

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 -

杉本善彦・沢田健蔵

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。

材料および方法

実験 1

ホルマリン不活化抗原の作成

長野水試から分与された *Pseudomonas* sp.NS-94815 株を 31 のブレインハートインフュージョン液体培地に懸濁させ、エアレーションによる攪拌を行いながら 25℃ で 48 時間培養した。この菌液に 0.3% のホルマリンを添加し、菌を不活化したものを抗原原液とした。なお不活化前の生菌数は 1.72×10^8 CFU/ml であった。また、より高い菌濃度を得るため、抗原原液を遠沈し、沈殿物を上清に再懸濁して、原液の 10 倍濃度とした物を作成し、濃縮抗原原液とした。

抗原の投与

平均体重 1.7g 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、15.8℃ であった。投与後、250l 水槽に収容し 16 日間飼育した。給餌は 1 日 4 回で、給餌率は 4%、飼育期間中の水温は、14.4～15.8℃ であった。

表 1 試験区

試験区	濃度	時間
対照区		無処理
ワクチン処理区	10 倍	10 分
濃縮ワクチン処理区	10 倍	10 分

感染試験

抗原の投与後 16 日目に ,各区 25 尾ずつ水槽に収容し ,感染試験に供した。感染試験には ,*Pseudomonas* sp.NS - 94815 株を用い , 6.7×10^5 , $\times 10^6$ CFU/ml の 2 段階の濃度の菌液に 10 分間浸漬した後 ,14 日間飼育し ,死亡状況を観察した。感染試験時の水温は 15.0 ~ 14.5 , 感染試験後の飼育水温は 16.8 ~ 17.7 であった。

実験 2

ホルマリン不活化ワクチンの作成

Pseudomonas sp.NS - 94815 株をトリプトソーヤ寒天平板培地 5 枚で 25 , 24h 培養後集菌し ,100ml のブレインハートインフュージョン液体培地に懸濁させ , この菌液に 0.3%のホルマリンを添加し , 菌を不活化したものを抗原原液とした。なお不活化前の生菌数は 7.5×10^9 CFU/ml であった。

抗原の投与

平均体重 3.9g 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。対照区はブレインハートインフュージョン液体培地を用いて同様に処理した。投与時の濃度と時間を表 2 に示した。投与時の水温は ,14.9 ~ 14.7 であった。投与後 ,250l 水槽に収容し 19 日間飼育した。給餌は 1 日 4 回で ,給餌率は 4%であった。

表 2 試験区

試験区	濃度	時間
対照区	1 0 0 倍	1 0 分
ワクチン処理区	1 0 0 倍	1 0 分

感染試験

抗原の投与後 19 日目に ,各区 25 尾ずつ水槽に収容し ,感染試験に供した。感染試験には ,*Pseudomonas* sp.

NS - 94815 株を用い , 6.2×10^4 , $\times 10^5$, $\times 10^6$ CFU/ml の 3 段階の濃度の菌液に 10 分間浸漬した後 ,25 日間飼育し ,死亡状況を観察した。感染試験時の水温は 15.0 ~ 14.5 , 感染試験後の飼育水温は 15.1 ~ 15.9 であった。

結果

実験 1

感染試験の結果を表 3 に示した。対照区の死亡率は ,いずれも高い値を示し ,人為感染については成功した。ただし ,ワクチンの効果については ,4 区中 3 区で ,死亡率が対照区を上回り ,唯一対照区よりも死亡率の低かったワクチン処理・ 6.7×10^5 CFU/ml 攻撃区についても ,有効率 ((1 - ワクチン区の死亡率 / 対照区の死亡率) $\times 100$) は ,15.8%と低かった。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、 $p=0.269$ となり、優位水準 5%では、無効と判断された。

実験 2

感染試験の結果を表 4 に示した。ワクチンの効果については、3 区中 2 区で、死亡率が対照区を上回り、唯一対照区よりも死亡率の低かった 6.2×10^5 CFU/ml 攻撃区の 14 日目についても、有効率は、30%と低かった。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、 $p=0.276$ となり、優位水準 5%では無効と判断された。

考察

実験 1 においては、液体培地による培養で抗原原液の作成を試みたが、培養時間を延長しても生菌数が $\times 10^8$ CFU/ml を超えることはなかった。この事は、予備試験として、マグネチックスターラーを用いて攪拌した場合でも同様であった。現在認可されているアユのピブリオ病ワクチンでは、不活化前の生菌数は、 10^{11} CFU/ml 以上が保証されており、承認された低濃度長時間法（100 倍・10 分）においても、処理時の菌濃度は今回の濃縮ワクチン区の 10 倍となっている。ピブリオ病菌は、実験室内でも容易に高濃度の培養が可能であるが、培地での発育がより良好なシュードモナス病菌ではそれが困難であった。これは、ピブリオ病菌は通性嫌気性菌であるのに対して、シュードモナス病菌は好気性菌である事に起因していると思われる。したがって、シュードモナス病菌を高濃度で培養するには、培地内を好気的な環境に維持するため、攪拌、エアレーション等の手法を改良する必要があると思われる。

また、ワクチンの投与方法については、今回は浸漬法について検討したが、今後は注射法による投与についても検討する必要がある。

表 3 感染試験による死亡状況と有効率

試験区	攻撃菌数	供試尾数	死亡尾数	死亡率	有効率
対照区	6.7×10^5	25	19	76	
	6.7×10^6	25	21	84	
ワクチン区	6.7×10^5	25	16	64	15.8
	6.7×10^6	25	24	96	-14.3
濃縮 ワクチン区	6.7×10^5	25	21	84	-10.5
	6.7×10^6	25	24	96	-14.3

表 4 感染試験による死亡状況と有効率

試験区	攻撃菌数	供試尾数	14日目			25日目		
			死亡尾数	死亡率	有効率	死亡尾数	死亡率	有効率
対照区	6.2×10^3	25	3	12		4	16	
	6.2×10^4	25	10	40		12	48	
	6.2×10^5	25	21	84		23	92	
ワクチン区	6.2×10^3	25	5	20	-66.7	6	24	-50
	6.2×10^4	25	7	28	30	10	40	16.7
	6.2×10^5	30	26	86.7	-3.2	29	96.7	-5.1