

15) 冷水病ワクチン作製時の残存ホルマリンがワクチンの有効性におよぼす影響

金辻宏明

【目的】 一般的に魚類用ワクチンは原因菌またはウイルスをホルマリンで不活化(FKC)して作製され、アユではビブリオでFKCワクチンが販売されている。現在、アユ冷水病についてもFKCでワクチン開発研究が進められているが、このFKC液中の残存ホルマリン濃度を調べると高濃度であることが明らかとなり、本報では残存濃度測定とワクチン効果に影響があるかどうかを検討した。

【方法】 供試菌には1999年3月2日に冷水病で死亡したアユの腎臓から分離した*Flavobacterium psychrophilum* SG990302株および1995年に冷水病で死亡したアユの腎臓から分離された*F. psychrophilum* CS-1株を用いた。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7.5gの湖産アユを用いた。冷水病ワクチンとマスビブリオ病ワクチン〔ピシバツレブヲ、共立製薬〕中に残存するホルマリン量は図1に示す半定量的なニュートラックスアルデヒド・テスト・キット〔サクラファインテックジャパン〕を用い、高濃度の場合は蒸留水で希釈して測定した。供試菌株の種培養および本培養

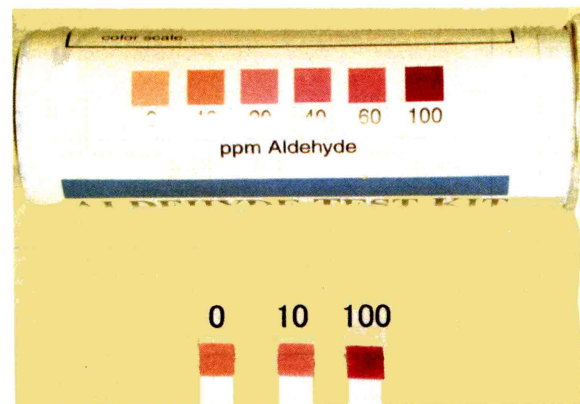


図1. 本研究で用いたアルデヒド検出キット。
写真下部は実際にホルマリン液に浸漬して検出。

はこれまでと同様^{※1)}にして終容積10Lで行った。本培養後、10,800×gで30分冷却遠心して集菌し、菌体ペレットを1Lの10mMリン酸緩衝食塩水(PBS)に再浮遊させ、0.3%量のホルマリン原液または終濃度が0.3%になるようにグルタルアルデヒド(G液)〔和光純薬、電子顕微鏡用〕を加えて不活化した。不活化後、FKC液およびG液で不活化した菌液(GKC)はそのまま使用まで4℃で保存し、除去区は10,800×gで30分冷却遠心してペレットをPBSに浮遊させて調製した。ワクチンの接種および攻撃はこれまでと同様の濃度、量と時間で浸漬および注射法で接種、飼育し、攻撃した^{※1)}。

【結果】 ワクチン液中の残存ホルマリン濃度の測定結果を表1に示した。すなわち従来ビブリオワクチンに残留ホルマリンは極めて少ないが、冷水病浸漬・注射ワクチンには比較的高濃度に残留していた。つぎに、ホルマリンおよびG液の残存とワクチンの有効性に及ぼす影響について調べた結果を注射ワクチンおよび浸漬ワクチンでそれぞれ図2および3に示した。まず、G液を含む場合、その急性毒性によって供試アユが死亡(ほとんど全滅)したため実験区から除外した。このことからホルマリンの残存の有無で調べたところ、注射ワクチンでは特にホルマリンの存在で効果に変化はなく、抗原性の点から有効性が期待できるGKC^{※2)}でも同様に浸漬ワクチンでも変化は無く、効果は低かった。このことから冷水病FKC液中の残存ホルマリンはその効果に影響はないまたは極めて低いと推察されるが、残存ホルマリンはワクチンを製品化するときにゲラチン等(できればアレルゲンにならないもの)を加えてその濃度を抑制するべきであると考えられる。

※1) 金辻宏明：ハフ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)。
※2) 金辻宏明：ELISA検出時の冷水病菌体の固定方法と抗原性の関係、平成15年度滋賀水試事報、in press(2003)。

表1. ワクチン中に残存するホルマリン濃度測定結果

ワクチン	ホルマリン濃度(ppm)	
	原液	使用時
冷水病浸漬ワクチン【滋賀水試製】	2000>	200>
冷水病注射ワクチン【滋賀水試製】	2000>	0.15 μL/fish
マスビブリオ浸漬ワクチン【共立製薬】	80~100	4~40

※測定はニュートラレックス アルデヒド・テスト・キット【サクラファインテックジャパン】による。

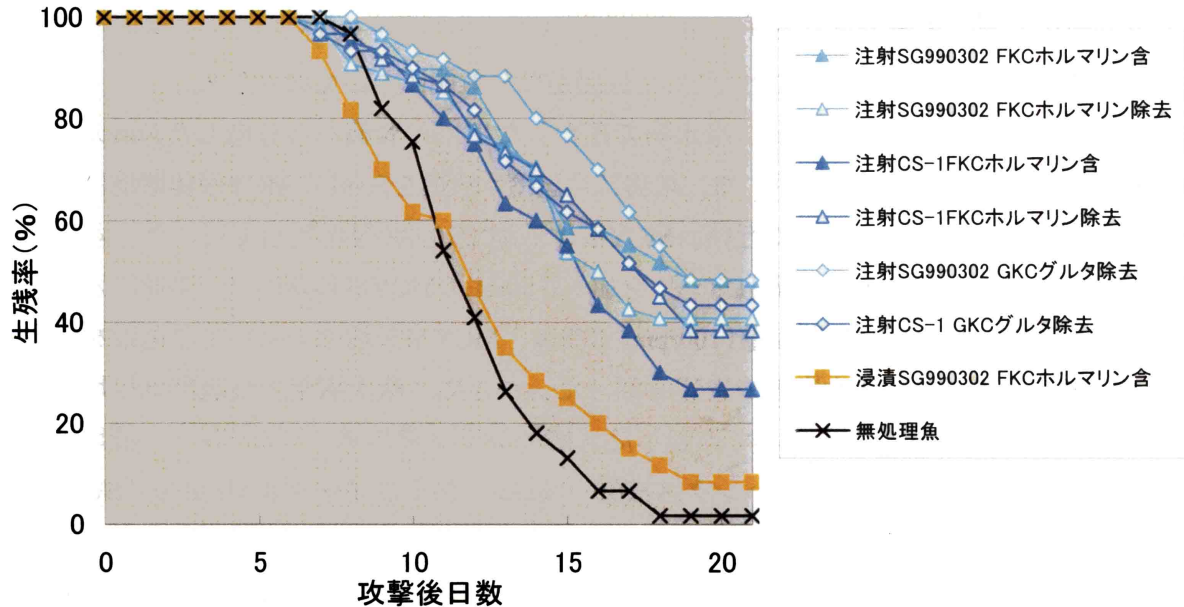


図2. 冷水病注射ワクチンに残存するホルマリン等固定液のワクチン効果に及ぼす影響.

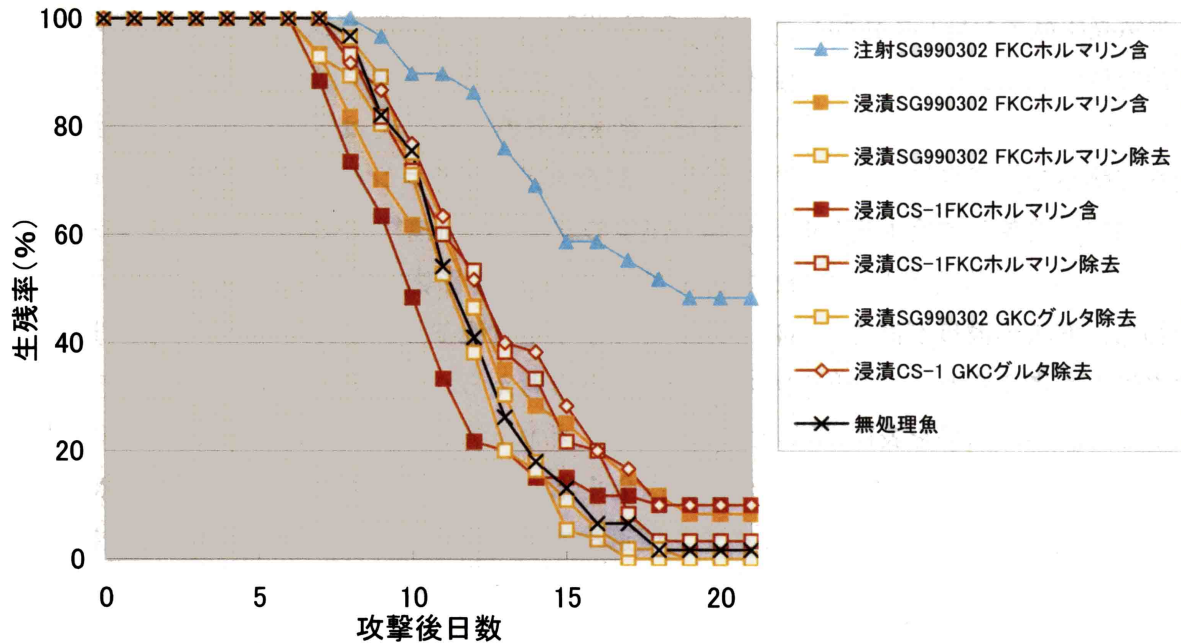


図3. 冷水病浸漬ワクチンに残存するホルマリン等固定液のワクチン効果に及ぼす影響.