

2 2) 培養法、不活化法の異なるアユ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】 これまでに、我々は*Flavobacterium psychrophilum*FKCをハプテン化して冷水病浸漬ワクチンとしての有効性を調べたところ、その効果は従来ワクチンより低かった。また、一般に免疫原性が高いと考えられているリポ多糖(LPS)や超音波破壊した細胞壁と、免疫原性の高いピブリオ病ワクチンとを結合させてワクチンとしての有効性についても同様に低かった。そこで、本研究では冷水病菌の培養方法また不活化方法を検討することによってワクチンとしての効果が期待できるのではないかと考え、培養時間、不活化方法の異なるワクチンを作製し、その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1.87 gの湖産アユを用いた。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*F. psychrophilum* SG990302株を用いた。ワクチンには次に示す6種類の浸漬ワクチンおよびFKC注射ワクチンを用いた。培養法を変化させたワクチンは、改変サイトファーガ培地(MCY)で24または72h培養した「24h培養FKC」および「72h培養FKC」、MCYに0.1%ゲラチンを加えた培地(GMCY)で24h培養した「GMCY培養FKC」、GMCYに10 μ M FeCl₃、1 μ M MgSO₄および0.001%量のTween80を含む培地(GMMCY)で24h培養した「GMMCY培養FKC」の4種類を作製した。なお培養方法の詳細は以下に示すとおりで、培養菌体は供試菌を前述と同様¹⁾にして24または72h本培養を行った。これらワクチンの不活化は前報と同様にして行った。次に不活化方法を変化させたワクチンは前述と同様¹⁾の方法で培養後、培養液(10 l)を攪拌しながら40 $^{\circ}$ Cになるように加温して15min静置後急冷して調製した「40 $^{\circ}$ C加温殺菌HKC」とおよび培養後10,800 \times gで30min遠心分離した沈渣をpH7.0のリン酸緩衝食塩水1 lに再浮遊させ、5%量のホルマリンを加えて4 $^{\circ}$ Cで24h攪拌しながら固定して作製した「5%固定FKC」の2種類を作製した。ワクチンの接種は前報²⁾と同様に浸漬法ではワクチン液に10min浸漬して、注射法では供試魚の腹腔内に50 μ l接種して行った。免疫期間中は供試魚を0.5t水槽に收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水導入法²⁾で行った。ワクチンの有効性は次の式から算出して評価した。**有効率(%) = [1 - (試験区死亡率 / 対照区死亡率)] \times 100**

【結果】 免疫3および6week後の攻撃試験の結果を図1および2に、有効率を表1に示した。免疫3week後では有効率はFKC注射区で17.6%と最も高く、次の40 $^{\circ}$ C加温殺菌FKCでは5%と低かった。6week後では40 $^{\circ}$ C加温殺菌区で有効率は8.6%とやや上昇したが本研究で使用したワクチンは従来の注射ワクチンより低かった。ゆえに冷水病FKCワクチンを作製する場合、何が防御抗原として働いているのかを特定する必要があると考えられた。一方40 $^{\circ}$ C加温殺菌HKCワクチンはやや有効で、さらに低温で殺菌すれば有効率が向上するかもしれないと考えられた。

文献 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：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，in press (2003)。

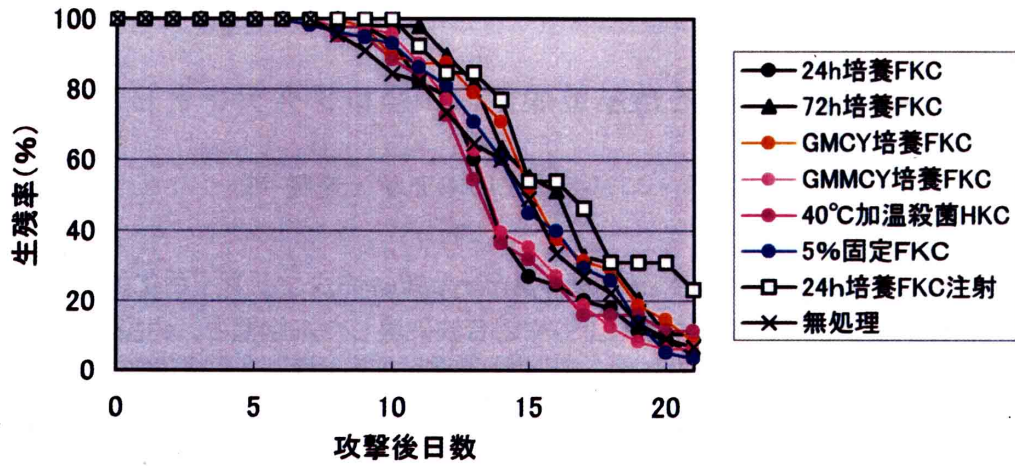


図1. 培養法、不活化法の異なる冷水病ワクチンを浸漬または注射して3週間後のアユの攻撃による生存率の推移.

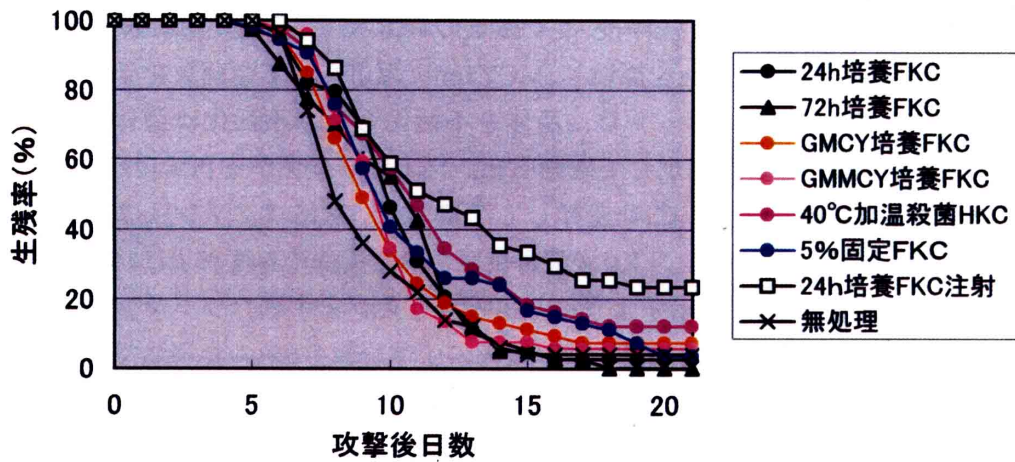


図2. 培養法、不活化法の異なる冷水病ワクチンを浸漬または注射して6週間後のアユの攻撃による生存率の推移.

表1 本研究で用いたワクチンの有効率

ワクチン	有効率 (%)	
	免疫3週間後に攻撃	免疫6週間後に攻撃
24h培養FKC	-2.4	-1.5
72h培養FKC	3.8	-4.2
GMCY培養FKC	1.8	3.7
GMMCY培養FKC	-0.5	1.8
40°C加温殺菌HKC	5.0	8.6
5%固定FKC	3.5	-0.3
24h培養FKC注射	17.6	20.3