

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－Ⅱ

杉本善彦・福永 稔

目的

近年、アユ養殖業において、被害量が増加しているシュードモナス症は、その原因菌の各種水産用医薬品に対する感受性が著しく低く、薬剤による治療が困難である。

このためホルマリンで不活化した菌体による免疫付与の可能性について検討を行った。昨年度は独自に作成したホルマリン不活化抗原を用いて実験を行ったが、培養段階で高濃度の菌液が得られず、有効性は認められなかった。そこで今年度は動物用ワクチンメーカーが試作した抗原原液を用いて、免疫成立期間及び持続期間について検討した。

材料及び方法

供試した抗原原液

共立商事（株）が作成した *Pseudomonas* sp. EPC941 株のホルマリン不活化抗原を用いた。この抗原原液の不活化前の生菌数は 1.7×10^{10} CFU/ml、ホルマリン濃度は 0.8% であった。

抗原の投与

平均体重 2.9g の本県栽培センター産人口種苗を用い、浸漬法で投与した。投与時の濃度と時間を表 1 に示した。投与時の水温は、23.6℃ であった。投与後、250l 水槽に収容し飼育した。給餌は 1 日 4 回で、給餌率は 4%、飼育期間中の水温は、19.4～23.2℃ であった。

表 1 試験区

試験区	濃度	時間
1区（標準法）	10倍	2分
2区（低長法）	100倍	10分
3区（対照区）	無処理	

感染試験

抗原の投与後 14、28 及び 60 日目に、各区 25 尾ずつ水槽に収容し感染試験に供した。14 日目の感染

試験では、*Pseudomonas* sp. NS-94815 株及びを用い、 10^3 、 10^4 及び 10^5 CFU/ml の 3 段階の濃度の菌液に 10 分間浸漬した。また 28 日目及び 60 日目の感染試験では、*Pseudomonas* sp. EPC941 株及びを用い、 10^5 、 10^6 及び 10^7 CFU/ml の 3 段階の濃度の菌液に 10 分間浸漬した。その後 14 日間飼育し死亡状況を観察した。感染試験時の水温はいずれも 23.1°C 、感染試験後の飼育水温は $19.4\sim 23.2^{\circ}\text{C}$ 、 $21.0\sim 22.7^{\circ}\text{C}$ 及び $18.5\sim 20.2^{\circ}\text{C}$ であった。

結果

感染試験の結果を表 3 に示した。

アユのビブリオ病ワクチンの効果判定においては、対照区の死亡率が 60% を超えることが条件となっている。今回の実験においてこの条件を満たした実験区は 1 例のみであった。このため有効率（（1－ワクチン区の死亡率／対照区の死亡率） $\times 100$ ）とともに Fisher の正確確立検定法により有効性の判定を行った。

1 回目の感染試験では、有効率が 60% を超えた 2 区については、Fisher の正確確立検定法によって検討したところ、有意水準 5% で有効と判断された。

2 回目の感染試験では、対照区の死亡率がいずれも 60% に満たなかったものの有効率は標準法、低長法とも、60% 以上を示した。また、同区の結果について、Fisher の正確確立検定法によって検討したところ全ての試験区で、有意水準 5% で有効と判断された。

3 回目の感染試験では、標準法・ 10^6 CFU/ml 区のみが有効率 80%、 $p=0.025$ で有効と判定された。

考察

今回の結果から、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の有効性が認められた。

免疫成立期間については、抗原投与後 14 日目の感染試験で有効とみなされたのは 6 例中 2 例のみであり、28 日目の感染試験では 6 例全てが有効であったことからワクチンとしての効果が期待できるのは 14 日目以降であると思われる。

また、免疫の持続期間については、抗原投与後 60 日目の感染試験における有効例が 6 例中 1 例のみであったことから投与後 60 日以内であると考えられる。ビブリオ病ワクチンにおいては、投与後 14 日目で十分な効果が見られることから、使用する抗原原液、投与方法を更に検討することで免疫成立期間を短縮できるものと思われる。

また、持続期間の伸長についても、今後追加免疫やアジュバンドの効果を検討する必要があると思われる。

表 2 感染試験による死亡状況と有効率

第1回感染試験（抗原投与後14日目）

試験区	攻撃菌数	供試尾数	死亡尾数	死亡率	有効率	p
1区 (標準法)	8.6×10^3	25	1	4	0	1
	8.6×10^4	25	0	0	100	0.025
	8.6×10^5	25	0	0	—	1
2区 (低長法)	8.6×10^3	25	2	8	—	1<
	8.6×10^4	25	1	4	80	0.025
	8.6×10^5	25	3	12	—	1<
3区 (対照区)	8.6×10^3	25	1	4		
	8.6×10^4	25	5	20		
	8.6×10^5	25	0	0		

第2回感染試験（抗原投与後28日目）

試験区	攻撃菌数	供試尾数	死亡尾数	死亡率	有効率	p
1区 (標準法)	1.6×10^5	25	0	0	100	0.002
	1.6×10^6	25	0	0	100	0.000
	1.6×10^7	25	0	0	100	0.001
2区 (低長法)	1.6×10^5	25	1	4	93.3	0.012
	1.6×10^6	25	0	0	100	0.000
	1.6×10^7	25	2	8	77.3	0.001
3区 (対照区)	1.6×10^5	25	8	32		
	1.6×10^6	25	13	52		
	1.6×10^7	25	9	36		

第3回感染試験（抗原投与後60日目）

試験区	攻撃菌数	供試尾数	死亡尾数	死亡率	有効率	p
1区 (標準法)	6.2×10^5	25	0	0	—	—
	6.2×10^6	25	1	4	80	0.025
	6.2×10^7	25	13	52	3.3	0.388
2区 (低長法)	6.2×10^5	25	0	0	—	—
	6.2×10^6	25	5	20	0	1
	6.2×10^7	25	10	40	33.3	0.203
3区 (対照区)	6.2×10^5	25	0	0		
	6.2×10^6	25	5	20		
	6.2×10^7	25	15	60		

有効率：(1-ワクチン区の死亡率/対照区の死亡率) × 100

p：Fisherの正確確立検定法による有効性指数