

## 17) ハプテン化および免疫原性強化した冷水病菌体浸漬ワクチンの有効性

金辻宏明・二宮浩司・山本充孝・遠藤 誠

【目的】 *Flavobacterium psychrophilum* を原因菌とするアユ冷水病は近年、非常に問題となっており、早急に対策を講じる必要がある。現在、アジュバントを併用したホルマリン不活化菌体(FKC)ワクチンで効果が認められているが、その有効性はやや低く、さらに個体ごとへの注射作業があることからより簡便な浸漬ワクチンの開発が切望されている。一方、FKCを用いた浸漬ワクチンの効果は低く、有効な浸漬ワクチンも見あたらない。そこで、本研究では冷水病菌のトリニトロフェニル化(TNP化)によるハプテン化および免疫原性を強化したワクチンの有効性について検討した。

【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2.8gの湖産アユを用いた。供試ワクチンにはヘモシアニンを結合したFKC、TNP化したFKCおよび従来のFKC<sup>1)</sup>の3種類を用いた。つぎにワクチンの濃度および投与を次に示す浸漬法および注射法で行った。浸漬法では供試ワクチンの不活化前菌濃度がそれぞれ $1 \times 10^8$ CFU/mlになるよう地下水で希釈し、10ℓのワクチン液に100尾の供試魚を10min浸漬して行った。注射法では不活化前菌濃度が $3.33 \times 10^7$ CFU/mlの各供試ワクチン1.8mlと植物性オイルアジュバントMontanide ISA763A【Seppic】4.2mlを混合(3:7)して乳濁化させた注射ワクチン液を各区それぞれ100尾に1個体あたり50 $\mu$ l( $5 \times 10^7$ CFU/fish)になるよう供試魚の腹腔内に接種して行った。免疫期間中は供試魚を0.5t水槽に収容して地下水を通水し、市販飼料を与えて飼育(2%魚体重/day)した。攻撃は免疫3および6week後に冷水病発生飼育水槽導入法によって行った。なお対照区には無処理魚を用いた。冷水病は前報<sup>2)</sup>と同様にして凍結病魚を投入して発生させ、投入7day後の飼育水を攻撃水とした。攻撃は各区50尾を60 $\times$ 30 $\times$ 30cm水槽2本に25尾ずつ収容し、攻撃水を50ml/minになるように7dayの間導入して行った。またワクチンの有効性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)}  $\times$  100**

【結果】 免疫3week後の攻撃試験の死亡状況を図1に、有効率を表1に示した。FKC注射区で最も高い効果が認められ、最終生残率および有効率はそれぞれ37.5%および28.6%であった。次にヘモシアニン結合FKC注射区で効果が認められ、最終生残率および有効率はそれぞれ30.0%および20.0%であった。TNP化FKC注射区および3種の浸漬ワクチン区では無処理区と同程度で最終生残率および有効率は17.5%以下および5.7%以下と効果は全く認められなかった。次に免疫6week後の攻撃試験の死亡状況を図2に、有効率を表2に示した。FKC注射区で最も高く最終生残率および有効率はそれぞれ47.6%および45%で免疫3week後よりも有効性は向上した。次にヘモシアニン結合FKC注射区で効果が認められ、わずかにFKC注射区の効果を下回った。TNP化FKC注射区および3種の浸漬ワクチン区ではヘモシアニン結合浸漬区およびFKC浸漬区で生残率が22.0および18.0%、有効率はそれぞれ18.1および13.9%とやや効果が認められた。 $\chi^2$ 検定で対照区と統計学的に比較するとそれぞれ1および5%の危険率で有意となり、ヘモシアニン結合ワクチンの方が有効性は高かった。ゆえにヘモシアニンの結合は注射ワクチンの有効性には及ばないが従来のFKC浸漬ワクチンより免疫原性が高くなる可能性もあり、今後改良を加えて有効性を再検討する必要がある。

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，in press (2003)。

2) 金辻宏明：アユ冷水病発生水槽水中の冷水病菌数測定方法の確立，平成14年度滋賀水試事報，in press (2003)。

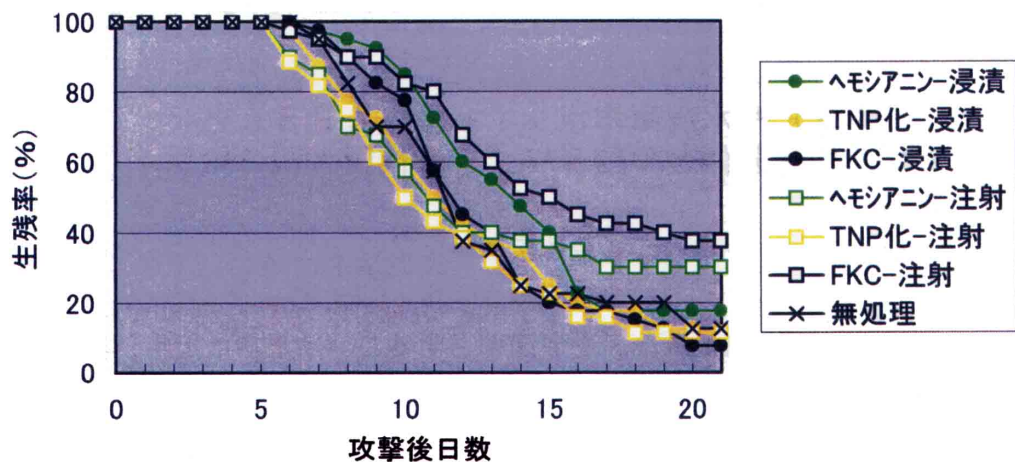


図1. 冷水病菌ハプテン化ワクチンを浸漬または注射して3週間後のアユの攻撃による生存率の推移.

表1 冷水病ハプテン化ワクチン接種3週間後の浸漬および注射ワクチンとしての有効率

	ワクチンの有効率(%)		
	ヘモシアニン-FKC結合	TNP化-FKC	FKC単一
浸漬免疫	5.7	-2.9	-5.7
注射免疫	20.0	-1.3	28.6

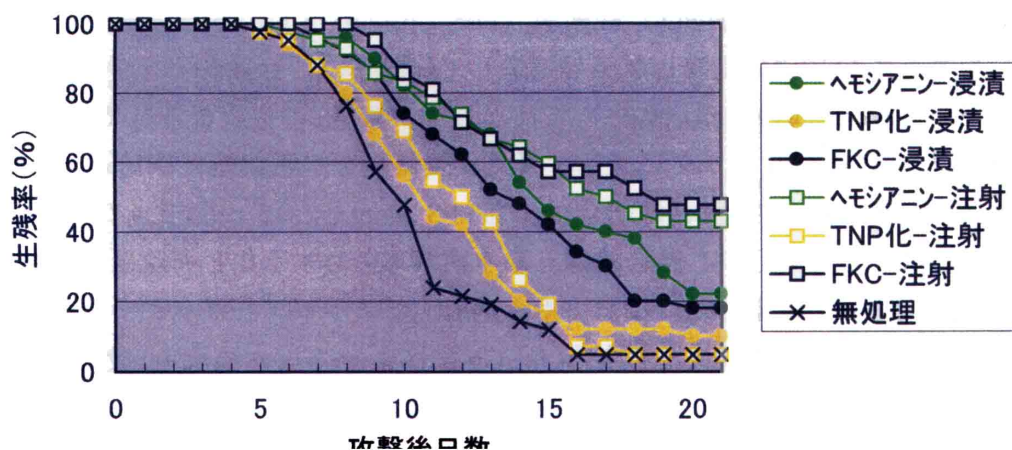


図2. 冷水病菌ハプテン化ワクチンを浸漬または注射して6週間後のアユの攻撃による生存率の推移.

表2 冷水病ハプテン化ワクチン接種6週間後の浸漬および注射ワクチンとしての有効率

	ワクチンの有効率(%)		
	ヘモシアニン-FKC結合	TNP化-FKC	FKC単一
浸漬免疫	18.1	5.5	13.9
注射免疫	40.0	0.0	45.0