

ホルマリン不活化抗原によるアユシュードモナス症の免疫

付与試験 III

嶋村 一郎・福永 稔

目的

平成9年度まで実施してきたホルマリン不活化抗原による免疫付与の可能性を検討した。今年度も引き続きホルマリン不活化抗原による免疫付与の可能性を検討すると共に、現在すでに認可されているアユのピブリオ病ワクチンとの併用による効果の検討を行った。

材料と方法

供試した抗原原液

シュードモナス病抗原は共立商事(株)が作成した *Pseudomonas* sp.FPC941 株のホルマリン不活化抗原を昨年同様使用した。ピブリオ病抗原については共立商事(株)から発売されているアユのピブリオ病不活化ワクチン「ピシパックアユ」を使用した。

抗原の投与

投与時の抗原濃度および作用時間を表1に示した。

平均魚体重 4.9g の本県栽培漁業センター産人工種苗を用い、浸漬法により投与した。投与時の水温は 19.0 であった。抗原投与後、250L 水槽に収容し飼育した。給餌は1日3回で給餌率 2.5~3%、飼育期間中の水温は 18.9~23.6 であった。

攻撃菌の調整

攻撃試験には、*Pseudomonas* sp.FPC941 株を使用した。1回魚体通過をおこなった FPC941 株を TSA 寒天培地で 24 時間培養後、滅菌生理食塩水に懸濁し、所定の濃度に調整した。調整した菌液を飼育水で 10^5 , 10^6 CFU/ml に希釈し、試験に供した。滅菌生理食塩水に懸濁した時点で菌数の計測を寒天平板法によりおこない、正確な攻撃菌数を求めた。

感染試験

抗原の投与後 14 日目および 50 日目に各区 25 尾ずつ 50L 水槽に収容し感染試験に供した。14 日目、50 日目ともに飼育水で 10^5 , 10^6 CFU/ml の濃度に調整した菌液 5L に 10 分間浸漬して感染させた。感染後、14 日間飼育し死亡状況の観察および死亡魚からの細菌の再分離をおこなった。

結果

試験結果を表2に示した。

ワクチン処理後14日目に攻撃をおこなったものでは、対照区を含めたすべての試験区で死亡率が20%以下であった。ワクチン処理後50日目に攻撃をおこなったものでは、 10^5 CFU/ml 攻撃区で対照区を含めたすべての試験区において25%以下の死亡率にとどまった。一方、 10^6 CFU/ml 攻撃区では対照区での死亡率が60%となったため、*アユのピブリオ病ワクチンの有効性判定に従い、それぞれの試験区の有効率を求めた。その結果、有効率は14%~33%にとどまった。また、細菌検査の結果、死亡魚全てからシュードモナス病菌が分離され、シュードモナス病特有の腹腔内出血および腹水等が認められた。このことから死亡魚は全てシュードモナス病により死亡したものと判断された。

*ピブリオ病ワクチンの有効性判定法：対照区での死亡率が60%以上で、かつ有効率が60%以上の場合に有効と判断。

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

考察

今回の試験では、ホルマリン不活化抗原によるシュードモナス病ワクチンの顕著な効果は認められなかった。しかしながら、50日目の 10^6 CFU/ml 攻撃区ではシュードモナス病ワクチン処理区の方が対照区に比べ、死亡がはじまる日数が遅く、ワクチン処理による効果と考えられた。ピブリオ病ワクチンを併用した試験区とシュードモナス病ワクチン単独使用の試験区とでは有効率に差は認められず、ピブリオ病ワクチンの使用による効果あるいは悪影響はないと考えられた。また、今回は浸漬法により 10^6 、 10^5 CFU/ml で攻撃試験を実施した。安定した攻撃結果を得るためには、攻撃菌濃度、攻撃方法および攻撃菌株のさらに検討が必要であると思われた。

また、ワクチン投与方法についてもより高い効果が期待できる注射法やアジュバント添加ワクチンの使用などの検討が必要であると考えられる。

表.1 ワクチン処理

試験区	使用ワクチン	ワクチン濃度	処理時間	攻撃菌数
1区	Pワクチン+Vワクチン	P:10倍 V:100倍	10分(浸漬)	10^6 , 10^5
2区	Pワクチン	P:10倍	10分(浸漬)	10^6 , 10^5
3区	Vワクチン	V:100倍	10分(浸漬)	10^6 , 10^5
4区	無処理			10^6 , 10^5

P:シュードモナス病ワクチン
V:ピブリオ病ワクチン

表.2 結果(ワクチン処理 14日目)

試験区	攻撃菌数 (CFU/ml)	供試尾数	死亡尾数	死亡率 (%)	有効率 (%)
1区	2.0×10^6	25	5	20	0.0
	2.0×10^5	25	1	4	66.7
2区	2.0×10^6	25	4	16	20.0
	2.0×10^5	25	2	8	33.3
3区	2.0×10^6	25	1	4	80.0
	2.0×10^5	25	2	8	33.3
4区	2.0×10^6	25	5	20	—
	2.0×10^5	25	3	12	—

表.3 結果(ワクチン処理 50 日目)

試験区	攻撃菌数 (CFU/ml)	供試 尾数	死亡尾数	死亡率 (%)	有効率 (%)
1区	3.2×10^6	25	10	40	33.3
	3.2×10^5	25	4	16	33.3
2区	3.2×10^6	25	11	44	26.7
	3.2×10^5	25	3	12	50.0
3区	3.2×10^6	25	13	52	13.3
	3.2×10^5	25	7	28	—
4区	3.2×10^6	25	15	60	—
	3.2×10^5	25	6	24	—