

アユの細菌性出血性腹水病に対する浸漬ワクチンの予防効果

二宮浩司・山本充孝

Efficacy of Bath-vaccination against Bacterial Hemorrhagic Ascites in Ayu, *Plecoglossus altivelis*

Koji Ninomiya and Michitaka Yamamoto

To develop the vaccine against Bacterial Hemorrhagic Ascites(BHA) caused by *Pseudomonas plecoglossicida* in cultured Ayu, *Plecoglossus altivelis*, efficacy of experimental bath vaccination was investigated. The artificial challenge with virulent *P. plecoglossicida* was carried out after bath vaccination. The level of protection was determined by the survival of fish after challenge.

Regularly high protection was not observed in fish immunized by bath vaccination with 100 times diluted vaccine for 10-15 min, that correspond to administration method of a commercial vibrio vaccine.

Similarly, high protection was not observed regularly in fish immunized by bath vaccination with 1000 times diluted vaccine for 24h(prolonged immersion), which was expected in better protection than the above method.

In fish immunized by bath vaccination both with 100 times diluted vaccine for 10-15 min and with 1000 times diluted vaccine for 24h, the relative percent survival(RPS) value has decreased 4-6 weeks after vaccination. This suggests that the retention period of protection is short.

The RPS value of one time administration of bath vaccination has decreased 4-6 weeks after vaccination. However, when vaccines were administered two times, the RPS had not decreased. This result suggests that effect of booster appear.

キーワード：細菌性出血性腹水病、浸漬ワクチン、アユ

アユの細菌性出血性腹水病¹⁾は、グラム陰性短かん菌の *Pseudomonas plecoglossicida*²⁾が原因の細菌感染症で、近年、アユ養魚場において冷水病とともに主要な疾病となっている³⁾。主な症状は、血液の混じった腹水の貯溜と鰓の軽い貧血であり、その他、内臓に点状出血や、肛門に出血を生じるものも多い。

本菌は、薬剤に対してほとんど感受性を示さず、化学療法剤による治療は困難である。そのため、本疾病の予防を目的としたワクチンの開発が望まれている。アユの本疾病に対するワクチン試験は、1995年に長野県水産試験場佐久支場で初めて実施され、浸漬法および注射法によるホルマリン不活化ワクチンの有効性が報告されている⁴⁾。以来、全国湖沼河川養殖研究会のアユ冷水病研究部会において、浸漬法および注射法

によるホルマリン不活化ワクチンの開発が進められてきた。

本報告では、平成9年度から平成11年度にかけてアユの細菌性出血性腹水病に対するワクチン開発の基礎資料を得るため、当场が実施した最も実用的な方法である浸漬ワクチンによる有効性実証試験の結果を報告する。

なお、本研究は、アユ冷水病研究部会の連絡試験として実施したものである。

材料および方法

平成9年度から平成11年度にかけて表1に示すように浸漬法によるワクチンの有効性実証試験を8回実

表1-1 ワクチン試験の実施要領 (試験1~4)
Table 1-1. Condition of the experiment (Test 1~4)

Item	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
Weight of Fish (g)	7.1	3.9	5.1	5.1
Number of fish (fish)	80	430	120	200
Vaccination (dilution times of vaccine, immersion time)	·100, 10 min ·1000, 10 min ·10000, 10 min	·100, 10 min	·100, 15 min* ·100, 15 min* ·1000, 24 hrs	·100, 10 min
Temp. at vaccination time (°C)	18.0	19.4	18.7 (15 min) 16.2-18.6 (24 hrs)	19.3
Days from vaccination to challenge (d)	14	16	21, 30, 44	15, 29, 44
Dose (CFU/fish)	2.4×10^3	3.2×10^2	2.0×10^2 (21 day) 1.9×10^2 (30 day) 8.1×10^1 (44 day)	1.9×10^2 (15 day) 8.1×10^1 (29 day) 2.5×10^2 (44 day)
Period of challenge test (d)	14	11	14 (21 day) 14 (30 day) 12 (44 day)	14 (15 day) 12 (29 day) 14 (44 day)

* : Vaccine was administered two times at 16 days intervals by the same method.

施した。

1. 供試魚

当場で飼育されていた平均体重3.0~26.9 gの湖産アユをそれぞれの試験に供した(表1)。試験に供するまで約2週間予備飼育を行ったが、その間、健康状態は良好であった。

2. 供試ワクチン

1994年に滋賀県のアユ病魚腎臓から分離した*P. plecoglossicida* FPC941株を用いて共立商事株式会社中央研究所が試作したホルマリン不活化ワクチンをワクチン原液として使用した。試験1~2に使用したワクチン原液の不活化前生菌数は 1.7×10^{10} CFU/ml、試験3~7では 2.3×10^{10} CFU/ml、試験8では 1.5×10^{10} CFU/mlであった。また、各ワクチンの不活化ホルマリン濃度は全て0.8%であった。上記ワクチン原液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てそれぞれの試験に供した(表1)。

3. ワクチンの投与方法

各試験において表1に示すようなワクチン投与群を設定した。通気しながら供試魚を使用ワクチン液に所定時間浸漬した。試験3を除く他の試験ではワクチンの投与回数は1回とした。試験3では、1回目のワクチン投与後16日目に再度1回目と同様な方法で2回目のワクチン投与を行う試験群を設定した。ワクチン投与時の水温は、表1に示すとおりである。対照群は、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処理と同様とした。ただし、試験7および8の場合の対照群には無処理魚を用いた。ワクチン投与後、

表1-2 ワクチン試験の実施要領 (試験5~8)
Table 1-2. Condition of the experiment (Test 5~8)

Item	Test 5	Test 6	Test 7	Test 8	
Weight of Fish (g)		11.6	15.7	26.9	3.0
Number of fish (fish)		110	60	50	213-230
Vaccination (dilution times of vaccine, immersion time)	·100, 10 min ·1000, 24 hrs ·10000, 24 hrs	·100, 10 min	·100, 10 min	·100, 10 min	·100, 10 min ·1000, 24 hrs
Temp. at vaccination time (°C)	20.2 (10 min) 20.3-21.3 (24 hrs)		19.3	19.9	19.6 (10 min) 19.6-20.4 (24 hrs)
Days from vaccination to challenge (d)		15, 30	13	13	21
Dose (CFU/fish)	7.8×10^1 (15 day) 2.4×10^2 (30 day)	1.3×10^2	2.8×10^2	7.8×10^2	
Period of challenge test (d)	12 (15 day) 11 (30 day)		8	10	14

各試験群を試験1から7の場合は $1.3 \times 0.8 \times 0.5$ mlのコンクリート製水槽に、試験8の場合は500 l FRP製円形水槽に収容し、配合飼料を投与して流水で飼育した。飼育水は地下水を使用し、換水率は約12回/日であった。給餌は自動給餌器を使用して魚体重の1.5~2.5%を与えた。ワクチン投与後、所定期間飼育した後、人為攻撃試験に供した。

4. 人為攻撃試験

ワクチン投与後所定期間経過した後、注射攻撃を行い、ワクチンの有効性を判定した。試験1から7の場合は、1996年に滋賀県のアユ病魚腎臓から分離した*P. plecoglossicida* SG960118B株 (API20NE数値プロファイル1-140-457) を、試験8の場合はワクチン原液の作製に用いられた*P. plecoglossicida* FPC941株をそれぞれ供試攻撃菌として用いた。魚体通過を1回した後、 -90°C で凍結保存していた供試菌株をハートインビュージュン寒天培地(日水)で 25°C 、24~48時間培養後集菌し、滅菌生理食塩水に懸濁して攻撃菌液とした。生菌の濃度を表1に示すように 10^1 CFU~ 10^2 CFU/尾になるように調整し、0.1 ml腹腔内に接種した。各試験群の供試尾数は20~30尾とした。攻撃後は供試魚を450 cm × 300 cm × 300 cmあるい600 cm × 300 cm × 360 cmのアクリル製水槽に収容して、8~14日間飼育観察し(水温 $18.5 \sim 20.7^\circ\text{C}$)、死亡魚を計数するとともに、ハートインビュージュン寒天培地を用いて死亡魚の細菌検査を行い、細菌性出血性腹水病による死亡か否かを判定した。

5. ワクチンの有効性の評価

細菌性出血性腹水病以外による死亡数を除き、次の計算式から有効率(RPS: Relative percent survival)⁹⁾

アユの細菌性出血性腹水病に対する浸漬ワクチンの予防効果

表2-1 攻撃後のアユの死亡率および有効率 (試験1~4)
Table 2-1. Mortality and relative percent survival(RPS) values in Ayu after challenges(Tests1-4)

Conditions	Number of used fish (fish)	Mortality (fish)	Mortal. rate(%)	RPS(%)	Fisher's exact probability test
(Test 1)					
Cont.	26	15	57.7	—	—
100 times dilutions-10 min	20	2	10.0	82.7	0.001
1000 times dilutions-10 min	26	6	23.1	60.0	0.012
10000 times dilutions-10 min	27	7	25.9	55.1	0.019
(Test 2)					
Cont.	21	15	71.4	—	—
100 times dilutions-10 min	20	15	75.0	0.0	—
(Test 3 : Challenge of 21 day)					
Cont.	24	15	62.5	—	—
100 times dilutions-15 min	24	10	41.7	33.3	0.124
100 times dilutions-15 min*	22	8	36.4	41.8	0.070
1000 times dilutions-24 hrs	25	11	44.0	29.6	0.157
(Test 3 : Challenge of 30 day)					
Cont.	23	17	73.9	—	—
100 times dilutions-15 min	23	9	39.1	47.1	0.018
100 times dilutions-15 min*	22	11	50.0	32.4	0.089
1000 times dilutions-24 hrs	22	11	50.0	32.4	0.089
(Test 3 : Challenge of 44 day)					
Cont.	21	17	81.0	—	—
100 times dilutions-15 min	24	15	62.5	22.8	0.151
100 times dilutions-15 min*	22	9	40.9	49.5	0.009
1000 times dilutions-24 hrs	18	13	72.2	10.8	0.395
(Test 4 : Challenge of 15 day)					
Cont.	25	21	84.0	—	—
100 times dilutions-10 min	25	8	32.0	61.9	<0.001
(Test 4 : Challenge of 29 day)					
Cont.	24	20	83.3	—	—
100 times dilutions-10 min	24	13	54.2	35.0	0.030
(Test 4 : Challenge of 44 day)					
Cont.	25	21	84.0	—	—
100 times dilutions-10 min	25	17	68.0	19.0	0.160

* : Vaccine was administered two times at 16 day intervals by the same method.

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。

有効率(%)=[1-(ワクチン群死亡率/対照群死亡率)]×100

結 果

一連の試験結果は表2に示したとおりである。

(試験1)

いずれのワクチン群とも死亡率は対照群より少なかった。各ワクチン群の有効率は、100倍希釈・10分間・1回群(使用ワクチンの原液からの希釈倍率・処理時間・処理回数をそれぞれ示す。)で82.7%、1000倍希釈・10分間・1回群で60.0%、10000倍希釈・10分間・1回群で55.1%となった。また、Fisherの直接確率計算法によると、それぞれP=0.001、0.012、0.019となった。

(試験2)

対照群とワクチン群(100倍希釈・10分間・1回)の死亡率に差はなく、ワクチンの有効性は認められなかった。

(試験3)

①ワクチン投与後21日目の攻撃試験

いずれのワクチン群とも死亡率は対照群より少なかっ

表2-2 攻撃後のアユの死亡率および有効率 (試験5~8)
Table 2-2. Mortality and relative percent survival(RPS) values in Ayu after challenges(Tests5-8)

Conditions	Number of used fish (fish)	Mortality (fish)	Mortal. rate(%)	RPS(%)	Fisher's exact probability test
(Test 5 : Challenge of 15 day)					
Cont.	24	12	50.0	—	—
100 times dilutions-10 min	25	8	32.0	36.0	0.161
1000 times dilutions-24 hrs	21	2	9.5	81.0	0.004
10000 times dilutions-24 hrs	23	12	52.2	0.0	—
(Test 5 : Challenge of 30 day)					
Cont.	24	18	75.0	—	—
100 times dilutions-10 min	23	16	69.6	7.2	0.464
1000 times dilutions-24 hrs	25	12	48.0	36.0	0.050
(Test 6)					
Cont.	25	20	80.0	—	—
100 times dilutions-10 min	25	13	52.0	35.0	0.036
(Test 7)					
Cont.	24	17	70.8	—	—
100 times dilutions-10 min	22	14	63.6	10.2	0.419
(Test 8)					
Cont.	26	22	84.6	—	—
100 times dilutions-10 min	28	11	39.3	53.6	<0.001
1000 times dilutions-24 hrs	27	14	51.9	38.7	0.012

た。各ワクチン群の有効率は、100倍希釈・15分間・1回群で33.3%、100倍希釈・15分間・2回群で41.8%、1000倍希釈・24時間・1回群で29.6%となった。また、Fisherの直接確率計算法によると、それぞれP=0.124、0.070、0.157となった。

②ワクチン投与後30日目の攻撃試験

いずれのワクチン群とも死亡率は対照群より少なかった。各ワクチン群の有効率は、100倍希釈・15分間・1回群で47.1%、100倍希釈・15分間・2回群で32.4%、1000倍希釈・24時間・1回群で32.4%となった。また、Fisherの直接確率計算法によると、それぞれP=0.018、0.089、0.089となった。

③ワクチン投与後44日目の攻撃試験

いずれのワクチン群とも死亡率は対照群より少なかった。各ワクチン群の有効率は、100倍希釈・15分間・1回群で22.8%、100倍希釈・15分間・2回群で49.5%、1000倍希釈・24時間・1回群で10.8%となった。また、Fisherの直接確率計算法によると、それぞれP=0.151、0.009、0.395となった。

(試験4)

①ワクチン投与後15日目の攻撃試験

ワクチン群(100倍希釈・10分間・1回)の死亡率は対照群より少なく、有効率は、61.9%となった。また、Fisherの直接確率計算法によると、P<0.001となった。

②ワクチン投与後29日目の攻撃試験

ワクチン群(100倍希釈・10分間・1回)の死亡率は対照群より少なく、有効率は、35.0%となった。また、Fisherの直接確率計算法によると、P=0.030と

なった。

③ワクチン投与後44日目の攻撃試験

ワクチン群 (100倍希釈・10分間・1回) の死亡率は対照群より若干少なく、有効率は、19.0%となった。また、Fisherの直接確率計算法によると、 $P = 0.160$ となった。

(試験5)

①ワクチン投与後15日目の攻撃試験

10000倍希釈・24時間・1回群では対照群と死亡率に差がなかったが、その他の2つのワクチン群の死亡率は対照群より少なかった。有効率は100倍希釈・10分間・1回群で36.0%、1000倍希釈・24時間・1回群で81.0%となった。また、Fisherの直接確率計算法によると、それぞれ $P = 0.161$ 、 0.004 となった。

②ワクチン投与後30日目の攻撃試験

両ワクチン群ともに死亡率は対照群より少なかった。有効率は100倍希釈・10分間・1回群で7.2%、1000倍希釈・24時間・1回群で36.0%となった。また、Fisherの直接確率計算法によると、それぞれ $P = 0.464$ 、 0.050 となった。

(試験6)

ワクチン群 (100倍希釈・10分間・1回) の死亡率は対照群より少なく、有効率は、35.0%となった。また、Fisherの直接確率計算法によると、 $P = 0.036$ となった。

(試験7)

ワクチン群 (100倍希釈・10分間・1回) の死亡率は対照群より若干少ないだけで、有効率は10.2%となった。また、Fisherの直接確率計算法によると、 $P = 0.419$ となった。

(試験8)

いずれのワクチン群とも死亡率は対照群より少なかった。各ワクチン群の有効率は、100倍希釈・10分間・1回群で53.6%、1000倍希釈・24時間・1回群で38.7%となった。また、Fisherの直接確率計算法によると、それぞれ $P = 0.001$ 、 0.012 となった。

考 察

図1に示すように、100倍希釈・10~15分間・1回処理におけるワクチン処理後2~3週目の有効率は0.0~82.7% (平均39.1%) であった。有効率が、ピブリオ病ワクチン開発の際の有効性の判定基準¹⁰⁾であった60%を超えたのは8例中2例のみであった。また、統計的に有意差 (危険率5%) があったのは8例中4例であった。このように、100倍希釈・10~15分間・1回処理は、現在普及しているピブリオ病ワクチンの低濃度長時間浴法に相当するものであるが、その処理法では予防効果は認められるものの、安定的に高い有効率を得ることは困難なものと考えられる。

上記投与方法より効果的な処理法を開発するため、1000倍希釈・24時間・1回処理による有効性実証試験を実施した。本投与方法は、浸漬時間を24時間といた、かなり長い時間に設定することで、魚体中に吸収される抗原量が増加し、予防効果が高まることを期待して行ったものである。ワクチン原液の希釈倍率が100倍の濃度の使用ワクチン液で予備試験を行ったところ、アユに遊泳異常や、へい死するものが現れたので、安全性を考慮して、希釈倍率1000倍の使用ワクチン液で試験を行った。結果は図1に示すとおりで、ワクチン投与後2~3週目の有効率は29.6~81.0% (平均49.8%) で、有効率が60%を超えたのは3例中1例のみであった。また、統計的に有意差があったの

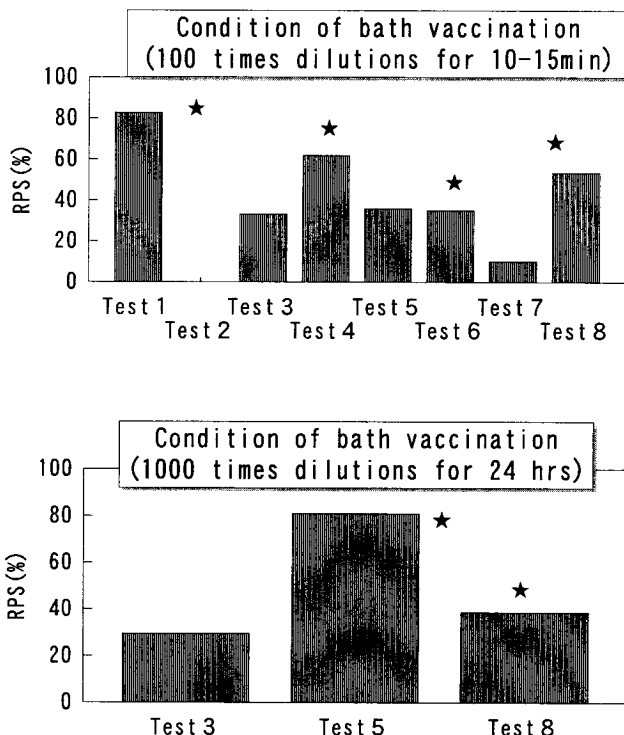


図1 アユの細菌性出血性腹水病に対する浸漬ワクチンの予防効果 (ワクチン処理後2~3週目に攻撃)

★: 対照群とワクチン群で有意差有り ($P < 0.05$)

Fig.1 Effect of bath vaccination against Bacterial Hemorrhagic Ascites(BHA) in Ayu. (Challenge were performed at 2-3 weeks after vaccination.)

★: significant difference ($P < 0.05$) between control fish and vaccinated fish

は3例中2例であった。したがって、より高い効果を期待して行った1000倍希釈・24時間・1回処理においても、ワクチンによる予防効果は認められるものの、安定的に高い有効率を得ることは困難なものと考えられる。また、前述の100倍希釈・10～15分間・1回処理と比較しても有効性に大きな差は認められなかった。

なお、有効率にばらつきがみられた原因としては、ワクチン投与時までの供試魚の飼育履歴の差異等様々なことが考えられるが、その詳細は不明である。

ワクチン効果の持続性を検討したのは、100倍希釈・10～15分間・1回処理では3例、1000倍希釈・24時間・1回処理では2例だったが、両投与方法のいずれの試験においても、4～6週目にかけて有効率は低下する傾向にあった(図2)。ピブリオ病ワクチンの場合では8～10週目においても効果が持続していたことから¹⁰⁾、今回のシュードモナス病ワクチンは、上記の両投与方法ともに、ピブリオ病ワクチンと比べて効果の持続期間は短いものと考えられる。

追加免疫の効果を検討したのは、試験3における1例のみだった(図3)。ワクチンの1回投与では4～6週目にかけて有効率は低下する傾向にあったが、2

回投与にすると、6週目になっても有効率は低下しなかった。Sukenda and Wakabayashi¹¹⁾は浸漬ワクチンの追加投与で感染防御免疫の持続期間が延びることを報告しているが、今回の結果はそれと一致するものと考えられる。

以上、今回実施した100倍希釈・10～15分間・1回処理や1000倍希釈・24時間・1回処理などの投与方法では、予防効果や効果の持続期間の点でピブリオ病ワクチンほどの有効性は認められなかった。そのため、今後は、さらに投与時間や投与回数またはワクチンの精製法等を、さらに検討する必要があるものと考えられる。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、指導および助言をいただいた日本大学生物資源科学部中西照幸教授および水産庁養殖研究所乙竹充免疫研究室長、さらに、ワクチンを提供していただいた共立商事株式会社中央研究所に深くお礼を申しあげる。

なお、本研究の一部は水産庁による水産用ワクチン推進事業費によって実施されたことを付記し、関係者に感謝する。

摘 要

養殖アユの*Pseudomonas plecoglossicida*に起因する細菌性出血性腹水病に対するワクチンの開発のため、浸漬法によるワクチンの有効性実証試験を実施した。ワクチン投与後に生菌による人為攻撃を行い、有効性の評価を行った。

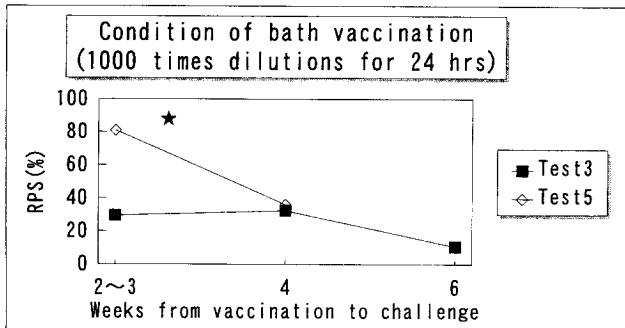
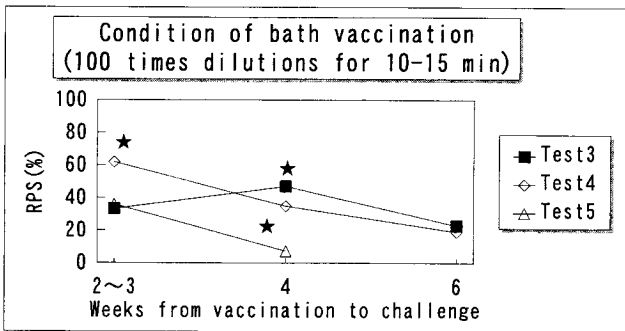


図2 アユの細菌性出血性腹水病に対する浸漬ワクチンの効果の持続性

★：対照群とワクチン群で有意差有り (P<0.05)

Fig.2 Retentivity of effect in the bath vaccination against BHA in Ayu.

★：significant difference (P<0.05) between control fish and vaccinated fish

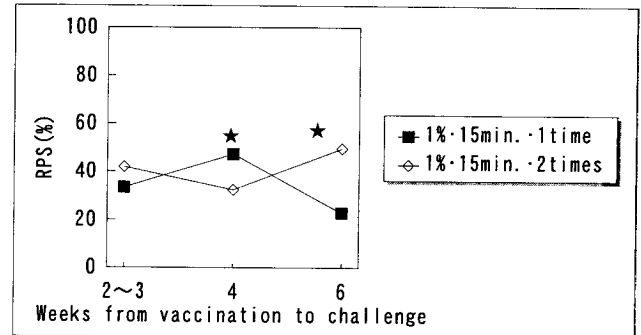


図3 アユの細菌性出血性腹水病に対する浸漬ワクチンの追加免疫の効果

★：対照群とワクチン群で有意差有り (P<0.05)

Fig.3 Effect of additional immunity in bath vaccination against BHA in Ayu.

★：significant difference (P<0.05) between control fish and vaccinated fish

ピブリオ病ワクチンの低濃度長時間浴法に相当する100倍希釈・10～15分間処理では、ワクチンによる予防効果は認められるものの、安定的に高い有効率を得ることはできなかった。

効果的な投与方法を開発するため実施した、1000倍希釈・24時間処理においても、ワクチンによる予防効果は認められるものの、安定的に高い有効率を得ることはできなかった。

100倍希釈・10～15分間処理および1000倍希釈・24時間処理ともに、4～6週目にかけて有効率は低下する傾向にあり、効果の持続期間は短いものだった。

ワクチンの1回処理では4～6週目にかけて有効率は低下する傾向にあったが、2回処理にすると、6週目になっても有効率は低下せず、追加免疫の効果が認められた。

文 献

- 1) 若林久嗣・沢田健蔵・二宮浩司(1996) : シュードモナス属細菌によるアユの細菌性出血性腹水病, 魚病研究雑誌, 31(4), 239-240.
- 2) Nishimori, E., K.Kita-Tsukamoto and H. Wakabayashi(2000): *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50(1).
- 3) 二宮浩司・里井晋一・太田豊三(1995) : 養殖水産動物保健対策推進事業, 平成6年度滋賀県水産試験場事業報告, 98-99.
- 4) 二宮浩司・里井晋一・太田豊三(1996) : 養殖水産動物保健対策推進事業, 平成7年度滋賀県水産試験場事業報告, 104-105.
- 5) 二宮浩司・吉岡 剛(1997) : 養殖水産動物保健対策推進事業, 平成8年度滋賀県水産試験場事業報告, 96-97.
- 6) 山本充孝・二宮浩司(1998) : 養殖水産動物保健対策推進事業, 平成9年度滋賀県水産試験場事業報告, 73-74.
- 7) 山本充孝・二宮浩司(1999) : 養殖水産動物保健対策推進事業, 平成10年度滋賀県水産試験場事業報告, 46-47.
- 8) 沢本良宏(1997) : アユに対するホルマリン不活化抗原によるシュードモナス症の免疫付与試験, 平成7年度長野県水産試験場事業報告, 41.
- 9) Croy and Amend(1977): Immunization of sockeye salmon(*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique, *Aquaculture*, 12, 317-325.
- 10) 全国湖沼河川養殖研究会ピブリオ病研究部会(1983) : アユのピブリオ病(ピブリオ病研究部会昭和51～56年度のとりまとめ), 全国湖沼河川養殖研究会ピブリオ病研究部会部会報告第4号, 7-15.
- 11) Sukenda and H.Wakabayashi(1999): Immersion immunization of Ayu(*Plecoglossus altivelis*) with *Pseudomonas plecoglossicida* Bacterin, *Fish Pathology*, 34(3), 163-164.