

## 4) 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(2)

二宮浩司・遠藤 誠・金辻宏明・山本充孝

【目的】アジュバントの残留期間を短縮するため、第1回試験で有効であった2種の混合ワクチンを用い、第1回試験時の1/5接種量によるワクチン投与を行い、両疾病に対する有効性の評価とアジュバントの残留性の検討を行った。

### 【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6.3g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 $1.5 \times 10^{10}$ CFU/mL、FPC941株）と冷水病不活化ワクチン（不活化前生菌数 $6.0 \times 10^8$ CFU/mL、SG990302株）を水産試験場で1:9および1:99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M2およびワクチンM3とした。
2. ワクチンの投与方法：両ワクチン（ワクチンM2、ワクチンM3）をそれぞれ10 $\mu$ 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M2区およびワクチンM3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200尾とした。ワクチン投与後は攻撃試験を行うまで各試験区の供試魚を地下水により流水飼育した（水温18.6~19.0 $^{\circ}$ C）。
3. 攻撃試験：ワクチン投与24日後および49日後に両疾病に対する攻撃試験を行った。シュードモナス病攻撃試験はシュードモナス病菌（FPC941株）を各試験区の供試魚の腹腔内にワクチン投与24日後の攻撃においては $9.2 \times 10^2$ および $4.6 \times 10^3$ CFU/尾の2濃度の生菌濃度で、49日後の攻撃においては $1.1 \times 10^4$ CFU/尾の生菌濃度で注射した。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各試験区に6~8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24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18.2~18.9 $^{\circ}$ 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18~21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。
5. ワクチンの残留性の観察：ワクチン投与55日後に両ワクチン投与区の供試魚10尾を解剖し、腹腔内におけるアジュバントの残留の有無を肉眼で観察した。

【結果および考察】シュードモナス病攻撃試験において、両ワクチン投与区は図1に示すように概ね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（ $P < 0.01$ ）、シュードモナス病に対し有効性があるものと考えられる。両ワクチンの有効率は図2に示すように30~90%であった。一方、冷水病攻撃試験においては、両ワクチン投与区は図1に示すように概ね統計学的に有意に生残率が向上しなかったため、冷水病に対する有効性が認められなかった。なお、ワクチン投与55日後には両ワクチン投与区とも腹腔内にアジュバントの残留は認められなかった。ワクチン投与が7月12日と夏至を過ぎていたこともあり、ワクチン投与49日後の攻撃試験時には大半の供試魚で生殖腺の発達が認められた（生殖腺重量指数の平均値はオスで2.3、メスで1.7であった）。

【成果の活用】今回のワクチンは、シュードモナス病に対する予防効果とアジュバントの残留性の点では問題がないものと考えられるが、冷水病に対する有効性は不十分であると考えられた。ワクチン投与が7月12日と夏至を過ぎていたことから、供試魚の成熟が開始していた可能性があり、今後ワクチン接種時期がワクチン効果に与える影響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M2	1 : 9	$4.5 \times 10^6$	$1.6 \times 10^6$
ワクチンM3	1 : 9.9	$4.5 \times 10^5$	$1.8 \times 10^6$

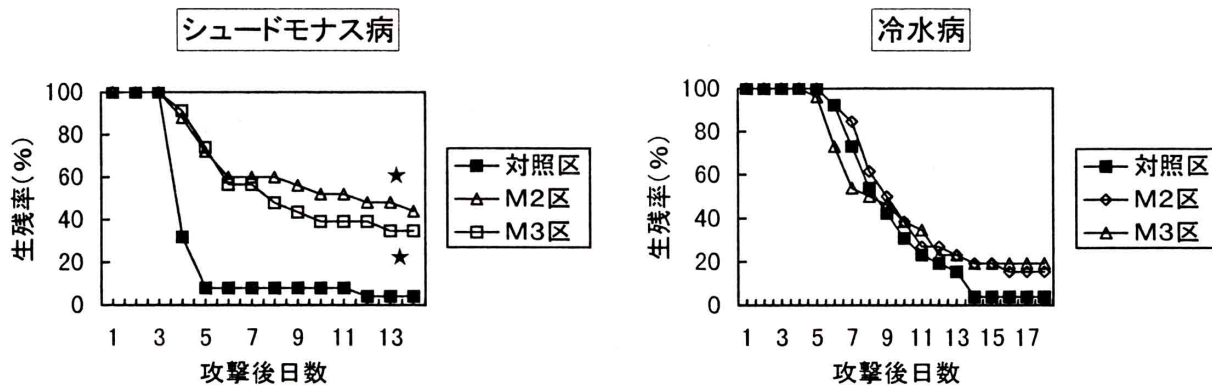


図1. 2価ワクチンで免疫したアユのワクチン投与49日後におけるシュードモナス病菌攻撃後および冷水病排水感染攻撃後の生残率の推移.

★: 対照区とワクチン区で有意差あり (Fisherの直接確率計算法:  $P < 0.01$ )

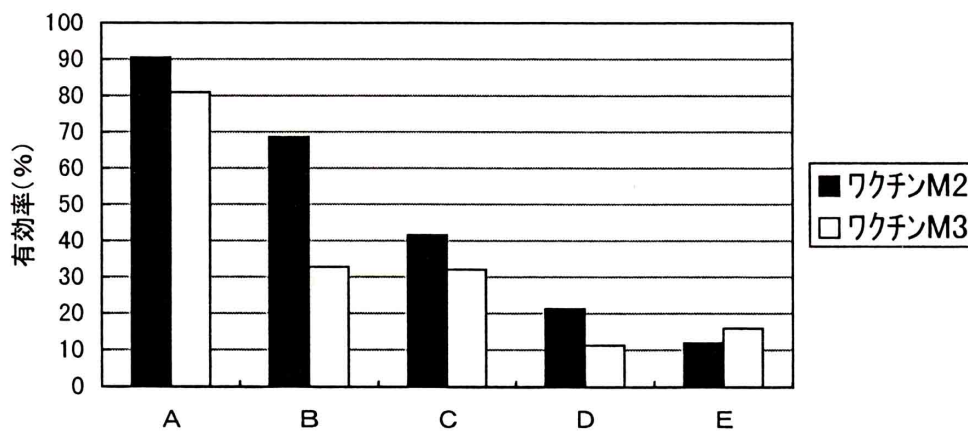


図2. 2価ワクチンで免疫したアユのシュードモナス病攻撃試験および冷水病攻撃試験における有効率.  
 A: ワクチン投与24日後のシュードモナス病攻撃(低濃度)、B: ワクチン投与24日後のシュードモナス病攻撃(高濃度)  
 C: ワクチン投与49日後のシュードモナス病攻撃、D: ワクチン投与24日後の冷水病攻撃  
 E: ワクチン投与49日後の冷水病攻撃