

アユシュードモナス病ワクチン有効性試験

湯浅 明彦・嶋村 一郎

アユ養殖業に被害をもたらしているシュードモナス病は薬剤感受性が低く、投薬による治療が困難である。これまで、試作ワクチンを用いてシュードモナス病を予防する可能性を検討してきたが、昨年オイルアジュバンドを添加した注射ワクチンの有効性が確認された。しかし、注射は煩雑であるとともに魚体サイズにより使用が制限される。そこで、簡便な浸漬ワクチンの再試験と、注射ワクチンの長所の一つである混合（多価）ワクチンについて試験を実施した。

なお、この試験は社団法人日本水産資源保護協会から委託を受けた水産用ワクチン推進化事業により行った。

材料と方法

試験は徳島県栽培漁業センター産人工種苗（平均魚体重4.8g）を、1試験区に30尾使用して行った。

使用したオイルアジュバンド添加混合ワクチン及び不活化ワクチンは、共立製薬株式会社より分与されたものである。オイルアジュバンド添加ワクチンは、*Pseudomonas plecoglossicida* FPC941株の生菌 1.7×10^{10} CFU/mlを含む培養液を0.8%ホルマリンで不活化したものと、1987年に本県で分離された冷水病原菌FPC840株の生菌 6.1×10^8 CFU/mlを含む培養液を0.3%ホルマリンで不活化したものを等量混合し、この混合液3溶とISA763Aオイルアジュバンド7溶を混合しエマルジョンにしたものである。不活化ワクチンは、前述のFPC941株の菌体 1.7×10^{10} CFU/mlを含む0.8%ホルマリン不活化菌液である。

オイルアジュバンド添加混合ワクチンは、腹鰭基部後方の腹腔内にワクチン液0.05mlを注射により投与した。不活化ワクチンは、飼育水で10倍に希釈したワクチン液に10分間供試魚を浸漬することにより投与した。ワクチンの安全性の確認はワクチン接種後の死亡、遊泳状況および摂餌状況の観察によりおこなった。

攻撃試験は、TSA培地で25℃、24時間培養したFPC941株を滅菌生理食塩水に懸濁し、10倍段階希釈で所定の濃度に調整した後に供試魚の腹腔内に0.05ml接種することにより実施した。

効果判定は攻撃試験後2週間死亡を観察し、死亡魚から細菌分離を行った。また2週間経過後の最終死亡率から有

効率を算出した。また、アジュバンドの残留確認は、死亡魚の剖検時に目視で行った。

結果及び考察

試験結果を表1、2に示した。

ワクチン接種に伴う異常は、接種後数日間摂餌量が低下した程度であり、ワクチンの安全性は問題がなかった。攻撃試験における接種菌量を、アジュバンド添加混合ワクチンでは3段階に、浸漬ワクチンでは2段階に設定した。死亡率は、アジュバンド添加混合ワクチンの1区が23%、対照区は47%、2区では43%、対照区が100%であった。浸漬ワクチンは1区が87%、対照区は100%、2区では37%、対照区が47%であった。その結果、有効率はアジュバンド添加混合ワクチンが50%、57%及び36%、浸漬ワクチンが13%と21%であった。対照区の死亡率が60%に達した時点の有効率（RPS60）は、アジュバンド添加混合ワクチン2区が46%、浸漬ワクチン1区が18%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0.1%）が認められたのはアジュバンド添加混合ワクチン2区だけであった。アジュバンドワクチンの残留は、ワクチン接種後4週間後まで認められた。

アジュバンド添加混合ワクチンは2区以外の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%よりも低く、有効率も低くなった。攻撃方法が適切であれば、有意な有効性を示すことが考えられることから再試験が必要である。また、白い油滴状のアジュバンドワクチンの残留が1ヶ月後までは確認されたが、その後の残留期間の確認が必要である。浸漬ワクチンについては、有効率が低く実用性に乏しい結果になった。

表1 アジュバンド添加混合ワクチンのシュードモナス病有効性試験結果

(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	9.5×10 ⁴	30			2	1	1	3								7	4.7	1区	23.3	50.0		0.052
対照区		30			6	3	1	4								14	4.2	対照区	46.7			
2区	9.5×10 ⁵	30			3	9		1								13	3.9	2区	43.3	56.7	45.5	3.09×10 ⁻⁷ ***
対照区		30			14	8	5	3								30	3.9	対照区	100.0			
3区	1.9×10 ⁵	30			3	4			2							9	4.3	3区	30.0	35.7		0.144
対照区		30				6	3		2	2	1					14	5.6	対照区	46.7			

※Fisherの直接確率計算法
* : P<0.05、** : P<0.01、*** : P<0.001

表2 シュードモナス病浸漬ワクチンの有効試験結果

(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	9.5×10 ⁵	30			10	8	8									26	3.9	1区	86.7	13.3	18.2	0.056
対照区		30			14	8	5	3								30	3.9	対照区	100.0			
2区	1.9×10 ⁵	30			3	7			1							11	4.1	2区	36.7	21.4		0.300
対照区		30				6	3		2	2	1					14	5.6	対照区	46.7			

※Fisherの直接確率計算法