

8) アユのシュードモナス病に対するワクチンの予防効果

二宮浩司・山本充孝

【背景】シュードモナス病の原因細菌である *Pseudomonas* sp. (シュードモナス病菌) は薬剤に対する感受性が低く、治療が困難なため、ワクチン (ホルマリン不活化抗原) の開発が望まれている。

【目的】ワクチンの有効性については、既に昨年度確認しており、今年度はワクチン開発の基礎資料を得るため、免疫発現の時期、有効濃度について検討を行った。

【成果概要】

1. ワクチンの接種：表1に示すように浸漬法で4回、注射法で1回の計5回ワクチン試験を行った。浸漬法は、ワクチン原液 (共立商事試作品、不活化前生菌数 1.7×10^{10} CFU/ml) を飼育水で所定倍率に希釈したものを使用ワクチン液とし、通気しながら供試魚を10分間浸漬した。注射法は、ワクチン原液 (前述したものと同一) を生理食塩水で所定倍率に希釈したものを使用ワクチン液とし、供試魚に対して1魚体当たり0.1ml腹腔内に注射した。対照区は、ワクチン液の代わりに浸漬法の場合では飼育水を、注射法の場合では生理食塩水を使用し、他はワクチン接種と同様な方法で処理した。ワクチン接種後、所定期間飼育した後、攻撃試験を行った。
2. 予防免疫の評価：シュードモナス病以外によるへい死尾数を除き、次の計算式から有効率を算出するとともに、Fisherの直接確率計算法により予防効果を評価した。

$$\text{有効率 (\%)} = [1 - (\text{免疫区へい死率} / \text{対照区へい死率})] \times 100$$

3. 結果および考察 (表2、3)

浸漬免疫：①免疫発現の時期はワクチン接種後2週～5週目頃と思われた。②有効濃度は不活化前生菌数にして 10^{7-8} CFU/mlと思われた。③今回、ワクチンの有効性が確認された試験のうち、ワクチン接種時における供試魚の平均体重の最小のものは、1.3gであった。④ワクチン接種後12週目の攻撃試験ではワクチンの有効性は確認できなかったが、その際、供試魚の成熟がかなり進んでいたため、成熟に伴う生体防御能の低下が起っていた可能性がある。

注射免疫：①1魚体当たり不活化前生菌数にして 10^6 CFUの量のワクチンを腹腔内に注射すると予防効果が得られるものと思われた。②ワクチン接種後、少なくとも9週目までは有効であるものと思われた。

【成果の活用】ワクチンの実用化に向けてさらに詳細な試験を行う必要がある。

表1. ワクチン試験の実施要領

項目	試験1	試験2	試験3	試験4	試験5
接種法	浸漬法	浸漬法	注射法	浸漬法	浸漬法
使用ワクチン液 (原液の希釈倍率)	1×10 ² 1×10 ³ 1×10 ⁴	2×10 ²	5×10 ²	1×10 ²	1×10 ³ 1×10 ⁴ 1×10 ⁵ 1×10 ⁶
ワクチン接種時の供試魚の平均体重 (g)	7.1	1.3	7.1	3.9	7.3
ワクチン接種後、攻撃試験までの日数	14	15	63	16,36,87	13,36
攻撃方法	腹腔内注射法	浸漬法	腹腔内注射法	腹腔内注射法	腹腔内注射法

表2. シュードモナス病ワクチン試験のまとめ (浸漬免疫)

ワクチン濃度 (/ml)	ワクチン接種後、攻撃試験までの経過週数 (カッコ内は日数)					
	2 (11-17)	3 (18-24)	4 (25-31)	5 (32-38)	6 (39-45)	12 (81-87)
10 ⁸ (1×10 ² 倍希釈)	◎×			◎		×
10 ⁷ (2×10 ² ~1×10 ³ 倍希釈)	◎○×		○*	○		
10 ⁶ (1×10 ⁴ 倍希釈)	◎				×	
10 ⁵ (1×10 ⁵ 倍希釈)				△		
10 ⁴ (1×10 ⁶ 倍希釈)				△		

Fisherの直接確率計算法により有意差を検定。

◎: P < 0.05, ○: 0.05 ≤ P < 0.1, △: 0.1 ≤ P < 0.2, ×: 0.2 ≤ P

※: 平成8年度試験

表3. シュードモナス病ワクチン試験まとめ (注射免疫)

ワクチン濃度 (/魚)	ワクチン接種後、攻撃試験までの経過週数 (カッコ内は日数)					
	2 (11-17)	3 (18-24)	4 (25-31)	5 (32-38)	6 (39-45)	9 (60-66)
10 ⁶ (5×10 ² 倍希釈)		◎*				◎

Fisherの直接確率計算法により有意差を検定。

◎: P < 0.05, ○: 0.05 ≤ P < 0.1, △: 0.1 ≤ P < 0.2, ×: 0.2 ≤ P

※: 平成8年度試験