

低濃度・長時間法処理によるアユ・ ビブリオ病ワクチンの有効性試験

池脇 義弘・沢田 健蔵

アユ・ビブリオ病不活性化ワクチンの用法は、ワクチン原液を 10 倍に希釈しその中にアユ（体重 3g 以上）を 2 分間浸漬することとなっている。しかし、この‘高濃度・短時間’処理は煩雑な作業となるため、より簡便で実用的なワクチン処理法である“低濃度・長時間法”の開発が望まれている。また、体重 3g 以下の小型アユへの使用に対する要望も強い。

低濃度・長時間法のワクチン効果は様々な希釈倍率および浸漬時間で検討されてきた¹⁻⁷⁾。

その中には有効例もいくつか存在したが、特に 500 倍以上に希釈した場合、結果にばらつきがみられた。また、体重 3g 以下のアユに対するワクチンの効果も十分には検討されていない。そこで今回、小型水槽を使用した室内飼育で、体重 1g 前後のアユに対して希釈倍率 200 倍以下で低濃度・長時間法によるワクチン処理を行い、その有効性を検討した。なお、本研究は、全国湖沼河川養殖研究会アユビブリオ病研究部会の連絡試験として実施したものである。

材料および方法

供試ワクチン

市販のアユ・ビブリオ病ワクチン（アユ・ビブリオ病ワクチン“日生研”）を用いた。

実験区・ワクチン処理法

表 1 に示すように 5 つの実験区を設定した。供試魚は、病歴や投薬歴のない平均体重 0.99g の人工産アユを用いた。各区 200 尾（試験区 1 のみ 199 尾）ずつ、対照区以外はそれぞれの条件（表 1）で 1990 年 4 月 24 日にワクチン処理を行った。

表 1 実験区

区	ワクチン処理法	
	希釈倍率	浸漬時間 (分)
試験区 1	50	10
2	100	10
3	200	10
標準法区	10	2
対 照 区	無	処 理

飼育方法

飼育条件は表 2 に示した。

供試魚をワクチン処理後ただちに水槽に収容し、1990年7月23日までの90日間飼育を行い、その間の給餌量、斃死原因および尾数を記録した。また、試験開始後30、59および90日目に、各区20尾ずつ体重を測定した。

表 2 飼育条件

項 目	条 件
水 槽	1.2×0.7m (水深0.4m)
水 源	伏流水、二次水の使用なし
換 水 率	0.7回/時間
曝 気	ブローアによるエアレーション
水 温	16.7~20.5℃
餌料の種類	配合餌料
給 餌 方 法*	自動給餌器
給 餌 回 数*	3回/日

* 29日目までは手撒きによる給餌
(給餌回数2回/日)

ワクチンの効果判定

試験開始後30、59および90日目に、実験感染によりワクチンの有効性を判定した。

感染実験には、*Vibrio anguillarum* PT - 84060 株 (血清型 A 型) を用いた。この菌株を魚体通過させ、得られた新鮮分離菌を BBL 製 TSA 培地を用いて、25℃ で 24 時間培養後、 $10^9 \sim 10^{10}$ cfu/ml の濃厚菌

液を調製した。これを、1%NaCl 水溶液で 10 倍段階希釈し、2 段階の攻撃用菌液を調製した。各感染実験における菌濃度を表 3 に示した。

各区の供試魚 20 尾を、菌液 2 リットルに 5 分間浸漬して攻撃し、その後 14 日間観察し、斃死原因および尾数を調べた。なお、ワクチンの有効率は次式により求めた。

$$\text{有効率 (\%)} = (1 - \text{ワクチン処理区の斃死率} / \text{対照区の斃死率}) \times 100$$

表 3 感染実験における調製菌液濃度

日数	調製原液 (cfu/ml)	攻撃菌液 (cfu/ml)	
		高濃度	低濃度
30	1.3×10^{10}	1.3×10^5	1.3×10^4
59	1.0×10^{10}	1.0×10^5	1.0×10^4
90	1.6×10^9	1.6×10^4	1.6×10^3

結 果

ワクチン処理

各区ともワクチン処理による斃死はみられなかった。

飼育結果

飼育期間を、試験開始後 0 から 30 日目、30 から 59 日目および 59 から 90 日目に 3 分し、各期間の飼育結果を表 4 に示した。

飼育期間中のピブリオ病による斃死はみられなかった。その他の原因による斃死も、標準法区以外で各 1 尾とほとんどみられなかった。また、日間成長率は、試験開始後 0 から 30 日目では 4.3 から 4.9%、30 から 59 日目では 1.3 から 1.7%、そして 59 から 60 日目では 0.8 から 1.1%と各区の間に大きな差はみられなかった。その他の項目についても、試験区間で大差はなかった。

表 4 - 1 飼育結果 (試験開始後 0 から 30 日まで)

項目	区 分	試 験 区			標準法区	対 照 区
		1	2	3		
開始時	総重量 (kg)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
	尾数	199	200	200	200	200
	平均体重 (g)	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
終了時	総重量 (kg)	0.69	0.70	0.78	0.78	0.81
	尾数	199	200	200	200	199
	平均体重 (g)	3.5	3.5	3.9	3.9	4.1
斃死尾数 (総数)		0	0	0	1	
ピブリオ病による斃死尾数					0	
斃死魚総重量 (g)					1.0	
不明尾数		0	0	0	0	
生存残率 (%)		100.0	100.0	100.0	100.0	99.5
給餌量 (kg)		0.52	0.53	0.52	0.52	0.53
増重量 (kg)		0.49	0.50	0.58	0.58	0.62
餌料効率 (%)		95	96	113	112	117
日間給餌率 (%)		3.9	3.9	3.5	3.5	3.5
日間成長率 (%)		4.3	4.3	4.7	4.7	4.9
増重倍率		3.5	3.5	4.0	4.0	4.1

表 4 - 2 飼育結果（試験開始後 30 から 59 日まで）

項目	区分	試験区			標準法区	対照区
		1	2	3		
開始時	総重量 (kg)	0.48	0.49	0.55	0.55	0.57
	尾数	139	140	140	140	139
	平均体重 (g)	3.47	3.51	3.91	3.91	4.09
終了時	総重量 (kg)	1.33	1.20	1.28	1.32	1.21
	尾数	139	140	139	140	139
	平均体重 (g)	9.6	8.6	9.2	9.4	8.7
	斃死尾数 (総数)	0	0	1	0	0
	ビブリオ病による斃死尾数			0		
	斃死魚総重量 (g)			3.2		
	不明尾数	0	0	0	0	0
	生残率 (%)	100.0	100.0	99.3	100.0	100.0
	給餌量 (kg)	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96
	増重量 (kg)	0.85	0.71	0.74	0.77	0.65
	餌料効率 (%)	88	74	77	80	67
	日間給餌率 (%)	1.8	1.9	1.8	1.8	1.8
	日間成長率 (%)	1.7	1.5	1.5	1.5	1.3
	増重倍率	2.8	2.4	2.3	2.4	2.1

表 4 - 3 飼育結果（試験開始後 59 から 90 日まで）

項目	区分	試験区			標準法区	対照区
		1	2	3		
開始時	総重量 (kg)	0.76	0.69	0.73	0.75	0.69
	尾数	79	80	79	80	79
	平均体重 (g)	9.57	8.58	9.24	9.41	8.74
終了時	総重量 (kg)	1.58	1.63	1.67	1.67	1.78
	尾数	78	79	79	80	79
	平均体重 (g)	20.3	20.6	21.2	20.8	22.5
	斃死尾数 (総数)	1	1	0	0	0
	ビブリオ病による斃死尾数	0	0			
	斃死魚総重量 (g)	14.5	5.4			
	不明尾数	0	0	0	0	0
	生残率 (%)	98.7	98.8	100.0	100.0	100.0
	給餌量 (kg)	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31
	増重量 (kg)	0.84	0.95	0.94	0.91	1.09
	餌料効率 (%)	64	72	72	70	83
	日間給餌率 (%)	1.2	1.3	1.2	1.2	1.2
	日間成長率 (%)	0.8	1.0	0.9	0.9	1.1
	増重倍率	2.1	2.4	2.3	2.2	2.6

ワクチンの有効性

各感染実験の結果を、表 5 および図 1 に示した。すべての感染実験において、対照区の斃死率は、攻撃菌濃度が高い方では 100%であった。一方、攻撃菌濃度が低い方では、それらは 80%以上 100%未満の範囲にあり、適度な強さの攻撃ができたものとみなした。したがって、以下のワクチン有効率の比較においては、低い菌濃度の攻撃結果を採用した。

ワクチンの有効率は、試験開始後 30 日目では試験区 1 の 81.3%以外はすべて 100%であった（表 5 - 1）。59 日目には、有効率 100%を示したのは試験区 2 のみで、試験区 1 および 3 は 80%代、標準法区は最も低い 73.7%の有効率であった（表 5 - 2）。試験開始後 90 日目には、ワクチン有効率はさらに低下し試験区 2 の 50%から試験区 2 および標準法区の 72.2%の間にとどまった（表 5 - 3）。

このようにワクチン有効率は日数の経過にしたがい低下傾向を示した。また、各感染実験において、

有効率の格差が若干みられたが、有効率の最大値および最小値を示した区は、各感染実験でまちまちであった。

表 5 - 1 感染実験結果 (試験開始後 30 日目)

攻撃菌数 (cfu/ml)	試験区 区分	供試 尾数	経過日数														ビブリオ病 による 斃死尾数	ビブリオ病 による 斃死率(%)	有効率** (%)
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
1.3×10^4	試験区 1	20	*				1	1	1								3	15.0	81.3
	試験区 2	20															0	0.0	100.0
	試験区 3	20															0	0.0	100.0
	標準法区	20															0	0.0	100.0
	対照区	20			3	1	2			3	4	1	2				16	80.0	
1.3×10^5	試験区 1	20			2	1											3	15.0	85.0
	試験区 2	20			2	1	1										4	20.0	80.0
	試験区 3	20			3	5											8	40.0	60.0
	標準法区	20			2	1	1										4	20.0	80.0
	対照区	20			18	2											20	100.0	

実験時の水温 17.8~18.3℃

表 5 - 2 感染実験結果 (試験開始後 59 日目)

攻撃菌数 (cfu/ml)	試験区 区分	供試 尾数	経過日数														ビブリオ病 による 斃死尾数	ビブリオ病 による 斃死率(%)	有効率** (%)
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
1.0×10^4	試験区 1	20	*	1	1												2	10.0	89.5
	試験区 2	20															0	0.0	100.0
	試験区 3	20			1		1										3	15.0	84.2
	標準法区	20			2	1	1	1									5	25.0	73.7
	対照区	20			6	6	2	2	1	2							19	95.0	
1.0×10^5	試験区 1	20		1	2	2											5	25.0	75.0
	試験区 2	20			5	2				1							8	40.0	60.0
	試験区 3	20			2	2	1										5	25.0	75.0
	標準法区	20			1	2	2	1									6	30.0	70.0
	対照区	20			1	1	7	2									20	100.0	

実験時の水温 19.1~19.9℃

表 5 - 3 感染実験結果 (試験開始後 90 日目)

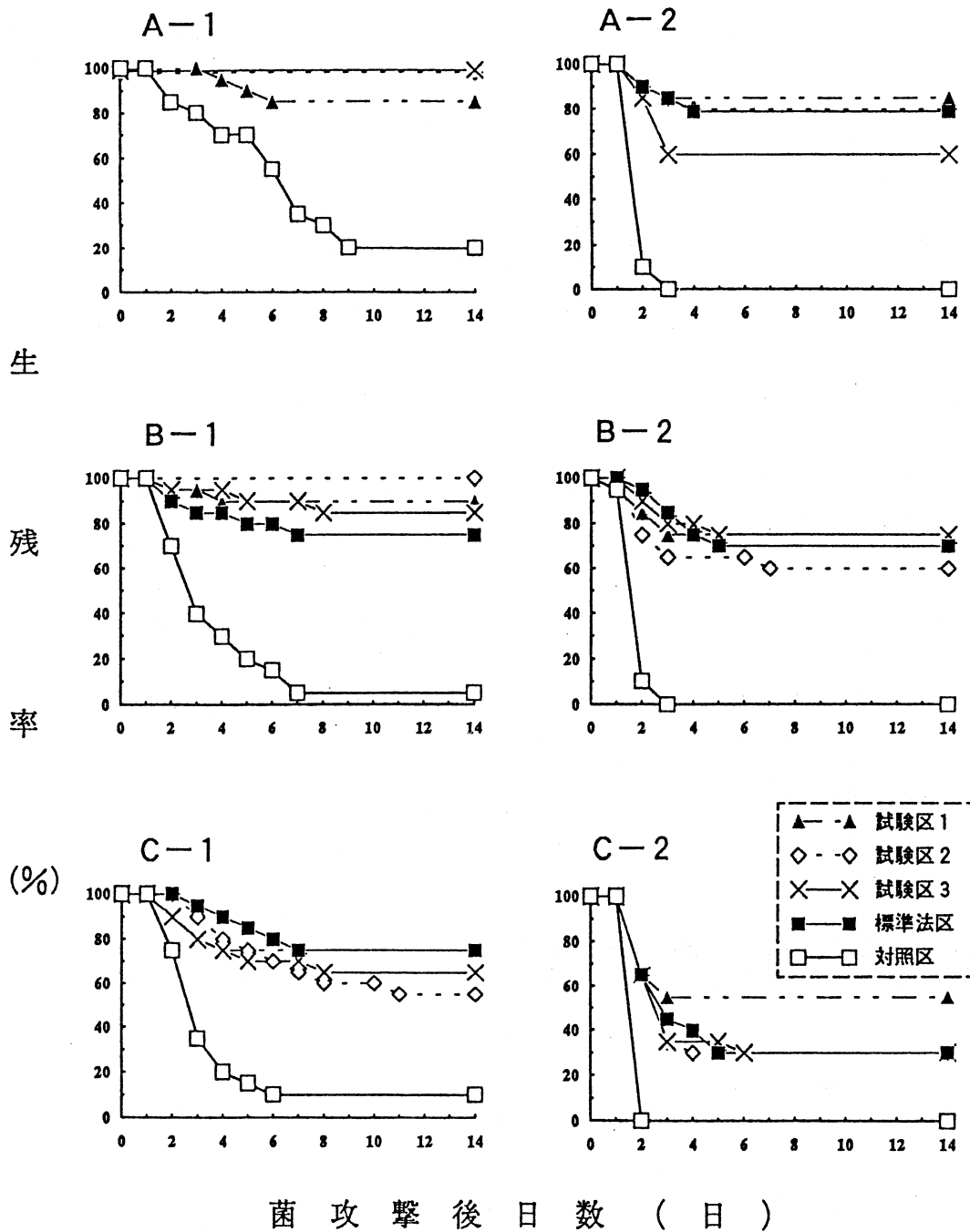
攻撃菌数 (cfu/ml)	試験区 区分	供試 尾数	経過日数														ビブリオ病 による 斃死尾数	ビブリオ病 による 斃死率(%)	有効率** (%)
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
1.6×10^3	試験区 1	20	*	2	2	1											5	25.0	72.2
	試験区 2	20			2	2	1	1	1	1		1					9	45.0	50.0
	試験区 3	20			2	2	1	1			1						7	35.0	61.1
	標準法区	20			1	1	1	1	1								5	25.0	72.2
	対照区	20			5	8	3	1	1								18	90.0	
1.6×10^4	試験区 1	20			7	2											9	45.0	55.0
	試験区 2	20			7	6	1										14	70.0	30.0
	試験区 3	20			7	6			1								14	70.0	30.0
	標準法区	20			7	4	1	2									14	70.0	30.0
	対照区	20			20												20	100.0	

実験時の水温 20.9~21.2℃

* 各日のビブリオ病による斃死尾数

** 有効率(%) = (1 - A/B) × 100

A: ワクチン処理区の斃死率, B: 対照区の斃死率



A-1: 試験開始後30日目, 菌濃度 1.3×10^4 cfu/ml ; A-2: 試験開始後30日目, 菌濃度 1.3×10^5 cfu/ml
 B-1: 試験開始後59日目, 菌濃度 1.0×10^4 cfu/ml ; B-2: 試験開始後59日目, 菌濃度 1.0×10^5 cfu/ml
 C-1: 試験開始後90日目, 菌濃度 1.6×10^3 cfu/ml ; C-2: 試験開始後90日目, 菌濃度 1.6×10^4 cfu/ml

図1 感染実験における各区の生残率

考 察

今回の試験では,すべての区で,ワクチン処理時および3カ月にわたる飼育期間中にほとんど斃死はみられず,また,アユの成長率にも差はみられなかった。したがって,平均体重約1gのアユに対するワクチン処理の安全性は,標準法および低濃度・長時間法(50から200倍希釈・10分浸漬)ともに問題

はないと考えられる。

アユワクチンの有効性は、アユ・ピブリオ病研究部会の判定基準では有効率 60%以上を有効としている。この基準にしたがうと、低濃度・長時間法でワクチンの効果が2カ月以上持続した例としては、山本ら²⁾(500倍希釈・30および60分浸漬)、沢田ら³⁾(同250倍・30分)、および、田中⁵⁾(同500倍・30および120分)の報告などがある。しかし、500倍希釈・30あるいは60分浸漬で、2カ月後にワクチンの効果がほとんどみられなかった例もある^{1,3,4,6)}。また、1,000倍以上希釈した場合にも有効性は明確にはみられなかった^{6,7)}。したがって、ワクチン液を500倍以上に希釈するとその効果の持続性や再現性に若干の問題があるものと推察される。

一方、今回行った50倍から200倍の間の希釈倍率でのワクチン有効率は、全体としては日数が経過するにつれ次第に低下する傾向がみられたものの、各区間の明確な差異や一貫した傾向はみられなかった。また、2カ月後まではすべての試験区でワクチンは有効であった。以上の結果より、低濃度・長時間法でワクチン処理を行う場合、10分浸漬で希釈倍率が200倍以下であれば、処理後2カ月間は標準法と変わらない同等の効果が得られるものと考えられる。

しかしながら、100倍希釈・30分浸漬の処理で、2カ月後の有効率が60%をわずかに下回った例もあり³⁾、今後、養殖場での野外試験を含め追試を行ってゆき、今回行った低濃度・長時間法の有効性を確認する必要がある。

文 献

- 1) 植木範行：アユピブリオ病ワクチンの効果 - ，浸漬による免疫方法の改良，岡山水試報；1，105～107（1986）。
- 2) 山本章造・石田公行・直原治子：実用的使用法によるアユ・ピブリオ病ワクチンの効果，同上，2，107～110（1987）。
- 3) 沢田健蔵・松岡正義・斎浦耕二・染野修一：低濃度・長時間法によるアユ・ピブリオ病ワクチンの有効性試験，昭和61年度徳島水試事報，128～131（1988）。
- 4) 沢田健蔵・松岡正義：低濃度・長時間法による小型アユ（3g以下）に対するピブリオ病ワクチンの効果判定連絡試験，昭和63年度徳島水試事報，143～145（1989）。
- 5) 田中眞：アユ・ピブリオ病に対する低濃度・長時間法による浸漬ワクチンの実用化，静岡水試研報，23，49～57（1988）。
- 6) 田中眞・岩村宙史：アユピブリオ病ワクチンに関する研究，平成元年度静岡水試事報，265～267（1991）。
- 7) 堀江康浩・辻村明夫・中西一：アユのピブリオ病に対するワクチンの予防効果，平成元年度和歌山県内水面漁業センター事報，37～39（1991）。