

アユ冷水病ワクチン有効性試験

湯浅 明彦・嶋村 一郎

近年、アユ養殖業に大きな被害をもたらしている冷水病は、再発・投薬を繰り返すことによる経費の増加と生残率の低下をもたらし、経営を圧迫する大きな要因になっている。また、近年天然河川のアユにも冷水病の発生が確認されるなど、ワクチンによる予防対策の確立が急がれている。

昨年オイルアジュバンド（ISA711とISA763A）を添加した注射ワクチンの有効性を検討した結果、ISA763A添加ワクチンの有効性が示唆された。今年、残留性の少ない水溶性アジュバンド（IMS1312）を添加した注射ワクチンと、ISA763Aを添加した冷水病とシュードモナス病の混合注射ワクチンについて有効性試験を行った。

材料と方法

試験には徳島県栽培漁業センター産人工生産アユ（平均魚体重9.9g）を用いた。ホルマリン不活化菌液は、98年に本県の養殖アユから分離されたPT98099株を使用した。

この菌株を改変サイトファーガ液体培地に懸濁し、15℃、72時間で1日3回振とうをおこない培養し、ホルマリンを0.3%添加して不活化した後4℃で保存した。不活化前の生菌数は 1.4×10^8 CFU/mlであった。得られた不活化菌液と水溶性アジュバンドIMS1312を体積比1:1の割合で混合してワクチンを作成した。オイルアジュバンド添加混合ワクチンについては、共立製薬株式会社より分与されたISA763A添加混合ワクチンを使用した。アジュバンドワクチンの安全性を確認するために、ワクチン接種後の死亡、遊泳状況、摂餌状況等を観察した。

ワクチンの投与は、腹鰭基部後方の腹腔内にワクチン液を0.05ml注射する方法で行った。

改変サイトファーガ寒天培地で15℃、24時間培養したPT98099株を滅菌水道水に懸濁し、10倍段階希釈をおこない所定の濃度に調整した。調整した菌液をワクチン接種後4週目に背鰭基部前方の皮下に0.05ml接種して感染試験を行った。対照区は生理食塩水を同様に皮下接種した。攻撃後2週間死亡を観察し、適宜細菌分離を行った。また2週間経過後の最終死亡率から次式により有効率を算出した。

有効率(%) = (1 - (ワクチン区の死亡率 / 対照区の死亡率)) × 100

アジュバンドワクチンの残留性検査として、ワクチン接種後2週間後から4週間後にかけて試験魚の剖検を行い、肉眼によりアジュバンドの残留を確認した。

結果と考察

結果を表1、2に示した。

ワクチンの安全性については、水溶性アジュバンドワクチン、オイルアジュバンド添加混合ワクチンともに接種後の死亡はなかったが、ワクチン接種後に摂餌量が低下した。

2段階の接種菌量で攻撃試験を実施し、2区は1区の接種菌量の1/10に設定した。水溶性アジュバンド添加ワクチンの死亡率は1区が57%、対照区は55%、2区では35%、対照区は55%であった。オイルアジュバンド添加混合ワクチンでは、1区が64%、対照区は79%、2区では30%、対照区は62%であった。その結果、有効率は水溶性アジュバンドワクチンが3.9%と37%、オイルアジュバンド添加混合ワクチンが20%と51%であった。オイルアジュバンド添加混合ワクチンでは対照区の死亡率が60%に達した時点の有効率（RPS60）を算出したところ、44%と53%であった。統計学的な有意差の検定をFisherの直接確率計算法で行った結果、有意差（危険率5%）が認められたのはオイルアジュバンド添加混合ワクチン2区だけであった。水溶性アジュバンド添加ワクチンではワクチン接種後4週間経過後にワクチンの残留は認められなかったが、オイルアジュバンド添加混合ワクチンでは攻撃試験終了後（接種後6週間経過後）に残留が認められた。

両ワクチンとも有効率は低く、顕著な免疫効果を示さなかった。水溶性アジュバンドは、ほとんど残留がないが有効性が認められないことから実用性は乏しい。オイルアジュバンド添加混合ワクチンは、顕著ではないが有意な有効性が認められた。しかし、冷水病単価ワクチンの場合には更に高い有効性が確認されていることから、シュードモナス病ワクチンと混合することによって抗原競合あるいは干渉が生じ、有効性が低下したことが考えられる。

表1 水溶性アジュバンド (IMS1312) 添加冷水病ワクチンの有効性試験結果

(攻撃試験における死亡状況)														(有効率と有意差の検定)							
試験区	(CFU/ 尾)	供試尾数	経過日数														平均死 亡日数	試験区	死亡率 %	有効率 %	P*
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14					
1区	4.3×10 ⁷	21	6	4	2											12	2.7	1区	57.1	-3.9	0.674
対照区		20	10	1												11	2.1	対照区	55.0		
2区	4.3×10 ⁶	23	2	5		1										8	3.1	2区	34.8	36.8	0.153
対照区		20	10	1												11	3.1	対照区	55.0		

※Fisherの直接確率計算法

表2 アジュバンド添加混合ワクチンの冷水病有効性試験結果

(攻撃試験における死亡状況)														(有効率と有意差の検定)								
試験区	(CFU/ 尾)	供試尾数	経過日数														平均死 亡日数	試験区	死亡率 %	有効率 %	RPS60 %	P*
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14						
1区	3.7×10 ⁶	22			9	2	2	1								14	4.7	1区	63.6	19.6	43.8	0.200
対照区		24			16	2	1									19	4.2	対照区	79.2			
2区	3.7×10 ⁵	23		2	4	1										7	4.9	2区	30.4	50.5	53.3	0.028*
対照区		26		2	5	4	4	1								16	4.8	対照区	61.5			

※Fisherの直接確率計算法

* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001