

アユシュードモナス病ワクチン試験

嶋村 一郎・萩平 将

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各種水産用医薬品に対する感受性が著しく低い。薬剤による治療は困難であることから、ワクチン等による予防に重点を置いた対策法の開発が必要である。そのため、これまでに試作ワクチンを用いた免疫付与によるシュードモナス病の予防の可能性を検討してきたが、明らかな効果は確認できなかった。

そこで、従来の不活化菌体のみのワクチンに加え、免疫補助物質として2種類の植物オイルベースのオイルアジュバントを添加したアジュバントワクチンについて免疫付与によるシュードモナス病予防の可能性を検討した。

なお、この試験は(社)日本水産資源保護協会の委託事業である水産用ワクチン推進化事業により行った。

材料と方法

・不活化抗原液

動生協から分与された *Pseudomonas plecoglossicida*FPC941 株の 0.8%ホルマリン不活化抗原を使用した。

・使用アジュバント液およびアジュバントワクチンの調整

養殖研究所免疫研究室から分与された植物オイルベースの ISA711 および ISA763A オイルアジュバントを使用した。

アジュバントワクチンは、連結針で接続した2本のガラスシリンジを用いて、不活化抗原液とアジュバント液をエマルジョンになるまで混合して調整した。この際のアジュバント液と不活化抗原液の混合比率は体積比で7:3とした。

・供試魚

徳島県栽培漁業センター産の人工生産アユを使用した。供試魚の平均魚体重は3.2gであった。

・ワクチン投与

不活化ワクチンおよびアジュバント添加ワクチンをともに腹腔内注射により投与した。供試アユをFA100で麻酔後、腹鰭基部後方に垂直に注射針を差し込み、1尾あたり0.05ml接種した。

・効果判定方法

効果を判定するために、ワクチン接種後2週間後及び4週間後に人為感染試験を行った。人為感染は

皮下注射法によりおこない、使用した菌株はワクチン作成菌株と同じ FPC941 株である。接種菌液量は 1 尾あたり 0.05ml とし、攻撃菌数は 1 尾あたり 10^5 または 10^6 CFU とした。菌液接種後 14 日間経過観察を行い、その間に死亡した被検魚は取り上げ、細菌検査により死亡原因を特定した。

試験終了後に対照区、ワクチン投与区の死亡率から有効率を求め、効果判定を行った。有効率は次式により算出した。

$$\text{有効率} = (1 - \text{ワクチン区の死亡率} / \text{対照区の死亡率}) \times 100$$

また、全ての試験区において攻撃が強すぎて有効率による判定が難しくなった場合は、次式の RPS60 を算出して判定を行った。

$$\text{RPS60} = (1 - \text{対照区の死亡率が 60\% の時点でのワクチン区の死亡率} / \text{対照区の死亡率}) \times 100$$

・アジュバントワクチンの残留性および魚体に対する安全性について

ワクチン接種群について、人為感染時に死亡した個体を解剖し、腹腔内のワクチン残留の有無を調べた。また、ワクチン接種後に死亡した個体について細菌検査を行い、死亡原因を調査した。

結 果

結果を表 1 に示した。

ワクチン接種後 14 日目の人為感染試験での各ワクチンの有効率は 711 アジュバント添加区で 38.2%、763A アジュバント添加区では 54.9%、不活化ワクチン区では 11.9% であった。711 アジュバント添加ワクチン区の有効率 38.2% では十分な予防効果が期待できないが、763A アジュバントの有効率は 54.9% であり、シュードモナス病に対する予防の可能性が示唆された。

ワクチン接種後 28 日目の人為感染試験では、対照区を含むすべての試験区で十分な死亡率が得られなかったため、ワクチンの予防効果の判定ができなかった。そこで、ワクチン接種後 28 日目の人為感染試験で生き残った魚を用いて、42 日目に再び人為感染試験を行った。ところが、今度は対照区を含むすべての試験区で死亡率が 90% 以上になり、有効性の評価ができなかった。そこで、42 日目の試験に関しては有効率のほかに RPS60 (対照群の死亡率が 60% 以上となった時点での有効率) による評価を行った。各ワクチンの RPS60 は 711 アジュバント添加区で 36%、763A アジュバント添加区で 29%、不活化ワクチン区で 8% となった。今回の試験では、アジュバント添加ワクチンについて若干の有効性が認められるが、十分な予防効果があるとは言えない。しかし、アジュバントを添加すると、昨年までの浸漬ワクチンおよび不活化菌体のみの注射ワクチンよりも有効率が高くなることから、シュードモナス病ワクチン開発の可能性が示唆された。

また、ワクチン接種による死亡は認められなかったため、魚に対する安全性の問題は無いが、油滴状のワクチンが体内に残留していた供試個体が 56 日目まで確認されるなど、オイルアジュバントの残留性が問題である。

今後は、実用化に向けてほとんど残留がないとされる水溶性アジュバントワクチンの効果とオイルアジュバントワクチン効果の追試を行い、ワクチンによる予防の可能性をさらに検討していく必要がある。

表 1 シュードモナス病ワクチン試験結果

ワクチン接種14日後

試験区	攻撃菌数 (CFU/尾)	供試尾数	経過日数														死亡尾数	死亡率	有効率
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
711アジュバ ント添加区	6.2×10^4	35			9	3						5	1	1	2		21	60	38.18
763アジュバ ント添加区	6.2×10^4	32			8	2						2		1	1		14	43.75	54.92
不活化 ワクチン区	6.2×10^4	35			27	3											30	85.714	11.69
対照区	6.2×10^4	34			32	1											33	97.059	

ワクチン接種後28日目

試験区	攻撃菌数 (CFU/尾)	供試尾数	経過日数														死亡尾数	死亡率	有効率
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
711アジュバ ント添加区	6.0×10^4	35												1			1	2.86	82.86
763アジュバ ント添加区	6.0×10^4	37		1								1					2	5.41	67.57
不活化 ワクチン区	6.0×10^4	34		1													1	2.94	82.35
対照区	6.0×10^4	30		2		1		1					1				5	16.67	

ワクチン接種後42日目(28日目の再感染試験)

試験区	攻撃菌数 (CFU/尾)	供試尾数	経過日数														死亡尾数	死亡率	有効率	RPS60
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14				
711アジュバ ント添加区	3.2×10^5	34	19	2		4	1			4	2	1					33	97.06	-1.10	36.36
763アジュバ ント添加区	3.2×10^5	35	22	4		1	1			4							32	91.43	4.76	29.55
不活化 ワクチン区	3.2×10^5	33	27	3	1	2											33	100.00	-4.17	7.95
対照区	3.2×10^5	25	22			2											24	96		