

2 3) アユ冷水病における凍結乾燥菌体の経口ワクチンとしての有効性

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*ホルマリン不活化菌体(FKC)をハプテン化した冷水病ワクチン、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原菌のFKCと結合させたワクチンおよび培養方法や不活化方法の異なるワクチンを作製し、浸漬ワクチンとしての効果を検討したが、いずれも従来のFKC注射ワクチンの効果より低かった。そこで本研究では、接種方法を経口とし、冷水病菌体を凍結乾燥したものを投与して経口ワクチンとしての効果を調べた。

【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3.6 gの湖産アユを用いた。用いた供試菌株(SG990302株)、培養方法、FKCの作製方法は前報¹⁾と同様とした。経口ワクチンは以下のようにして作製した。すなわち、培養後、培養液を8,000rpm(10,800×g)で30min遠心分離して菌体を得、少量の蒸留水に浮遊させた。浮遊液は8,500rpm(8,900×g)で遠心して蒸留水で2回洗浄した。洗浄後、ごく微量の蒸留水に再浮遊させて凍結乾燥を行った。なお、凍結乾燥菌体は乾燥後、1mgを採取し、MCY1mlに浮遊させて生菌数を測定した。次に乾燥菌体を40℃で15minインキュベートし、菌体を不活化した。不活化は菌体を1mg採取し、MCY1mlに浮遊させて生菌数を測定して確認した。FKCは培養菌体をPBS pH7.0に再浮遊させ、0.3%量のホルマリンを加えて4℃で24h攪拌して作製した。次にワクチン区は経口ワクチン投与のみ区、経口ワクチン投与およびFKC浸漬併用区、FKC浸漬のみ区およびFKC注射区を設定し、各区100尾の供試魚に以下に示すようにして投与した。まず経口ワクチンは供試魚体重の2.0%の市販アユ用飼料(粒度:2C)に重量で餌の2%の菌体を餌の6%の食用油で添着させて作製(アユ100尾:360g+菌体144mg+油432mg)した。経口ワクチンの投与は調製餌料ワクチンを自動給餌機を用いて5回に分けて1 dayの間(AM6:00, 9:00, PM0:30, 3:00, 6:00)で行った。経口ワクチンFKC浸漬ワクチン併用区では経口ワクチン投与終了後、取り上げて浸漬FKCワクチンを前述²⁾と同様に10min浸漬して行った。FKC浸漬のみ区は前述²⁾のように供試魚を浸漬して行った。また経口および浸漬ワクチンはその区分にしたがって2week後に再度投与を行った。FKC注射ワクチン区も前述と同様に供試魚の腹腔内に50 μl接種して行った。免疫期間中は供試魚を0.5 t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水導入法²⁾で行った。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)} × 100**

【結果】 凍結乾燥後の生残数は6 CFU/mgで、加温後は0 CFU/mgと不活化されていた。免疫3および6week後の攻撃試験の死亡状況を図1および2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、有効率は3および6week後でそれぞれ17.6および20.3%であった。次に経口投与FKC浸漬併用区で高く、それぞれ10.3および5.8%とFKC注射区と比較して低かった。経口のみ区の有効率はFKC浸漬併用区より低く推移した。以上の結果から経口ワクチンと浸漬ワクチンを併用することによって有効率は高くなるが、その有効性は注射ワクチンより低く、また凍結乾燥菌体を用いた経口ワクチンには実用的効果はないのではないかと推察された。

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)。

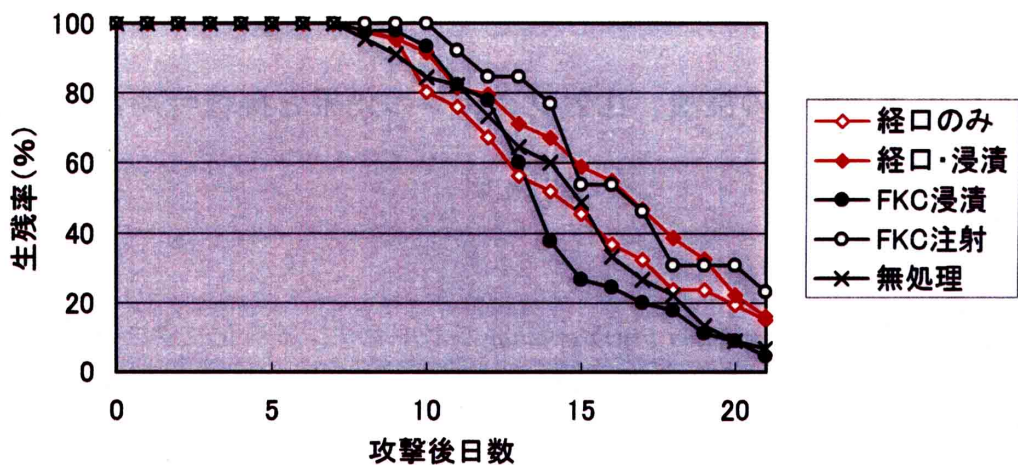


図1. 凍結乾燥冷水病経口ワクチンを投与して3週間後のアユの攻撃による生残率の推移.

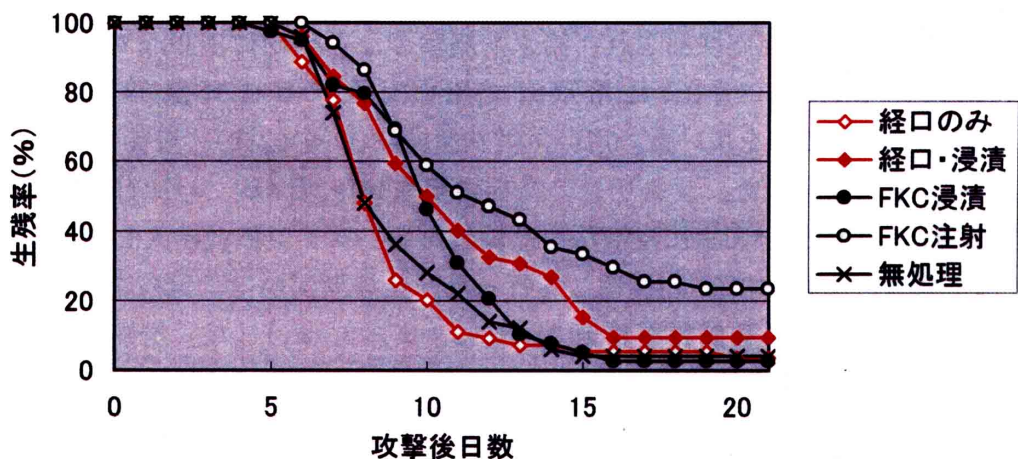


図2. 凍結乾燥冷水病経口ワクチンを投与して6週間後のアユの攻撃による生残率の推移.

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
経口投与のみ	9.2	-0.3
経口投与およびFKC浸漬	10.3	5.8
FKC浸漬	-2.4	-1.5
FKC注射	17.6	20.3