

3) 魚病対策技術開発研究推進事業－Ⅲ

(アユの冷水病に対する浸漬ワクチンの有効性試験-ワクチン濃度等の検討-)

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冷水病に対する浸漬ワクチンを開発するため、高濃度浸漬法および高張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

冷水病の発病歴がない平均体重1.1 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℃、2日間培養した後、遠心分離 (8900×g、30min.) で菌体を10倍濃縮した。次いで 1.8×10^9 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-ISA763A (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. ワクチンの投与方法

ワクチンの投与については、10倍希釈浸漬区、原液浸漬区、高張浸漬区およびアジュバント添加注射区 (陽性対照区) の4つのワクチン投与区を設定した。10倍希釈浸漬区ではワクチン原液を地下水で10倍希釈し、その中で供試魚を通気しながら2分間浸漬した。原液浸漬区ではワクチン原液の中で、供試魚を通気しながら2分間浸漬した。高張浸漬区では希釈後の濃度が5.32%となるように食塩を添加した地下水でワクチン原液を10倍希釈し、その中で供試魚を通気しながら2分間浸漬した。各浸漬区のワクチン投与時の水温は15.5~17.0℃であった。アジュバント添加注射区では供試魚を0.008%のFA100で麻酔し、アジュバント添加ワクチンを10 μL/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15.8~17.3℃)。

3. 攻撃試験

攻撃試験は、ワクチン投与14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17.4~17.7℃)。21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。

4. 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】 10倍希釈浸漬区は、図1に示すように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が ($P < 0.05$)、有効率は20%程度となり、何れの浸漬区においても十分な有効性は認められなかった。従って、今回の試験においては、ワクチン効果に対するワクチン濃度の依存性や高張処理の効果は確認できなかった。また、アジュバント添加注射区においても有効性が認められなかったが、その原因としては、①供試魚の平均体重が1.1 gと小型であること、②ワクチン投与量が10 μL/尾と微量であること、③アジュバントの残留が全く認められなかったこと、等の理由から、ワクチン接種にミスがあり、魚体内にワクチンが十分に取り込まれていなかった可能性が考えられる。

【成果の活用】 今回の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する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。

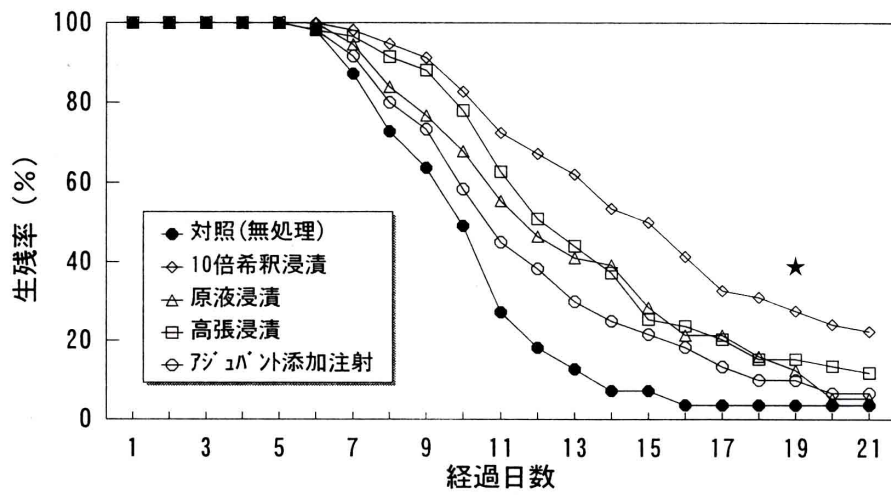


図1. ワクチンで免疫したアユの冷水病発病群からの排水感染攻撃後の生残率の推移.
 ★: 対照区とワクチン区で有意差あり (Fisherの直接確率計算: $P < 0.05$)