

## 4) 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、ワクチンの開発が望まれている。

【目的】昨年度に引き続き、ワクチン開発の基礎資料を得るため、主として浸漬免疫におけるワクチンの投与方法(ワクチン濃度、ワクチンの投与時間、投与回数)の検討を行うとともに、一部、注射免疫の有効性について検討を行った。

### 【成果概要】

1. 方法：アユを用いて、表1に示すように5回のワクチン試験を行った。浸漬法は、ワクチン原液(共立商事製試作品、不活化前生菌数 $2.3 \times 10^{10}$  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所定時間および所定回数浸漬した(2回投与区は、1回目のワクチン投与後16日目に1回目と同様な方法でワクチン投与を行った。)。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を腹腔内に注射した。浸漬法の対照区は、ワクチン液の代わりに飼育水を使用し、他の処理はワクチン投与と同様とした。一方、注射法の対照区は無処理とした。ワクチン投与後、所定期間飼育した後、シュードモナス病菌の腹腔内注射攻撃を行い、次の計算式から有効率を算出し、ワクチンの予防効果を評価した。

$$\text{有効率(\%)} = [1 - (\text{免疫区死亡率} / \text{対照区死亡率})] \times 100$$

### 2. 結果および考察(図1)

①浸漬免疫：(7)100倍希釈・10~15分間・1回：ワクチン投与後2~3、4、6週目の有効率はそれぞれ10.2~61.9% (平均35.3%)、7.2~47.1% (平均29.2%)、19.0~22.8% (平均20.9%)となった。(i)100倍希釈・15分間・2回：ワクチン投与後3、4、6週目の有効率はそれぞれ41.8%、32.4%、49.5%となり、ワクチン投与が1回の時と異なって、6週目に有効率は低下しなかった。これは、ワクチン投与を2回行ったことによるブースター効果が現れたためと考えられた。(u)1000倍希釈・24時間・1回：ワクチン投与後2~3、4、6週目の有効率はそれぞれ29.6~81.0% (平均55.3%)、32.4~36.0% (平均34.2%)、10.8%となり、6週目の結果を除くと100倍希釈・10~15分間・1回投与と比べてやや有効率は高い傾向にあった。(I)10000倍希釈・24時間・1回：対照区と比べて生残率が低く、高い有効率を得ることはできなかった。

②注射免疫：今回行った試験(100倍希釈・0.1ml・1回)では、高い有効率を得ることはできなかった。

【成果の活用】安定的に高い有効率が得られるワクチンの投与技術を確認するため、浸漬免疫については、1000倍希釈・24時間・1回~2回投与の追試を行う必要がある。また、注射免疫については、アジュバント添加注射ワクチンの検討を行う必要がある。

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                                       |
|-----------------------------------|--|---------------|--|---------------|---|
| 投与方法                              | 浸漬法  | 浸漬法           | 浸漬法  | 浸漬法           | 浸漬法<br>注射法                                |
| 投与条件(使用ワクチン液の原液からの希釈倍率、投与時間、投与回数) | ・100倍、15分間、1回<br>・100倍、15分間、2回<br>・1000倍、24時間、1回 | ・100倍、10分間、1回 | ・100倍、10分間、1回<br>・1000倍、24時間、1回<br>・10000倍、24時間、1回 | ・100倍、10分間、1回 | ・100倍、10分間、1回(浸漬法)<br>・100倍、0.1ml、1回(注射法) |
| ワクチン投与時の供試魚の平均体重(g)               | 5.1  | 5.1           | 11.6   | 15.7          | 26.9                                      |
| ワクチン投与後、攻撃試験までの日数                 | 21, 30, 44                                       | 15, 29, 44    | 15, 30   | 13, 29        | 13  |

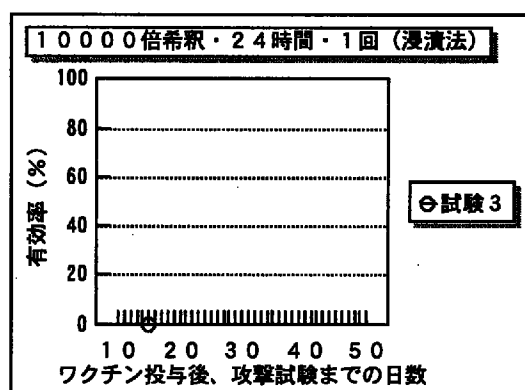
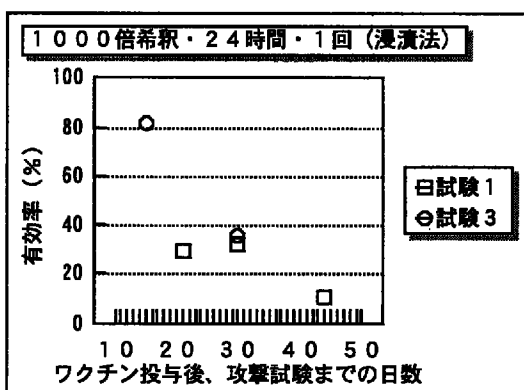
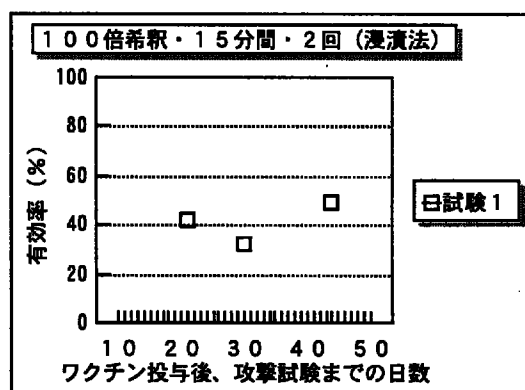
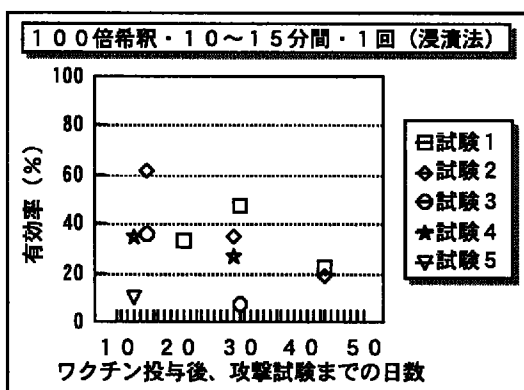


図1 シュードモナス病ワクチン試験のまとめ(浸漬法)。