

#### 4) アユのシュードモナス病・冷水病2種混合アジュバント添加注射ワクチンの有効性試験（有効最小投与量の検討）

二宮浩司・山本充孝・山中 治

【目的】1度の処理でアユのシュードモナス病と冷水病に有効なワクチンを開発するため、シュードモナス病・冷水病2種混合アジュバント添加注射ワクチンによる有効性試験を行った。本試験ではワクチンの有効最小投与量およびアジュバントの残留性の検討を行った。

##### 【方法】

1. 供試魚および供試ワクチン：シュードモナス病や冷水病の発病歴のない平均体重16.1gの琵琶湖産アユを試験に供した。ワクチンには共立製薬株式会社の試作品で、シュードモナス病不活化菌体（不活化前生菌数 $1.7 \times 10^{10}$ CFU/mL、FPC941株）と冷水病不活化菌体（不活化前生菌数 $6.1 \times 10^8$ CFU/mL、FPC840株）を等量混合し、さらに、前述の混合液とオイルアジュバント（MONTANIDE-ISA763A：Seppic社）を3：7の重量比で乳化させたものを使用した。
2. ワクチンの投与方法：供試魚を0.015%のFA100で麻酔し、ワクチンをそれぞれ10  $\mu$ L/尾、25  $\mu$ L/尾および50  $\mu$ L/尾の割合で腹鰭基部前方の腹腔内に接種し、それぞれ10  $\mu$ L区、25  $\mu$ L区および50  $\mu$ L区とした。対照区には無処理魚を用いた。各試験区の供試尾数は200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18.6～18.8℃）。
3. 攻撃試験：各試験区の供試魚に対してワクチン投与18日後にシュードモナス病菌（FPC941株）の腹腔内注射攻撃（ $1.1 \times 10^3$ CFUおよび $5.6 \times 10^3$ CFU/尾）を行うとともに、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6日間導入することにより攻撃を行った。攻撃試験における各試験区の供試尾数は30尾としたが、冷水病の攻撃では30尾×2水槽で試験を行った。攻撃試験中は地下水を用いて流水飼育を行った（水温18.6～19.7℃）。シュードモナス病の攻撃試験では15日間、冷水病の場合は20日間それぞれ経過観察し、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、シュードモナス病または冷水病による死亡か否かを判定した。攻撃試験に用いなかった各試験区の供試魚について、その後も地下水による流水飼育を続け、ワクチン投与102日後まで自然感染によりシュードモナス病や冷水病が発生するか否か飼育観察を行った。その間の飼育水温は18.1～18.9℃であった。
4. ワクチンの有効性の評価：シュードモナス病の攻撃試験ではシュードモナス病以外の死亡数を、冷水病の攻撃試験では冷水病以外による死亡数を除き、それぞれ有効率（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。なお、冷水病の攻撃では2水槽で行った各試験区の結果をそれぞれ合計して有効率を算出した。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。
5. ワクチンの残留性および血清中の凝集抗体価の測定：各ワクチン投与区についてワクチン投与32日後、61日後および102日後に供試魚を解剖し、腹腔内におけるアジュバントの残留の有無を肉眼で観察した。ワクチン投与61日後および102日後に各試験区の供試魚10尾の尾静脈から採血を行い、定法により血清中の凝集抗体価の測定を行った。

【結果】攻撃試験の結果、本ワクチンは、シュードモナス病に対し全ての投与区で高い有効性（有効率：58～77%）を示したが、冷水病に対しては全ての投与区で有効性は確認できなかった（図1、2）。但し、自然感染試験においては、10、25  $\mu$ L区で冷水病が発生したのに対し、50  $\mu$ L区では冷水病が発生しなかった（図3）。また、本ワクチンの接種によりシュードモナス病菌に対する血清中の凝集抗体価は128～4096と高く上昇したが、冷水病菌に対する抗体価は2～64とシュードモナス病菌ほど高くは上昇しなかった。アジュバントの残留は全ての投与区において、ワクチン投与61日まで確認されたが、102日後では観察されなくなった。

【成果の活用】今回使用したワクチンについては冷水病に対する有効性を高めるとともに、アジュバントの残留期間を短縮する必要がある。

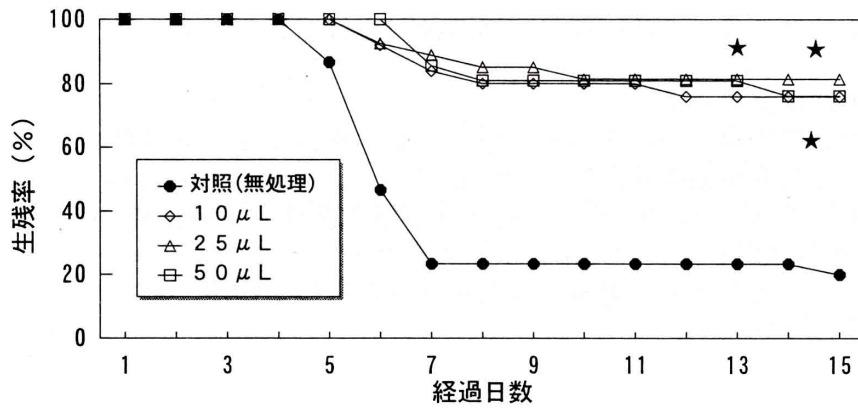


図1. 混合ワクチンで免疫したアユのシュードモナス病菌攻撃後の生残率の推移.  
 (シュードモナス病菌を供試魚の腹腔内に $1.1 \times 10^3$ CFU/尾の菌濃度で接種)  
 ★: 対照区と混合ワクチン区で有意差あり (Fisherの直接確率計算:  $P < 0.001$ )

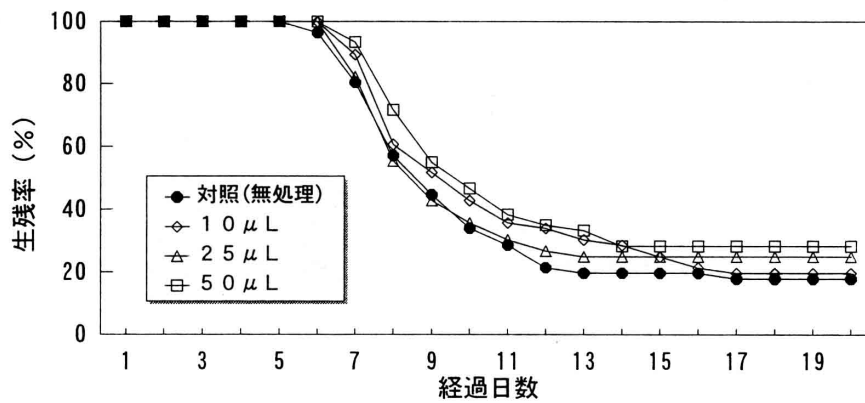


図2. 混合ワクチンで免疫したアユの冷水病発病群からの排水感染攻撃後の生残率の推

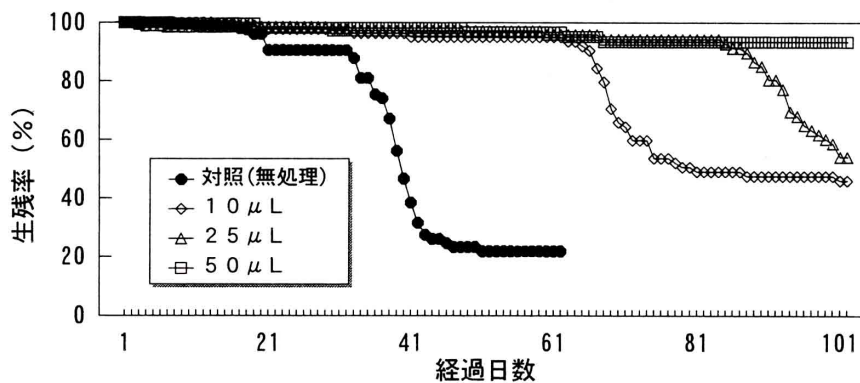


図3. 混合ワクチンで免疫したアユの冷水病自然感染試験時の生残率の推移.