

アマゴのセツソウ病に関する研究 - I

経皮ワクチンの予防効果について

※

里井晋一・高橋誓・伊東正夫・太田豊三

アマゴ養殖を普及するにあたって、セツソウ病を克服することが重要な問題になっている。我々は、これまで数種の薬剤を使ってこの疾病を予防治療して来たが、最近、これらの薬剤に耐性をもつ菌が出現し、薬剤を使ってこの疾病を予防治療することが一層困難となつて来た。そこでワクチンを投与することによって、予防することが出来れば最良の方策であると考え、昭和46年度にセツソウ病研究会の連絡試験としてワクチンの予防効果試験を行なったが、満足な成果が得られなかったので昭和47年度はその試験方法を一部改めると共に7種類のワクチン〔単価(滋賀)〕を作り、アマゴに接種して、抗体形成の推移を調べ、又免疫したアマゴに生菌を接種して攻撃試験を行ない、ワクチンの予防効果を検討したので報告する。

1. 試験材料及び方法

- (1) 試験期間 : 試験は昭和47年1月19日に開始し、6月6日に終了した。
- (2) 供試魚 : 昭和46年7月に醒井養鱒試験場よりアマゴ0年魚を輸送し、水温17~19℃の地下水で約5カ月間飼育し、試験開始1カ月前に水温が11~12℃になるよう湖水を混合して予備飼育を行なった。供試魚の大きさは平均72.4gr、試験区を8区設けて、各区60尾づつ放養した。試験開始前に供試魚が自然免疫を獲得しているのではないかと考え、供試魚群から無作為に12尾取り揚げ抗体価を測定した。いづれの個体も1:20~40の抗体価を示し、低い水準の免疫が出来ていたが、この程度の免疫は供試魚の正常抗体価であろうと考えて、試験に使用した。
- (3) ワクチンの種類 : アマゴ病魚より分離し、保存しておいたA. Salmonicida菌をワクチン作製前にアマゴに接種して魚体通過を2回行ない、「若返り」させた後、普通寒天平板培地に植え付け、22℃で48時間培養し、

※ 滋賀県醒井養鱒試験場

集菌して表1に示す濃度の溶液で殺菌し、滅菌生理食塩水で遠心洗浄して作製した。

表1 ワクチンの種類及び作製方法

試験区	ワクチンの種類	作製方法 (不活化方法)
1	ホルマリンワクチン	0.5%ホルマリン液と、1.0%クロームミョウバン液を9:1の割合に加えて、菌濃度が $1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ になるようにして、室温で1週間放置後0.5%ホルマリン生理食塩水で3回遠心洗浄して作製。
2	マーズニンワクチン	ホルマリンワクチンと同じ方法で作製。不活化には0.02%マーズニン液を使用。
3	フェノールワクチン	ホルマリンワクチンと同じ方法で作製。不活化には0.5%フェノール液を使用。
4	ホルマリンアジュバントワクチン	ホルマリンワクチンとCompleat Freund's adjuvant (DIFCO)を接種直前に1:1に混合して作製。
5	エチルエーテルワクチン	エチルエーテルを菌浮遊液の3倍量加えて菌濃度が $1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ になるようにして、室温で1週間放置後0.85%生理食塩水で3回遠心洗浄して作製。
6	クロロホルムワクチン	エチルエーテルワクチンと同じ方法で作製。不活化にはクロロホルムを使用。
7	エチルアルコールワクチン	エチルエーテルワクチンと同じ方法で作製。不活化にはエチルアルコールを使用。
8	Control (生理食塩水)	

いづれのワクチンも使用前に滅菌テストをして使用した。

- (4) 試 験 池 : コンクリート池 (2 m×5 m水深 0.6 ~ 0.8 m) 8面使用した。
- (5) 飼 育 水 : 地下水と湖水を混合して使用した。試験期間中の平均水温は 11.3 ~ 18.1℃であった。
- (6) 給 餌 : 市販配合ペレットを毎日適量与えた。
- (7) ワクチンの接種 : ツベルクリン注射器を用い、第1回目のワクチン接種は、1・2区は1月19日、3・4区は1月20日、5・6・7・8区は1月21日に行ない、さらに1週間後に2回目のワクチン接種を行なった。接種量は第1回目は0.1 mg/1尾、第2回目は0.2 mg/1尾であり、接種部位は腹鰭付近の腹腔に接種した。接種後は毎回ニフルブラジン 1 ppmで1時間消毒を行ない各池に放養した。
- (8) 抗体価の測定 : 抗体価の測定は、第1回目ワクチン接種後1・2区は8日目、3・4区は7日目、5・6・7・8区は6日目に行ない、それ以後は2週間おきに15週間後まで行なった。供試魚は各区2~4尾使用し、採血は尾柄部を切断し全採血を行ない、血液は4℃の冷蔵庫に1昼夜放置して血清を取り、0.85%の滅菌生理食塩水で2倍段階希釈し、各々に一定量の抗原を加えて室温で2~3時間反応させた後、冷蔵庫に1昼夜放置して、凝集の有無を肉眼で観察した。なお血清を常法どおり56℃で30分間加熱して非働化すると反応が不明瞭になり、抗体価は非働化しない場合に比べて $\frac{1}{4}$ に低下した。又46℃で30分間加熱すると $\frac{1}{2}$ に低し、36℃で30分間加熱した場合は、非働化しない場合とほとんど変わらなかった。したがって抗体価の測定には血清は非働化せずに使用することにした。
- (9) 攻 撃 試 験 :
- (I) 攻 撃 試 験 : ワクチン接種17週間後の5月23日に行ない、その後2週間斃死状況を観察してワクチンの予防効果を判定した。
- (II) 攻 撃 菌 量 : *A. salmonicida* 菌を普通寒天培地に植え付け、22℃で48時間培養し集菌して、滅菌生理食塩水に0.01 mg/mlになるよう懸濁させて、1尾当り0.1 ml 背鰭付近の側部筋肉又は皮下に接種した。
- (III) 供 試 魚 : 各区、生菌接種魚10尾と脂鰭を切除した無接種魚5~10尾を混養した。無接種魚は脂鰭を切除した後、ニフルブラジン 1 ppm で1時間消毒した。
- (IV) 試 験 池 : コンクリート池 (1 m×2 m水深 0.4 ~ 0.5 m) 8面使用した。
- (V) 飼 育 水 : 水温 17.6 ~ 18.9℃の地下水を使用した。
- (VI) 給 餌 : 市販配合ペレットを毎日適量与えた。

2. 結果及び考察

- (1) 各種の抗原に対するアマゴの抗体形成

ワクチン試験を開始するに先だて、供試魚が自然免疫を獲得しているのではないかと考え、供試魚群から12尾を無作為に取り出し、抗体価を測定した。いづれの個体も1:20~40の範囲の抗体を保持し、低い水準の免疫を獲得していた。又表2の対照区に示すように、2週間おきに抗体価を測定しても1:20~80の範囲の抗体を保持していた。このことは、供試魚が過去にセッソウ病に軽度感染し、免疫を獲得して、これが比較的長期間持続しているのかもしれない。しかし林ら¹⁾は醒井養鱒場のニジマスの子ブリオ菌に対する自然免疫の獲得状態を調べ、自然免疫は子ブリオ病流行後数カ月で自然に消失すると報告している。又木村²⁾は全く異なる養魚池から採集した健康なニジマスの抗体価を調べ、1:128以下の抗体価はニジマスの正常抗体価と判定してさしつかえないと述べている。又当場で、6カ月間の飼育期間中に病死した魚を採集して、細菌検査を数回にわたり行なったが、セッソウ病菌を全く検出することが出来なかった。これらのことから供試魚が1:20~40の範囲の抗体を保持していても、必ずしも過去にセッソウ病に感染し、免疫を獲得したものとはいえないように思われる。これは他の病原菌或は非病原菌の抗体が形成されていて、これらの菌がセッソウ病菌と一部共通の抗原構造を有していたためか、餌料等に類似の抗原となる物質が含まれていたためか、他に原因があったのかもしれない。

次に、表1に示すように7種類のワクチンを作製し、各々のワクチン接種後の抗体価を2週間おきに測定して、その推移を調べ、抗体の産生能力・抗体の持続性を検討した。結果は表2に示す通りである。各々のワクチンに対するアマゴの抗体価の変化は類似していた。いづれのワクチンも7~9週間後に抗体価は最高に達した。がその後、ワクチンの種類によって徐々に低下するものと、かなり急速に低下するものが見られた。前者のものはホルマリンワクチンとホルマリンアジュバンドワクチンであり、後者のものはマーゾニンワクチン、フェノールワクチン、エチルエーテルワクチン、クロロホルムワクチン、エチルアルコールワクチンである。前者のホルマリンワクチンはワクチン接種9週間後に抗体価は最高に達し平均1:28960を産生し、15週間後においても抗体価は平均1:2560を維持していた。ホルマリンアジュバンドワクチンはワクチン接種9週間後に抗体価は最高に達し、平均1:40960と非常に高い抗体を産生し、その後もほとんど低下することなく、高い抗体価を維持し、長期間持続した。後者の5種類のワクチンはワクチン接種7~9週間後に抗体価は最高に達し平均1:7241~14482の抗体を産生して高い抗体産生能力を持つてはいるが、15週間後には平均1:226~905に低下して、抗体の持続性にとほしいことが認められた。

Krantzら³⁾もニジマス、ブラウンマスに*A. Salmonicida* 菌のホルマリンワクチンとホルマリンアジュバンドワクチンを腹腔に接種して、3カ月後に高い抗体が産生され、その抗体は後者において24カ月間持続したと報告している。又、木村²⁾はニジマスにイー・a-1菌(*A. Salmonicida* 類似菌)の加熱死菌ワクチンを接種して、5週間後に抗体価は最高に達し平均1:4096、その後徐々に低下するが、18週間後においても平均1:2048の抗体価を維持していたと報告している。

表2 各種のワクチンを接種したアマゴの抗体価の推移

Weeks 区	1 ※	3	5	7	9	11	13	15
1	80~320 ^{***}	1280	2560	5120	~20480 ~40960	5120~ 10240	2560~ 10240	2560
	160 ^{***}	1280	2560	5120	28960	7241	5120	2560
2	40~320	640~ 1280	2560~ 10240	10240 ~20480	~1280 ~10240	1280 ~5120	640~ 2560	320 ~640
	113	905	5120	14482	3620	2560	1280	453
3	40~160	320~ 1280	1280	10240	~10240 ~20480	5120~ 20480	5120	640 ~1280
	80	640	1280	10240	14482	10240	5120	905
4	80~320	640~ 1280	1280~ 2560	5120 ~20480	40960	10240~ 40960	10240~ 40960	40960
	160	905	1810	10240	40960	20480	20480	40960
5	80~160	320~ 1280	1280~ 2560	5120 ~10240	1280 ~5120	640~ 1280	320 ~640	320 ~1280
	80	640	1810	7241	2560	905	453	640
6	40~320	320~ 1280	2560~ 5120	5120 ~10240	2560 ~5120	1280	320~ 1280	320 ~640
	113	640	3620	7241	3620	1280	640	453
7	40~160	640~ 1280	1280~ 2560	~2560 ~5120	5120 ~10240	640~ 1280	320 ~640	160 ~320
	80	905	1810	3620	7241	905	453	226
8	20~40	20~40	20~80	20~40	20~80	20~80	20~40	20~40
	28	28	40	28	40	40	28	28
平均 水温	11.3 °C	11.6 °C	11.9 °C	12.3 °C	13.8 °C	16.0 °C	17.9 °C	18.1 °C

※ 第1回目ワクチン接種後 ※※ 抗体価範囲 (1:) ※※※ 平均抗体価 (1:)

1区 ホルマリンワクチン

5区 エチルエーテルワクチン

2区 マーゾニンワクチン

6区 クロロホルムワクチン

3区 フェノールワクチン

7区 エチルアルコールワクチン

4区 ホルマリンアジュバンドワクチン

8区 Control (食塩水)

次に水温と抗体形成・持続性との関係は、魚類の抗体は水温が低くすぎると形成されに

く、高すぎると形成された抗体が早く失われるといわれている。川津⁴⁾はマス類の抗体形成の適温は10～15℃であり、抗体形成の速度は低温下ではおそく、一定の抗体価に達するまでに長期間を要するが、温度が高くなるにつれて早くなり、短期間で一定の抗体価に達すると述べている。本試験の場合も抗体形成の適温で試験を始めたため、水温の上昇と共に抗体価も上昇し、ワクチン接種7～9週間後に最高値に達している。が、その後水温が高くなって来たためか、形成された抗体が急速に失われるワクチンも見られた。しかしホルマリンアジュバンドワクチンとホルマリンワクチンは水温が高くなっても、抗体は急速に失われることなく、高い値を維持していた。

以上のことから、7種類のワクチンの中で、抗体の産生能力、抗体の持続性はホルマリンアジュバンドワクチンが最もすぐれていて、次がホルマリンワクチンであることが認められた。

(2) 攻撃試験による各種ワクチンの予防効果

攻撃試験によるワクチンの予防効果は表3に示すとおりである。ワクチン接種17週間後に各区の魚をすべて取り揚げ、各区そのうちの10尾について、一尾当り生菌を0.001mg筋注して攻撃した。その結果、各区の致死率はホルマリンワクチン区で40%、ホルマリンアジュバンドワクチン区で30%、マーゾニンワクチン区で70%クロロホルムワクチン区で80%、フェノールワクチン、エチールエーテルワクチン、エチールアルコールワクチン区、対照区では100%であった。これらの結果から、ワクチン接種17週間後においてもホルマリンアジュバンドワクチンとホルマリンワクチンは明らかに予防効果が認められたが、マーゾニンワクチン、クロロホルムワクチンは予防効果があまり期待出来ないし、フェノールワクチン、エチールエーテルワクチン、エチールアルコールワクチンは全く効果が認められなかった。又抗体価の低いワクチンでも、ゆるやかな自然感染ならワクチンの予防効果が期待出来るのではないかと考え、各区とも生菌接種魚と無接種魚を混養したが、その後無接種魚はほとんど発病せず、ワクチンの予防効果は判然としなかった。

Krantzら³⁾もマス類に*A. Salmonicida* 菌のホルマリンアジュバンドワクチンを接種して免疫した後、生菌で攻撃試験を行ない予防効果が認められたと報告している。又林¹⁾はユジマスにビブリオ菌のホルマリンワクチンを接種した後、生菌で攻撃試験を行ない顕著な予防効果が認められたと報告している。

以上のことから、アマゴのセッソウ病は、この疾病の流行期前にあらかじめホルマリンアジュバンドワクチンかホルマリンワクチンを腹腔に接種しておけば、十分予防することが可能である。実際、アユ養殖の裏作として、湖水、河川水を利用してアマゴ一年魚を秋から春まで飼育する場合、水温の高い早秋にホルマリンワクチンを接種しておけば十分セッソウ病を予防出来ると思われる。又アマゴ0年魚を秋から翌年の採卵期まで飼育する場合は、飼育期間も長くなり、冬の低水温期、夏の高水温期を越さねばならないので、抗体の持続性の高いホルマリンアジュバンドワクチンを接種する方がよいと思われる。

表3 ワクチンを接種したアマゴに対する生菌攻撃試験

区	尾 数														死亡率 %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	4.0
2	0	0	0	0	0	2	2	1	1	1	0	0	0	0	7.0
3	0	0	0	1	2	2	1	1	1	1	0	1	0	0	10.0
4	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3.0
5	0	0	0	2	2	2	1	2	1	0	0	0	0	0	10.0
6	0	0	0	0	2	2	2	1	0	0	0	1	0	0	8.0
7	0	0	0	2	1	1	2	2	1	1	0	0	0	0	10.0
8	0	0	0	3	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	10.0
水 海 C	17.6	17.8	17.6	18.0	18.9	18.2	18.0	18.0	18.3	18.9	18.4	18.0	18.9	18.3	17.6~18.9

※ 生菌接種後の経過日数 (5月23日~6月6日)

- 1区 ホルマリンワクチン
- 2区 マーゾニンワクチン
- 3区 フェノールワクチン
- 4区 ホルマリンアジュバントワクチン
- 5区 エチールエーテルワクチン
- 6区 クロロホルムワクチン
- 7区 エチールアルコールワクチン
- 8区 Control (食塩水)

3 要 約

- (1) 抗原処理方法の異なる7種類のワクチン〔単価 (滋賀)〕 を作成し、アマゴに接種して、各々のワクチンの抗体形成の推移を調べ、抗体の産生能力、抗体の持続性を検討した。
- (2) ホルマリンアジュバントワクチンはワクチン接種9週間後に抗体価は最高に達し平均1 : 40960と非常に高い抗体を産生し、その後もほとんど低下することなく高い抗体価を維持して、長期間持続した。
- (3) ホルマリンワクチンもワクチン接種9週間後に抗体価は最高に達し平均1 : 28960を産生し、15週間後においても平均1 : 2560を維持していた。
- (4) その他のワクチンはワクチン接種7~9週間後に抗体価は最高に達し、平均1 : 7241~14482を産生し、高い抗体産生能力を持ってはいるが、15週間後には平均1 : 226~905に低下して、抗体の持続性にとぼしい。

- (5) 7種類のワクチンの中で、ホルマリンアジュバントワクチンが抗体の産生能力、抗体の持続性とも最もすぐれていた。次がホルマリンワクチンであった。
- (6) 免疫したアマゴに生菌を接種して攻撃試験を行ない、各々のワクチンの予防効果を検討した。各々のワクチン接種区の死亡率はホルマリンアジュバントワクチン区で30%、ホルマリンワクチン区で40%、マーズニンワクチン区で70%、クロロホルムワクチン区で80%、フェノールワクチン区、エチールエーテルワクチン区、エチールアルコールワクチン区、対照区で100%であり、明らかに、ホルマリンアジュバントワクチンとホルマリンワクチンは予防効果が認められた。
- (7) 以上のことからセッソウ病の流行期前に、あらかじめホルマリンアジュバントワクチンか、ホルマリンワクチンを腹腔に接種しておけば、十分セッソウ病を予防することが、可能であると思われる。

4 文 献

- 1) 林孝市郎・小林茂雄・鎌田淡紅郎・尾崎久雄：ニジマスのピブリオ病に関する研究。II—ワクチンの予防効果、
三重県立大学水産学部紀要。 6 (2) . P. 181~191. 1964.
- 2) 木村喬久：催熱蓄養中のサクラマスならびにカラフトマス親魚に発生した細菌性疾病に関する研究、北海道さけますふ化場研究報告, 24. P. 9~100. 1969.
- 3) G. E. Krantz, J. M. Reddecliff and E. Heist : Immune response of trout to *Aeromonas salmonicida*, Part I, Development of agglutinating antibodies and protective immunity.
Prog. Fish -- Cult. 26, P3~10. 1964
- 4) 川津浩嗣：魚類の免疫反応。日水誌。34 (3) . P 246~250. 1967
- 5) 医科学研究所学友会編：細菌学実習提要。丸善。東京。1968.
- 6) 第2回セッソウ病研究会資料 プリント。1971.
- 7) 第3回セッソウ病研究会資料 プリント。1971.