

材料と方法

1. 供試魚

試験には徳島県栽培漁業センターで飼育した平均体重7.6gの海産系継代12代目の人工産アユを用いた。

2. 供試ワクチンおよび投与方法

ワクチンの作製には共立商事株式会社により作製されたシュードモナス病不活化抗原（不活化前生菌数 1.5×10^{10} CFU/ml，FPC941株）と、冷水病不活化抗原（不活化前生菌数 6.0×10^8 CFU/ml，SG990302株）を使用した。混合ワクチンは、各抗原の生菌数がそれぞれ 9.0×10^8 CFU/mlと 9.0×10^6 CFU/ml， 9.0×10^7 CFU/mlと 9.0×10^7 CFU/ml， 9.0×10^6 CFU/mlと 9.0×10^8 CFU/mlとなるように混合し、この混合液3溶とMONTANIDO - ISA763A（Seppic社製）オイルアジュバンド7溶を混合し、それぞれワクチン混合1，ワクチン混合2，ワクチン混合3とした。また、陽性対照としてシュードモナス病と冷水病の不活化抗原の生菌数をそれぞれ 9.0×10^8 CFU/mlとなるように調整し、この調整液3溶とMONTANIDO - ISA763Aオイルアジュバンド7溶を混合し、それぞれワクチンP単，ワクチンF単とした。

ワクチンの投与は、供試魚を0.015%麻酔薬(FA100)で麻酔し、各ワクチン50 μ l/尾を腹鰭基部後方の腹腔内に接種した。接種尾数は各150尾とした。陰性対照には無処理魚を用いた。ワクチン投与後は、攻撃試験を行うまで各試験区の供試魚を16.6～19.4の脱塩素水道水で飼育した。

3. 攻撃試験

シュードモナス病攻撃試験は、ワクチン接種28日後に実施した。攻撃菌液は-80で凍結保存していたシュードモ

ナス病菌（FPC941株）をTSA培地で25℃，24時間培養後、滅菌PBS(-)に懸濁して作製した。攻撃菌濃度は2濃度設定し、 2.0×10^2 CFU/尾および 9.0×10^2 CFU/尾となるように各試験区の供試魚の腹鰭基部後方腹腔内に菌液を50 μ l接種した。

冷水病攻撃試験は、ワクチン接種42日後に実施した。攻撃は冷水病発病魚の飼育排水を各試験区に注入することにより行った(病魚排水添加法)。

攻撃試験の供試魚は各試験区とも30尾とした。なお、冷水病攻撃試験については各試験区30尾 \times 2水槽で行った。攻撃後はシュードモナス病攻撃試験では14日間（水温18.4～19.6℃），冷水病攻撃試験では20日間（水温17.0～18.6℃）脱塩素水道水で飼育し、死亡魚を計数するとともに症状の観察と細菌検査を行い、攻撃による死亡かどうかを判定した。

4. ワクチンの有効性の判定

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

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

5. アジュバンドの残留性

アジュバンドの残留を確認するために、攻撃試験終了後の生残魚を引き続き17の脱塩素水道水で飼育した。ワクチン接種105日，119日および140日後に各30尾を解剖し、腹腔内のアジュバンドの残留の有無を肉眼で確認するとともに不明瞭な場合はスライドガラスに取って顕微鏡で確認した。

結果

1. シュードモナス病ワクチンの有効性試験

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。 9.0×10^2 CFU/尾の攻撃菌濃度の場合，各試験区の死亡率は，ワクチン混合1区，ワクチン混合2区，ワクチン混合3区，ワクチンP単区および対照区でそれぞれ46.7，46.7，46.7，30.0および100.0%であり，いずれのワクチン接種区とも対照区と比較して有意に死亡率が低下した。（有意差1%）また，各ワクチン接種区の有効率は，ワクチン混合1区，ワクチン混合2区，ワクチン混合3区，およびワクチンP単区でそれぞれ53.3，53.3，53.3，および70.0%であった。 2.0×10^2 CFU/尾の攻撃菌濃度の場合，各試験区の死亡率は，ワクチン混合1区，ワクチン混合2区，ワクチン混合3区，ワクチンP単区および対

り、いずれのワクチン接種区とも対照区と比較して有意に死亡率が低下した。(有意差1%) また、各ワクチン接種区の有効率は、ワクチン混合1区、ワクチン混合2区、ワクチン混合3区、およびワクチンP単区でそれぞれ65.4、57.7、73.1および73.1%であった。

2. 冷水病ワクチンの有効性試験

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。2水槽の合計による各試験区の死亡率は、ワクチン混合1区、ワクチン混合2区、ワクチン混合3区、ワクチンF単区および対照区でそれぞれ13.8、16.1、6.7、21.7および48.3%であり、いずれのワクチン接種区とも対照区と比較して有意に死亡率が低下した。(有意差1%) また、2水槽の合計による各ワクチン接種区の有効率は、ワクチン混合1区、ワクチン混合2区、ワクチン混合3区、およびワクチンF単区でそれぞれ71.4、66.7、86.2、および55.1%であった。

3. アジュバントの残留

供試魚のアジュバントの残留状況を表3に示した。腹腔内の幽門垂、肝臓および腸の周辺に白色粒状のアジュバントワクチンが残留していた。残留率はワクチン接種105日、119日および140日後で、それぞれ87.1、60.0および60.0%であった。

考 察

シュードモナス病および冷水病の攻撃試験におけるワクチンの有効性試験の結果、いずれのワクチン接種区とも対照区と比較して有意に死亡率が低下した。また、昨年度のワクチン試験において両ワクチンを等量混合した試験では、冷水病に対して有効性が確認できずシュードモナス病ワクチンとの抗原競合の可能性が示唆されたが、本試験では両ワクチンとも抗原競合によると思われる有効率の低下は見られなかった。このことから、いずれの混合比率におけるワクチンとも両疾病に対して有効であると考えられた。しかしながら、病魚排水添加法による冷水病攻撃試験において、対照区の死亡率がピブリオ病ワクチンの評価の基準である60%に達していないことから、適切な攻撃による再試験の必要がある。今後は、実験結果の妥当性を確保するためにも、対照区において高い死亡率が再現できる攻撃方法を確立する必要がある。また、アジュバントの残留が長期にわたり高率で確認されたことから、残留期間を短縮するため、抗原の濃縮によりアジュバントの投与量を少なくする等の投与法の検討が必要であろう。

表3 アジュバントの残留状況

ワクチン投与後(日)	アジュバント残留率 (%)
105	87.1
119	60.0
140	60.0

表1 シュードモナス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	攻撃菌量 (CFU/尾)	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
混合1	9.0 × 10 ²	30				2	9	1	1						1		14	46.7 **	53.3
混合2		30				1	10	2									14	46.7 **	53.3
混合3		30				7	7										14	46.7 **	53.3
P単		30					5	3	1								9	30.0 **	70.0
対照		30				18	12										30	100.0	
混合1	2.0 × 10 ²	30					6	2	1								9	30.0 **	65.4
混合2		30				1	8							1	1		11	36.7 **	57.7
混合3		30					4	2							1		7	23.3 **	73.1
P単		30					4	2	1								7	23.3 **	73.1
対照		30				1	20	4								1	26	86.7	

* :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
混合1-1	30											1	1	1					1		4	13.3 **	73.3
混合1-2	28														1				2	1	4	14.3 *	69.4
合計	58											1	1	2					3	1	8	13.8 **	71.4
混合2-1	28					1	2														4	14.3 **	71.4
混合2-2	28					1													2		5	17.9 **	61.8
合計	56					1	1	2											2		9	16.1 **	66.7
混合3-1	30												1	1							2	6.7 **	86.7
混合3-2	30												1	1							2	6.7 **	85.7
合計	60												2	1	1						4	6.7 **	86.2
F単-1	30					1						1	2	1	2						7	23.3 *	53.3
F単-2	30											1	2		1				1		6	20.0 *	57.2
合計	60					1						1	3	2	1	3			1		13	21.7 **	55.1
対照-1	30					1						1	2	2					2	2	3	50.0	
対照-2	30						1	1	2	2		1	2	1	3				1	1	1	46.7	
合計	60					1	1	2	2	4		1	2	3	3				3	3	4	48.3	

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