

### 3) 冷水病感染耐過アユが認識し、注射ワクチン接種アユは認識しない 冷水病菌体由来粗精製抗原のワクチンとしての有効性

金辻宏明

【目的】 筆者は前報で*Flavobacterium psychrophilum* を原因菌とする冷水病の水平感染攻撃で生残したアユと本病のホルマリン不活化死菌(FKC)注射ワクチン接種アユの認識する抗原が異なることを報告した。本報では水平感染耐過アユだけが認識する抗原のワクチン効果について検討した。

【方法】 供試魚には11月に琵琶湖で採捕され、冷水病経験のない平均体重10.2gの湖産アユを用いた。供試菌には*F. psychrophilum* SG990302株を用いた。培養は供試菌を50mLのMCY液体培地に接種して15°Cで24時間振盪(100rpm)して行った。培養後これまでの報告<sup>※1)</sup>と同様にしてFKCとした。生菌抽出画分は、10Lの培養液から遠心分離で得た生菌を用いて60°Cで溶出する成分<sup>※2)</sup>とした。生菌抽出画分はSephacryl S-200 [Pharmacia] カラム(1.77cm<sup>2</sup>×100cm : Bio-Rad)で分画し、フラクションNo.40の画分<sup>※3)</sup>を冷水病感染耐過アユが認識し、注射ワクチン接種アユが認識しない冷水病菌体の粗分画画分(分画ワクチン原液)とした。つぎにこの画分のワクチン効果について調べた。注射接種用ワクチンには分画ワクチン、生菌抽出画分および従来FKCを用い、浸漬接種用ワクチンには生菌抽出画分および従来FKCを用いた。注射接種ワクチンは分画ワクチン原液、生菌抽出画分原液または不活化前菌濃度が3.33×10<sup>8</sup>CFU/mLのFKC液と植物性オイルアジュバントMontanide ISA763A [Seppic] を3 : 7になるように混合して乳濁化させ、各区100尾を用い供試魚の腹腔内に1個体あたり50 μL(それぞれ2×10<sup>7</sup>CFU相当抽出物/fish、5×10<sup>8</sup>CFU相当抽出物/Fishおよび5×10<sup>7</sup>CFU/fish)を接種した。浸漬接種ワクチンは生菌抽出画分は10<sup>8</sup>CFU由来抽出物/mLになるように10Lの地下水で希釈し、従来浸漬ワクチンは1×10<sup>8</sup>CFU/mLになるよう10Lの地下水で希釈し、それぞれ供試魚100尾を10分間浸漬して接種した。免疫期間中は供試魚を0.5 t 水槽に収容して地下水を通水し、市販飼料(魚体重の2%)を与えて飼育した。攻撃はワクチン接種3および6週間後に冷水病を発生させた飼育水<sup>※4)</sup>の導入<sup>※5)</sup>で行った。ワクチンの有効率は次の式により算出して評価した。

有効率(%) = {1 - (試験区死亡率 / 対照区死亡率)} × 100

【結果】 免疫3および6週間後の攻撃試験結果をそれぞれ図1および2に、有効率を表1に示した。累積生残率は3週間後では従来注射ワクチンで最も高く、次いで分画ワクチンが高かった。この2つのワクチンの有効率はそれぞれ33.9および14.3%で、分画ワクチンの効果は低かった。6週間後では生菌抽出画分(注射)、分画ワクチン(注射)の順で効果が認められ、有効率はそれぞれ30.0および19.0%であった。また浸漬投与では分画ワクチンを含む生菌抽出画分を使用しても効果は低かった。以上の結果から、分画ワクチンおよびそれを含む生菌抽出画分に効果はあるが従来FKC注射ワクチンの効果より低いと判断された。

- 
- ※ 1) 金辻宏明：冷水病菌体を用いた免疫原性強化ワクチン作製方法の検討，平成 14 年度滋賀水試事報，186-187(2003)。
  - ※ 2) 金辻宏明：冷水病原菌に対する水平感染耐過アユおよび注射ワクチン接種アユ血中特異抗体の特異性，平成 15 年度滋賀水試事報，in press，(2004)。
  - ※ 3) 金辻宏明：冷水病感染耐過アユが認識し、注射ワクチン接種アユの認識しない冷水病菌体抗原の存在，平成 15 年度滋賀水試事報，in press，(2004)。
  - ※ 4) 金辻宏明：冷水病発生水槽水中の冷水病菌菌数測定方法の確立，平成 14 年度滋賀水試事報，178-179，(2003)。
  - ※ 5) 金辻宏明：ハプテン化および免疫原性強化した冷水病菌体ワクチンの有効性，平成 14 年度滋賀水試事報，188-189(2003)。

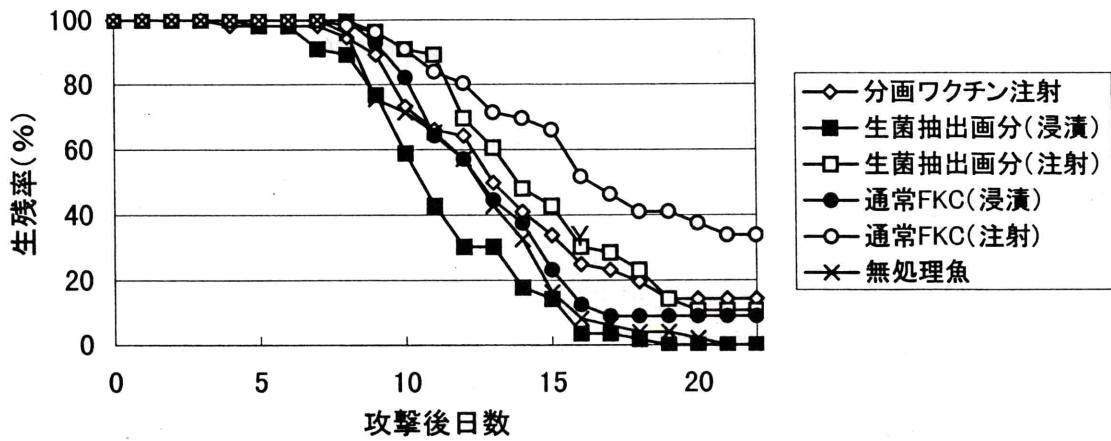


図1. 水平感染耐過アユが認識する冷水病菌体抗原を接種して3週間後のアユの水平感染攻撃試験における生残率の推移.

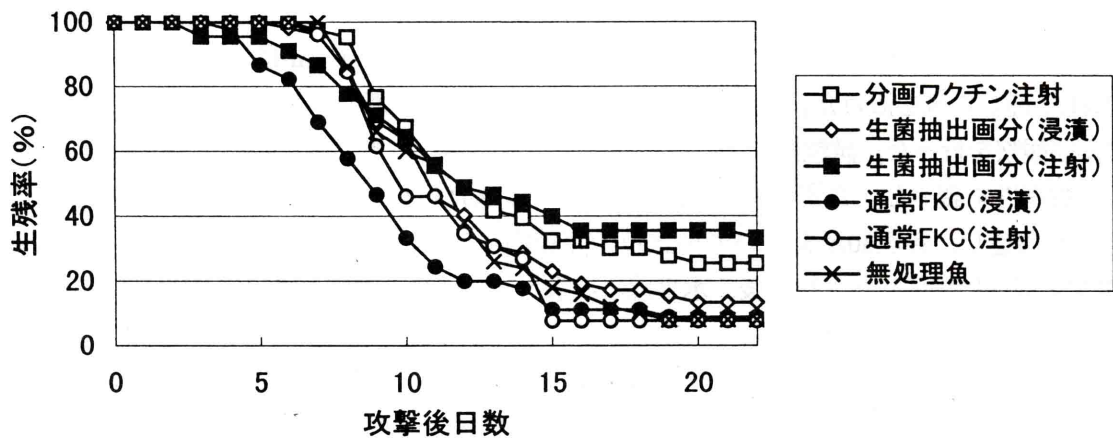


図2. 水平感染耐過アユが認識する冷水病菌体抗原を接種して6週間後のアユの水平感染攻撃試験における生残率の推移.

表1. 冷水病生菌抽出画分を接種したアユの攻撃試験結果とワクチン効果

ワクチン名	接種3週間後に攻撃			接種6週間後に攻撃		
	生残率 (%)	有効率 (RPS)	有意差	生残率 (%)	有効率 (RPS)	有意差
分画ワクチン(注射)	14.3	14.3	<0.02	25.6	19.0	<0.02
生菌抽出画分(浸漬)	0.0	0		13.5	5.9	
生菌抽出画分(注射)	10.7	10.7	<0.05	33.6	30.0	<0.001
FKC(浸漬)	8.9	8.9		8.9	1.0	
従来FKC(注射)	33.9	33.9	<0.005	※	※	
無処理魚	0.0	—		8.0	—	—

※スレ症発生で供試魚数が少なくなったため、攻撃試験は未実施