

10%塩化ナトリウムで殺菌した冷水病菌のワクチン効果

金辻宏明

1. 目的

効果的なアユの冷水病浸漬ワクチンを開発するため、冷水病菌体をNaClで殺菌して菌体抗原へのホルマリン固定の影響を受けないワクチンを作製し、その効果について検討した。

2. 方法

供試魚には、2017年に琵琶湖で採捕され、28℃で加温処理した無病歴アユを用いた。供試菌には冷水病菌SG150804株を用いた。培養は、種培養として200mLの1/2CGY培地に種菌を接種して15℃、48時間、120rpmで振盪して行い、本培養として種培養菌を1mM CaCl₂を含む1Lの1/2CGY培地に接種して15℃、48時間、200rpmで攪拌して行った。ワクチンは本培養液1.2Lに10%(w/v)のNaClを加えて15℃、200rpmで5日間攪拌して作製(塩殺菌ワクチン)した。菌体の形態の変化はクリスタルバイオレットによる単染色により確認した。ワクチン処理は、ワクチン原液を地下水で2Lになるよう12.5倍希釈(希釈後NaCl濃度0.8%)したものに供試魚(平均体重2.8g)を60分間浸漬して行った。ワクチンの効果は、初回免疫28日後のアユを攻撃用菌液を2Lになるよう地下水で4倍希釈(1.1×10⁹CFU/mL)した液に60分間浸漬して攻撃を行って評価した。攻撃用菌液は、上述と同様にして培養したものを用いた。攻撃後は前報と同様にして飼育・死亡魚を計数し、ワクチンの有効性をRPSおよびFisherの直接確率計算法で評価した。

3. 結果

塩殺菌ワクチンの菌体の形態を図1に示す。供試した冷水病菌株の培養液中の菌体はホルマリンで固定するとすべて分散するが、NaClで殺菌した菌体は一部分散するものの、分散しない大きな菌塊が多数認められた。次に、

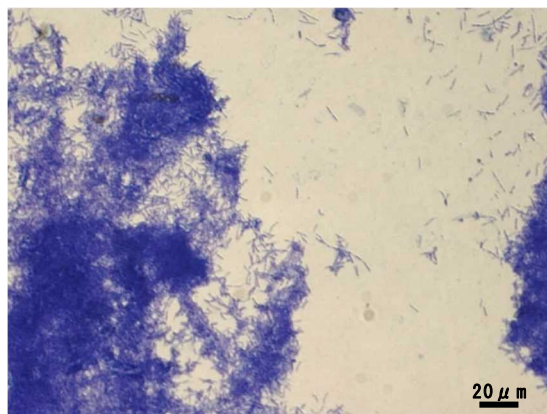


図1. 冷水病培養菌を10% (w/v) 塩化ナトリウムで殺菌した時のクリスタルバイオレットによる染色像.

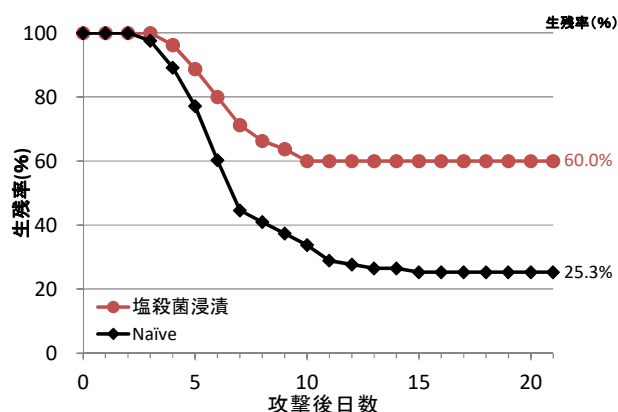


図2. 塩化ナトリウム殺菌冷水病浸漬ワクチン接種アユの攻撃後の生残率の推移.

攻撃後の生残率の推移を図2に示す。無処理対照区の最終生残率が25.3%であったのに対し、ワクチン接種区では60.0%で、RPSは46.5%、Fisherの直接確率計算法による検定では $p < 0.0001$ と有意に効果を示した。これらの結果から、冷水病菌をNaClで殺菌することによりホルマリンでは変性を受ける菌体のタンパク質などの感染防御抗原が変性せずに凝集形態を維持したと考えられ、さらにこの変性していない抗原などによりワクチン効果を示したと思われる。なお、ワクチン投与時のNaClの最終濃度が0.8%であることから、ワクチンの効果に影響した可能性も考えられる。