

アユビブリオ病ワクチン低濃度・長時間法処理

の野外応用試験

池脇 義弘・沢田 健蔵

アユ・ビブリオ病の防疫対策としては、ホルマリン死菌ワクチンによる予防免疫が極めて有効である。現在、アユ・ビブリオ病不活性化ワクチンが市販されているが、現行の処理法（ワクチン原液を 10 倍に希釈・2 分間浸漬）は煩雑な作業となる。ビブリオ病ワクチンを現場でより使いやすくするためには、ワクチン処理をより低濃度でより長時間行なえること、および、体重 3g 以下の小型アユ種苗で使用できることが必要である。

低濃度・長時間法のワクチン効果は、主に室内実験により様々な希釈倍率及び浸漬時間で検討されてきた¹⁻⁸⁾。これらの研究結果から、ワクチン原液を 100 倍に希釈し 10 分間浸漬することにより、体重 1g 前後の小型種苗に対し標準法と同等の予防免疫効果が得られることが予想された。そこで今回、養殖場における野外試験で、100 倍希釈・10 分浸漬によるワクチンの有効性を検討した。

なお、本研究は、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

1 野外飼育

養殖場において、ワクチン処理した魚を収容した“免疫区”と、ワクチン無処理魚を収容した“対照区”を設け、約 2 ヶ月間ビブリオ病の発生状況を比較した。両区の種苗の由来および飼育条件は可能な限り同条件とした（後述）。

試験は、徳島県阿南市内のアユ養殖場 2 ヶ所（業者 M および業者 H）で実施した。以下では、業者 M での試験を“試験 1”、業者 H での試験を“試験 2”と記す。供試魚は琵琶湖産種苗を用い、その平均体重は試験 1 および 2 でそれぞれ 1.22 および 0.62g であった（表 1）。ワクチン処理は、種苗を飼育池に移す直前に、活魚輸送車の水槽の水位を下げ、その中にワクチン原液を注ぎ込むことにより行なった。ワクチンの希釈倍率は 100 倍、浸漬時間は 10 分とした（表 2）。ワクチン処理した種苗はワクチン液ごと飼育池に流し込んだ。試験 1 ではワクチン処理は輸送してきた種苗の半数に行ない、残りを対照区として別の池に収容した。試験 2 の対照区は前日に輸送した。

野外飼育時の飼育条件は、表 3 に示した。

表1 供試種苗

	試験1	試験2
種苗の産地	琵琶湖	琵琶湖
病歴	なし	なし
投薬歴	なし	なし
平均体重(g)	1.22	0.62

表2 ワクチン処理条件

	試験1	試験2
総魚体重(kg)	100	145
使用ワクチン	アユピブリオ病不活化ワクチン“日生研”(Lot.No.2)	ピシバック VAアユチン(Lot.No.2)
使用ワクチン原液量(ℓ)	10	10
調製ワクチン液量(ℓ)	1,000	1,000
ワクチン希釈倍率	100	100
浸漬時間(分)	10	10
処理魚密度(%)	10.0	14.5
水温(℃)	14.8	15.7
通気方法	酸素ポンベ	酸素ポンベ

表3 野外飼育の条件等

	試験1	試験2
総魚体重(kg)	100	145
使用ワクチン	アユピブリオ病不活化ワクチン“日生研”(Lot.No.2)	ピシバック VAアユチン(Lot.No.2)
使用ワクチン原液量(ℓ)	10	10
調製ワクチン液量(ℓ)	1,000	1,000
ワクチン希釈倍率	100	100
浸漬時間(分)	10	10
処理魚密度(%)	10.0	14.5
水温(℃)	14.8	15.7
通気方法	酸素ポンベ	酸素ポンベ

2 効果判定

野外飼育終了後、供試魚の一部を試験場に輸送し、人為的にピブリオ病に感染させて、両区のへい死尾数を比較することによりワクチンの効果を判定した。

感染実験に使用した菌株は、*Vibrio anguillarum* PT84060 株(血清型 A 型)で、この菌株を 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 水溶液で希釈し、3 段階の攻撃用菌液各 2ℓ を調整した。この菌液に、各区の供試魚約 25 尾を 5 分間浸漬した後容積 200ℓ の水槽に収容し、14 日間観察し斃死原因及び尾数を調べた。なお、ワクチンの有効率は次式により求めた。

$$\text{有効率 (\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

A : 免疫区のへい死率

B : 対照区のへい死率

結 果

1 ワクチン処理の安全性

各区ともワクチン処理に起因すると思われるへい死はみられなかった。

2 飼育結果

各試験の飼育結果を表 4 に、試験 1 および 2 の野外飼育期間中のへい死状況をそれぞれ図 1 および図 2 に示した。

両試験ともに飼育期間中のピブリオ病によるへい死はみられなかった。試験 1 において免疫区と対照区のへい死状況は極めて類似しており、試験 2 においても、試験開始後 5 日前後と 30 日前後に対照区のへい死尾数が多かった以外は同様であった。各区の日間成長率も、4.64 ~ 4.85% の範囲にあり大差はなかった。

表4 野外飼育成績

項 目	試 験 1		試 験 2	
	免疫区	対照区	免疫区	対照区
開始時総重量(kg)	100	100	145	130
〃 尾数	82,000	82,000	235,000	211,000
〃 平均体重(g)	1.22	1.22	0.62	0.62
終了時総重量(kg)	1,600	1,600	3,000	2,300
〃 尾数	78,000	79,000	222,000	182,000
〃 平均体重(g)	20.3	20.6	13.4	12.8
へい死尾数	3,987	2,792	13,000	29,000
へい死原因				
ピブリオ病(%)	0	0	0	0
その他(%)	100	100	100	100
不明尾数				
生残数(%)	95.1	96.3	94.5	86.3
給餌量(kg)	1,204	1,292	1,676	1,779
内 訳				
配合飼料(kg)	1,204	1,292	1,676	1,779
その他(kg)	0	0	0	0
増重量(kg)	1,500	1,500	2,900	2,200
餌私効率(%)	125	116	170	120
日間給餌率(%)	2.28	2.45	1.64	2.25
日間成長率(%)	4.64	4.67	4.85	4.77
増重倍率	16.6	17.0	21.7	20.7

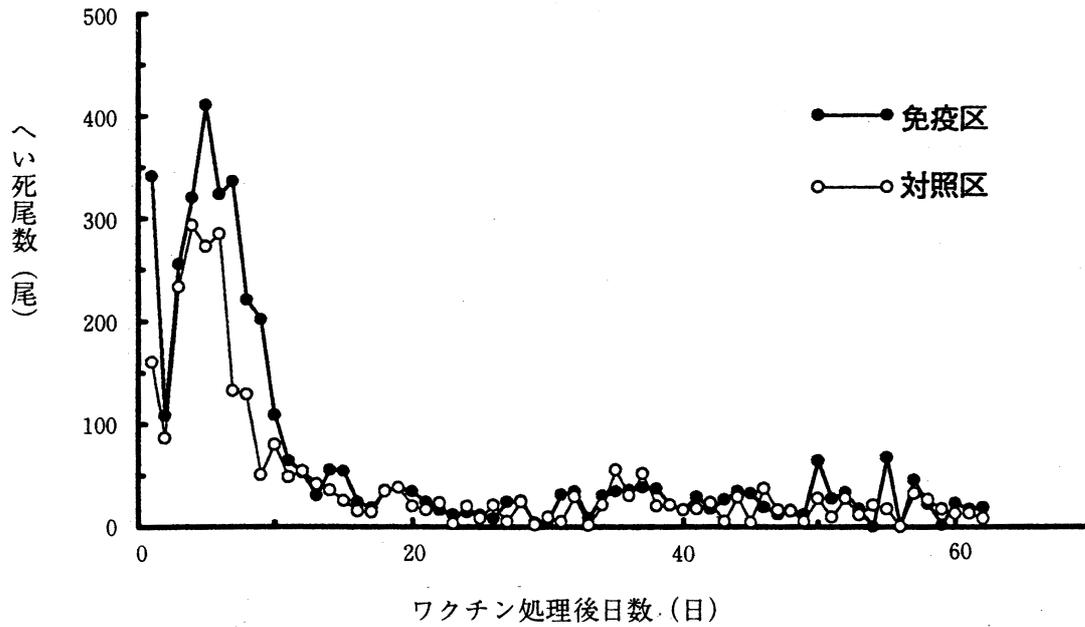


図1 飼育期間中のへい死尾数 (試験1)

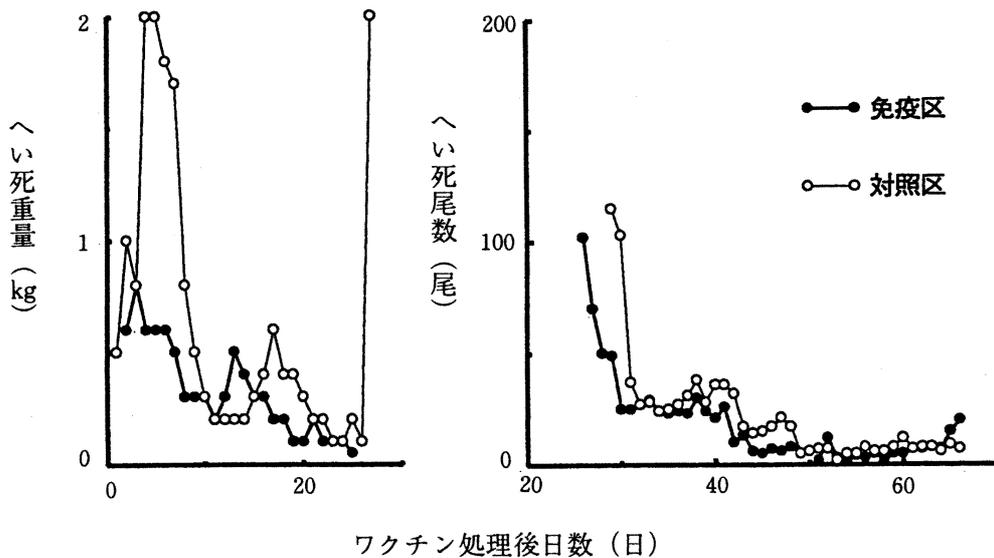


図2 飼育期間中のへい死尾数および重量 (試験2)

3 ワクチンの有効性

試験1の感染実験はワクチン処理後75日目に、攻撃菌濃度 $7.0 \times 10^2 \cdot 10^3 \cdot 10^4$ の3段階で行なった。供試魚の平均体重は、免疫区 25.4g, 対照区 26.7g で、攻撃時の水温は 17.7 であった。また、試験2の感染実験はワクチン処理後68日目に、攻撃菌濃度 $2.4 \times 10^3 \cdot 10^4 \cdot 10^5$ の3段階で行なった。供試魚の平均体重は、免疫区 13.4g, 対照区 12.8g で、攻撃時の水温は 18.7 であった。

各感染実験の結果を、表5および図3に示した。へい死原因はすべてピブリオ病によるものであった。

いずれの菌攻撃条件においても、免疫区のへい死率が対照区のそれを上回ることにはなかった。各試験のワクチン有効率の最大値は、試験1で81.8%（攻撃菌濃度 7.0×10^4 ），試験2で50%（同 2.4×10^4 ）であった。

表5 感染実験結果：へい死魚は全てピブリオ病によるもの

(A) 試験1（免疫後75日）

攻撃菌数 (CFU/ml)	試験 区分	供試 尾数	経過日数														へい死 尾数	へい死 率(%)	有効 率(%)
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
7.0×10^2	免疫区	25	*														0	0.0	
	対照区	25															0	0.0	
7.0×10^3	免疫区	25			2												2	8.0	77.8
	対照区	25			2		2			1	1	2	1				9	36.0	
7.0×10^4	免疫区	25			1	2	1										4	16.0	81.8
	対照区	25		1	6	11	2	2									22	88.0	

水温17.7~18.9℃

(A) 試験2（免疫後68日）

攻撃菌数 (CFU/ml)	試験 区分	供試 尾数	経過日数														へい死 尾数	へい死 率(%)	有効 率(%)	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13				14
2.4×10^3	免疫区	25	*			2	1	2	6	2	1							14	56.0	41.7
	対照区	25				2	1	7	10	2	1	1						24	96.0	
2.4×10^4	免疫区	25			2	3		3	1	1		1						11	44.0	50.0
	対照区	25			2	6	7	3	3	1								22	88.0	
2.4×10^5	免疫区	25			14	5					1						20	80.0	20.0	
	対照区	26			22	3	1										26	100.0		

水温18.7~19.4℃

*各日のピブリオ病によるへい死尾数
有効率(%)=(1-A/B)X100
A:免疫区のピブリオ病によるへい死率
B:対照区のピブリオ病によるへい死率

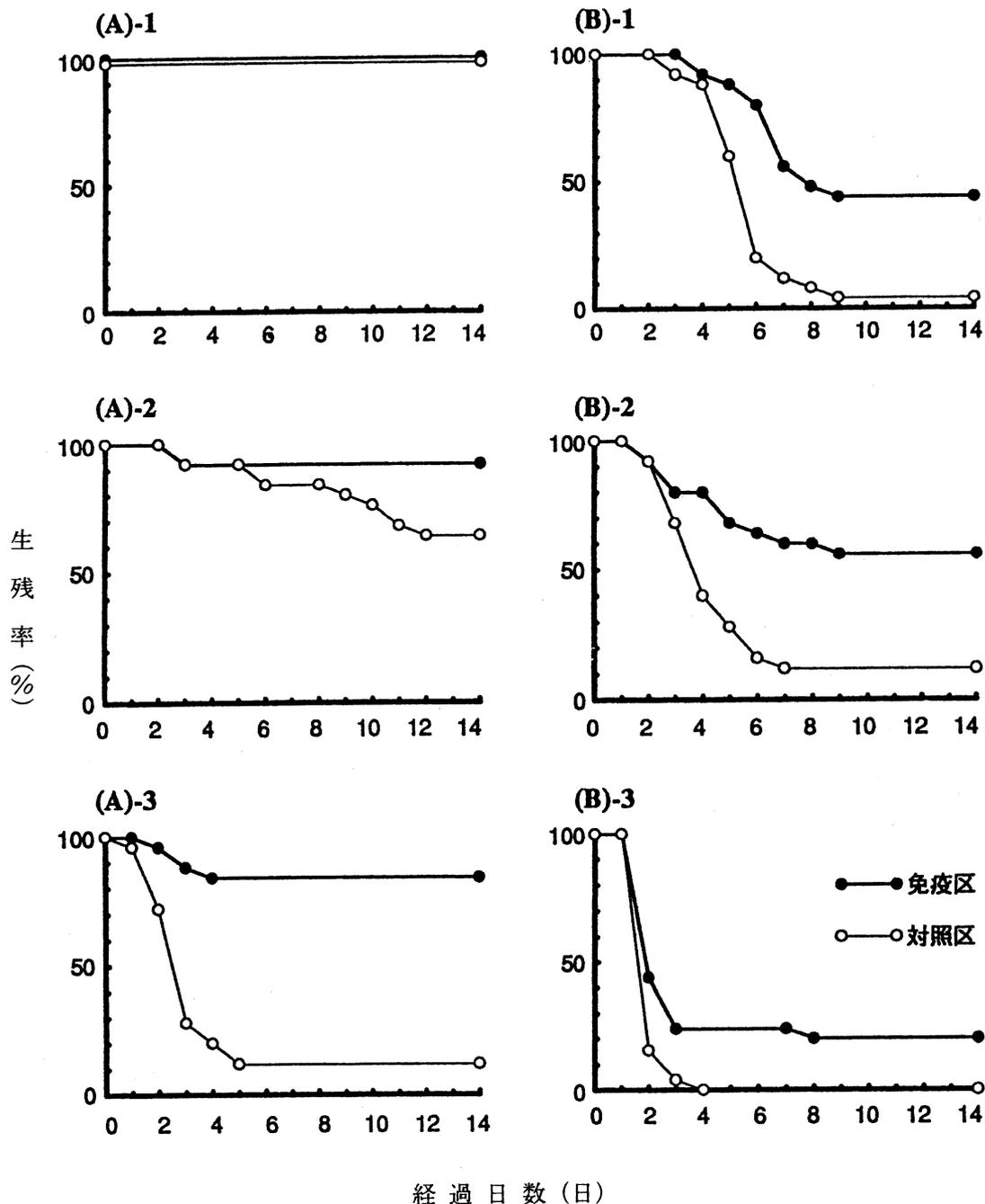


図3 感染実験における生存率の変化

(A)-1; 試験1, 攻撃菌濃度 7.0×10^2 (CFU/ml); (B)-1; 試験2, 攻撃菌濃度 2.4×10^3 (CFU/ml)
 (A)-2; 試験1, 攻撃菌濃度 7.0×10^3 (CFU/ml); (B)-2; 試験2, 攻撃菌濃度 2.4×10^4 (CFU/ml)
 (A)-3; 試験1, 攻撃菌濃度 7.0×10^4 (CFU/ml); (B)-3; 試験2, 攻撃菌濃度 2.4×10^6 (CFU/ml)

考 察

今回の試験において、ワクチン処理が原因と思われるへい死は見られず、免疫区の成長や生存率も対照区と差が見られなかった。したがって、体重 1g 前後の小型アユ種苗に対する、100 倍希釈・10 分浸漬の低濃度・長時間法によるワクチン処理の安全性には問題がないと判断された。

感染実験において、適度な強さの菌攻撃ができたとみなされる対照区のへい死率が 70%以上 100%未満の範囲にあったのは、試験 1 の 7.0×10^4 、および試験 2 の $2.4 \times 10^3 \cdot 10^4$ の攻撃条件であった。以下では、これらの攻撃条件による結果からワクチンの有効性を考察した。これらの条件下での有効率は、試験 1 で 81.8%、試験 2 で 41.7 および 50.0%と、試験 2 のほうが低かった。この原因については、現在のところ特定できないが、試験 2 は試験 1 と比較してワクチン処理時および野外飼育時の魚の収容密度が高く、これが供試魚の免疫付与に悪影響を及ぼした可能性が考えられ、今後の課題として残されている。

ワクチンが適合とみなされる基準は、アユピブリオ病研究部会では、有効率 60%以上としている。また、動物用生物学的製剤協会（以下、動生協）では、免疫群の生残率が対照群よりも 40%以上上回ることをとしている。これら判定基準から、試験 1（有効率 81.8%、生残率の差 72.0%）では、ワクチンの効果は有効であったと考えられる。一方、試験 2 での有効率は、最高でも 50%とピブリオ病研究部会の判定基準以下であったが、 2.4×10^4 の攻撃条件では免疫区が生残率は対照区と比較して 44%上回っており、動生協の基準ではワクチンは適合とみなされた。したがって、平成 2 年度に室内実験で認められた 100 倍・10 分の低濃度・長時間法のワクチン処理の適合性⁸⁾が、今回の試験により野外でも確認されたものと考えられる。

参考文献

- 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のピブリオ病ワクチンの効果，岡山水試報，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：アユの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）。
- 8) 池脇義弘・沢田健蔵：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，平成 2 年度徳島水試事報，277～282（1992）。