

3) アユのシュードモナス病・冷水病2種混合アジュバント添加 注射ワクチンの有効性試験(1)

二宮浩司・遠藤 誠・金辻宏明・山本充孝

【目的】1度の処理でアユのシュードモナス病と冷水病に有効なワクチンを開発するため、シュードモナス病不活化ワクチンと冷水病不活化ワクチンを異なる比率で混合した数種のワクチンを用いて、両疾病に対する有効性を比較した。

【方法】

1. 供試魚および供試ワクチン：シュードモナス病や冷水病の発病歴のない平均体重8.5gの琵琶湖産アユを試験に供した。ワクチンには表1に示すように共立製薬株式会社が作製したシュードモナス病不活化ワクチン（不活化前生菌数 1.5×10^{10} CFU/mL、FPC941株）と冷水病不活化ワクチン（不活化前生菌数 6.0×10^8 CFU/mL、SG990302株）を水産試験場で1:0、1:1、1:9、1:99および0:1の容積比で混合し、さらに、前述の混合液とオイルアジュバント（MONTANIDE-ISA763A：Seppic社）を3:7の重量比で乳化させたものをそれぞれワクチンP、ワクチンM1、ワクチンM2、ワクチンM3およびワクチンFとした。
2. ワクチンの投与方法：前述の5種類のワクチン（混合ワクチンはワクチンM1～3の3種類）をそれぞれ50 μ L/尾の割合で供試魚の腹鰭基部前方の腹腔内に接種し、それぞれワクチンP区、ワクチンM1区、ワクチンM2区、ワクチンM3区およびワクチンF区とした。対照区には無処理魚を用いた。各試験区の供試魚数は150尾とした。ワクチン投与後は攻撃試験を行うまで各区の供試魚を地下水により流水飼育した（水温18.3～18.7 $^{\circ}$ C）。
3. 攻撃試験：ワクチン投与21日後に両疾病に対する攻撃試験を、ワクチン投与48日後には冷水病のみの攻撃試験を行った。シュードモナス病攻撃試験はシュードモナス病菌（FPC941株）をワクチンF区を除く各試験区の供試魚の腹腔内に注射した（ 1.1×10^3 および 5.3×10^3 CFU/尾）。冷水病攻撃試験は事前に用意した冷水病発病群の飼育排水をワクチンP区を除く各試験区に7～8日間導入することにより行った。攻撃試験における各試験区の供試魚数は22～26尾としたが、ワクチン投与21日後の冷水病の攻撃は26尾 \times 2水槽で試験を行った。攻撃試験中は地下水を用いて流水飼育を行った（水温18.3～18.9 $^{\circ}$ C）。シュードモナス病攻撃試験は14日間、冷水病攻撃試験は21日間、それぞれ経過観察し死亡魚を計数するとともに、死亡魚の症状の観察や細菌検査を行い、シュードモナス病または冷水病による死亡か否かを判定した。
4. ワクチンの有効性の評価：シュードモナス病攻撃試験ではシュードモナス病以外の死亡数を、冷水病攻撃試験では冷水病以外による死亡数を除き、Fisherの直接確率計算法により統計処理を行うとともに、有効率（有効率（%）= [1 - (ワクチン投与区死亡率/対照区死亡率)] \times 100）を算出した。なお、冷水病攻撃では2水槽で行った各試験区の結果をそれぞれ合計して統計処理を行うとともに有効率を算出した。

【結果および考察】3種の混合ワクチン投与区は、図1に示すように両疾病に対する攻撃試験において対照区と比べて統計学的に有意に生残率が向上したため（ $P < 0.05$ ）、何れの混合ワクチンも両疾病に対し有効であるものと考えられる。しかし、シュードモナス病に対する有効率は、図2に示すように単価ワクチンであるワクチンP区の70%に対し、ワクチンM1区で82%、ワクチンM2区で57%、ワクチンM3区で45%であり、一方、冷水病に対する有効率は、単価ワクチンであるワクチンF区の48～52%に対し、ワクチンM1区で22～35%、ワクチンM2区で27～39%、ワクチンM3区で34～55%であった。そのため、ワクチンM1とワクチンM2は冷水病に対する有効性が、ワクチンM3はシュードモナス病に対する有効性が、それぞれの単価ワクチンと比較して低下する傾向にあった。なお、腹腔内にアジュバントが残留していた供試アユの割合は、ワクチン投与47日後において各ワクチン投与区とも20～30%であった。

【成果の活用】今後は、両ワクチンの混合比率を変えたり、ワクチンの濃縮等による抗原量の調整を行い、特に冷水病に対する有効性を高めるとともに、アジュバントの残留性の改善および接種法の簡便化等を検討する必要がある。

表1. 試験に用いたワクチンに含まれるシュードモナス病菌および冷水病菌の不活化前生菌数

ワクチン	シュードモナス病不活化ワクチン : 冷水病不活化ワクチン	シュードモナス病菌の接種量 (CFU/尾)	冷水病菌の接種量 (CFU/尾)
ワクチンP	1 : 0	2.3×10^8	0
ワクチンF	0 : 1	0	9.0×10^6
ワクチンM1	1 : 1	1.1×10^8	4.5×10^6
ワクチンM2	1 : 9	2.3×10^7	8.1×10^6
ワクチンM3	1 : 99	2.3×10^6	8.9×10^6

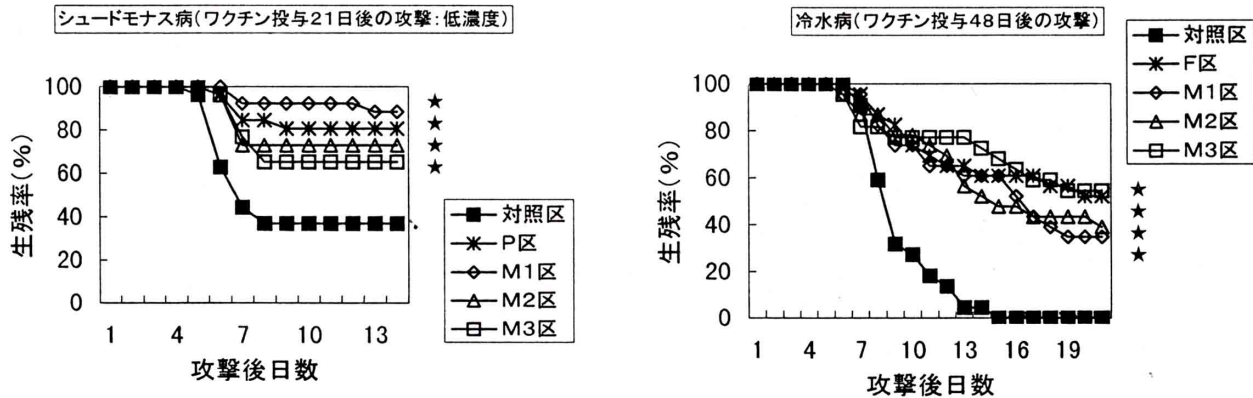


図1. 2価ワクチンで免疫したアユのシュードモナス病菌攻撃後および冷水病排水感染攻撃後の生残率の推移。(実験例)

★: 対照区とワクチン区で有意差あり (Fisherの直接確率計算法: $P < 0.05$)

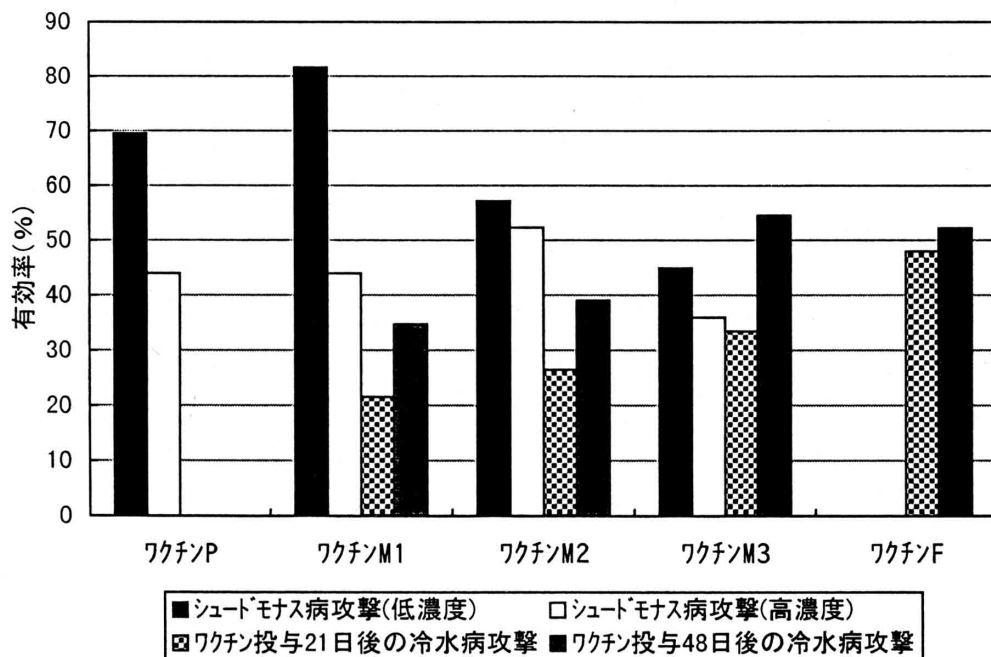


図2. 2価ワクチンで免疫したアユのシュードモナス病攻撃試験および冷水病攻撃試験における有効率。