

5) 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（免疫発現時期の検討）

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や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免疫発現時期の検討を行った。

【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27.7 g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 1.7×10^{10} CFU/mL、FPC941株）と冷水病不活化菌体（不活化前生菌数 6.1×10^8 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、前述のワクチンを50 μ L/尾の割合で腹鰭基部前方の腹腔内に接種し、混合ワクチン区とした。対照区には無処理魚を用いた。両試験区の供試尾数は200尾とし、ワクチン投与後は攻撃試験を行うまで地下水により流水飼育した（水温18.8～18.9℃）。

3. 攻撃試験およびワクチンの有効性の評価

両試験区の供試魚に対してワクチン投与3日後、6日後および13日後にシュードモナス菌（FPC941株）の腹腔内注射攻撃（ワクチン投与3日後： 1.1×10^3 CFU/尾、6日後： 1.3×10^3 CFU/尾、13日後： 1.7×10^3 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両試験区に4～5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25～30尾とした。攻撃試験中は地下水を用いて流水飼育を行った（水温18.5～20.2℃）。シュードモナス病の攻撃試験では8～14日間、冷水病の場合は13～14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。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。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。また、ワクチン投与14日後に両試験区の供試魚5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】（シュードモナス病に対する有効性）ワクチン投与3日後の攻撃試験では、図1に示すように混合ワクチン区の生残率は対照区のそれよりも低く、ワクチンの有効性は認められなかった。しかし、ワクチン投与6日後および13日後の攻撃試験では混合ワクチン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（ $P < 0.001$ ）、シュードモナス病に対する有効性が認められた（有効率：48.4～56.4%）。なお、ワクチン投与3日後の攻撃試験では攻撃14日後から、ワクチン投与6日および13日後の攻撃試験では攻撃6日後頃から冷水病による死亡魚が混在するようになった。攻撃試験期間中の両区の冷水病による死亡魚は2～7尾であった。

（冷水病に対する有効性）3回行った何れの攻撃試験においても、図2に示すように混合ワクチン区の生残率は対照区のそれと比較してほとんど向上せず、ワクチンの有効性は認められなかった。

（凝集抗体価）混合ワクチン区ではシュードモナス病菌に対する抗体価が上昇したが（ $< 4 \sim 64$ ）、冷水病菌に対する抗体価は上昇しなかった。

【成果の活用】今回使用したワクチンは、投与1週間後からシュードモナス病に対する有効性が認められたが、冷水病に対してはさらに有効性を高める必要がある。

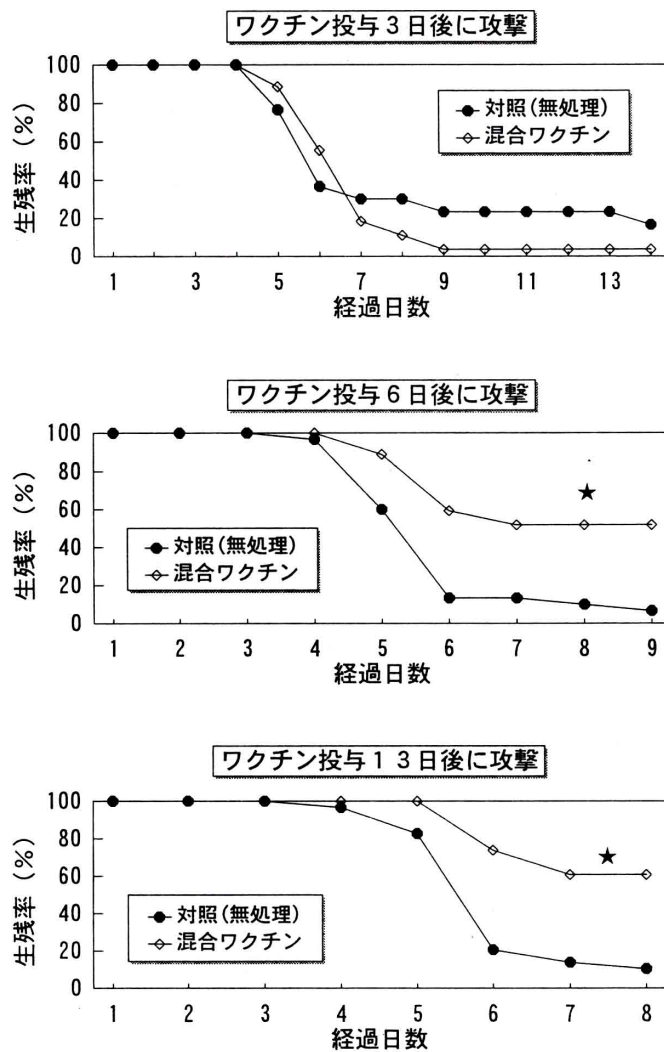


図1. 混合ワクチンで免疫したアユのシュードモナス病菌攻撃後の生残率の推移.
★: 対照区と混合ワクチン区で有意差あり (Fisherの直接確率計算: $P < 0.001$)

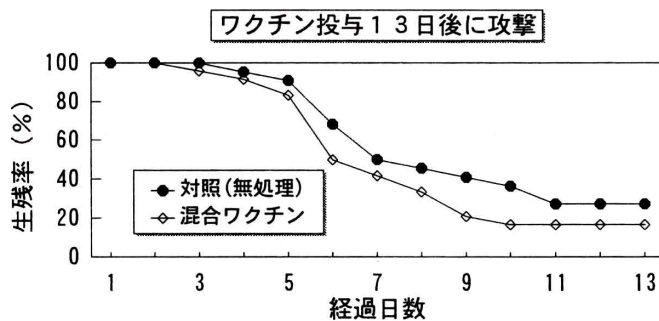


図2. 混合ワクチンで免疫したアユの冷水病発病群からの排水感染攻撃後の生残率の推移.