

2) 魚病対策技術開発研究推進事業－Ⅱ

(アユの冷水病に対する浸漬ワクチンの有効性試験-免疫賦活剤等の検討-)

二宮浩司・山本充孝・金辻宏明

【目的】 一度に大量かつ小型サイズのアユに適用可能な浸漬ワクチンを開発するため、長時間浸漬法および免疫賦活剤併用浸漬法によりホルマリン不活化ワクチンをアユに投与し、既に効果の認められているアジュバント添加注射ワクチンと有効性を比較した。

【方法】

1. 供試魚および供試ワクチン

冷水病の発病歴のない平均体重7.3 gの琵琶湖産アユを試験に供した。冷水病菌 (SG990 302株) を改変サイトファーガ液体培地で15°C、3日間培養した後、 5.0×10^8 CFU/mLの生菌を含む培養液にホルマリンを0.3%添加し菌を死滅させたホルマリン不活化菌体をワクチン原液として使用した。アジュバントには植物オイルベースのMONTANIDE-ISA711 (Seppic社) を供試した。アジュバント添加ワクチンは、ワクチン原液とアジュバントを3:7の重量比で乳化させて用いた。

2. 供試免疫賦活剤およびその投与方法

免疫賦活剤にはカードラン (β -1,3-グルカン: 和光純薬) を供試した。配合飼料にカードランを1%、サラダ油を3%添加し、十分に混合したものをカードラン添加配合飼料とした。給餌は手撒きで魚体重の2.0%を7日間連続して与えた。

3. ワクチンの投与方法

ワクチンの投与については、72時間浸漬区、免疫賦活剤併用浸漬区およびアジュバント添加注射区の3つのワクチン投与区を設定した。72時間浸漬区ではワクチン原液を地下水で100倍希釈し、その中で供試魚を通気しながら72時間浸漬した (水温18.4~18.7°C)。但し、水質の悪化を防ぐため24時間ごとにワクチン液を交換した。免疫賦活剤併用浸漬区ではカードラン添加配合飼料の投与終了7日後に72時間浸漬区と同様な方法で供試魚にワクチン投与を行った (水温18.4~18.7°C)。アジュバント添加注射区では供試魚を0.015%のFA100で麻酔し、アジュバント添加ワクチンを50 μ L/尾の割合で腹鰭基部前方の腹腔内に接種した。対照区には無処理魚を用いた。各区の供試尾数は100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18.4~18.7°C)。

4. 攻撃試験

攻撃試験は両浸漬ワクチンの投与16日後 (アジュバント添加注射ワクチンの投与19日後) に前もって用意した冷水病発病群の飼育排水を各試験区に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尾数は30尾×2水槽とした。攻撃試験中は地下水を用いて流水飼育を行った (水温18.5~19.3°C)。20日間経過観察し、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、冷水病による死亡か否かを判定した。

5. ワクチンの有効性の評価

2水槽で行った各試験区の結果をそれぞれ合計し、冷水病以外による死亡数を除き、有効率 (有効率 (%)) = $[1 - (\text{ワクチン投与区死亡率} / \text{対照区死亡率})] \times 100$ を算出した。また、攻撃試験後の死亡率に対するワクチンの感染防御効果を評価するため、Fisherの直接確率計算法により統計処理を行った。

【結果】 72時間浸漬区および免疫賦活剤併用浸漬区の生残率は、図1に示すように対照区のそれと比較して向上することなく、有効性は認められなかった。一方、アジュバント添加注射区の生残率は、対照区のそれと比較して統計学的に有意に向上した ($P < 0.001$)。また、アジュバント添加注射区の有効率は47.8%となり、冷水病に対して有効性が認められた。

【成果の活用】 ホルマリン不活化ワクチンを用いた浸漬投与では冷水病に対し十分な有効性が認められなかったため、今後は、成分ワクチン等の検討を行う必要がある。アジュバント添加注射ワクチンでは有効性が認められるが、アジュバントの残留性の改善や投与法の簡便化を検討する必要がある。

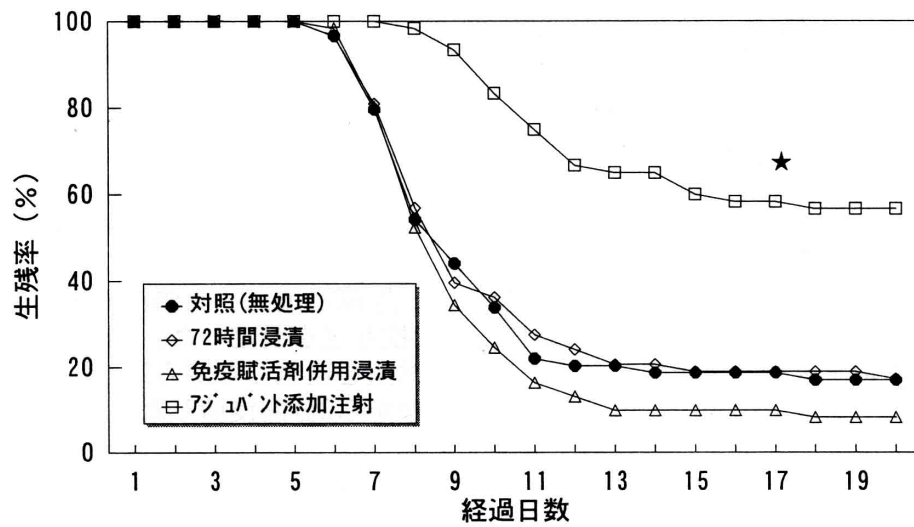


図1. ワクチンで免疫したアユの冷水病発病群からの排水感染攻撃後の生残率の推移.
 ★: 対照区とワクチン区で有意差あり (Fisherの直接確率計算: $P < 0.001$)