

## 9) 魚病対策技術開発研究－Ⅲ

### (アユの冷水病に対する浸漬ワクチンの予防効果-ワクチン作製法の検討-)

二宮浩司・山本充孝

【目的】アユの冷水病は、投薬や加温処理で治療効果のあることが既に確認されているが、治療後しばらくして再発することが多く、ワクチンの開発が望まれている。魚類ワクチンの投与方法には注射法、浸漬法、経口投与方法などがあるが、本県アユ漁業の場合は一度に大量かつ小型サイズの魚に適用可能な浸漬ワクチンの開発が特に重要である。そこで、安定的に高い有効率が得られる浸漬ワクチンの投与技術を確立するため、作製法（不活化条件）の異なる数種のワクチンを用いた浸漬法による有効性実証試験を実施した。

#### 【方法】

1. ワクチン原液の作製：冷水病原因菌（SG990302株）を2500mLの改変サイトファーガ液体培地で15℃、3日間培養した。培養液の内、1000mLはホルマリンを0.3%添加したほか、残りの1500mLを3等分し、それぞれに対して、50℃の24時間加熱、121℃の15分間加熱および過酸化水素水（30%含有率）の1000ppmの添加を行い、菌を死滅させた。上記培養液をそれぞれホルマリン死菌（不活化）ワクチン、50℃加熱死菌ワクチン、121℃加熱死菌ワクチンおよび過酸化水素死菌ワクチンとした。各ワクチンともに不活化前生菌数は $3.5 \times 10^8$ CFU/mlで使用時まで5℃で保存した。
2. 有効性実証試験：平均体重4.7gの湖産アユを試験に供した。ワクチンの投与については、ホルマリン群、50℃加熱群、121℃加熱群、過酸化水素群およびビブリオ病ワクチン添加群の5つのワクチン投与群を設定した。ホルマリン群ではホルマリン死菌ワクチンを、50℃加熱群では50℃加熱死菌ワクチンを、121℃加熱群では121℃加熱死菌ワクチンを、過酸化水素群では過酸化水素死菌ワクチンをそれぞれ地下水で10倍希釈し、その中で供試魚を通気しながら2分間浸漬した（水温16.4～16.8℃）。一方、ビブリオ病ワクチン添加群ではホルマリン死菌ワクチンとビブリオ病不活化ワクチン（市販品）を等量混合したものを地下水で5倍希釈し、供試魚を2分間浸漬した（水温16.2℃）。対照群は無処理とした。各群の供試尾数は100尾とした。ワクチン投与後、攻撃試験を行うまで地下水による流水飼育を行った（水温16.9～17.3℃）。ワクチン投与後12日目に各ワクチン投与群と対照群に対して攻撃試験を行った。攻撃は自然感染によるアユ冷水病発病群の飼育排水を各実験群に導入することにより行った。攻撃試験の供試尾数は各群36尾とした。攻撃試験の期間は13日間とし、その間の飼育水温は16.1～16.7℃であった。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統計処理を行い、ワクチンの予防効果を評価した。

$$\text{有効率 (\%)} = [1 - (\text{ワクチン投与群死亡率} / \text{対照群死亡率})] \times 100$$

【結果】各群の死亡率は、対照群で75.0%、ホルマリン群で62.9%、50℃加熱群で57.1%、121℃加熱群で55.9%、過酸化水素群で61.1%、ビブリオ病ワクチン添加群で55.9%であった。全てのワクチン投与群で死亡率は、対照群のそれと比較して減少したが、いずれも統計学的に有意差はなかった（ $P > 0.05$ ）（図1）。有効率は、ホルマリン群で16.2%、50℃加熱群で23.8%、121℃加熱群で25.5%、過酸化水素群で18.5%、ビブリオ病ワクチン添加群で25.5%であり、いずれのワクチン投与群とも高い有効率を得ることはできなかった。攻撃試験における死亡状況からワクチン投与群間の効果を比較すると、若干、50℃加熱群、121℃加熱群、過酸化水素群およびビブリオ病ワクチン添加群がホルマリン群より効果的であった。現在の冷水病ワクチン試験では主にホルマリン死菌ワクチンが用いられているが、50℃や121℃の加熱死菌ワクチンや過酸化水素死菌ワクチンを用いたり、ビブリオ病ワクチンを添加することで、いくぶんかワクチン効果が高まる可能性が示唆された。

【成果の活用】引き続き、十分な予防効果が得られる浸漬ワクチンを開発するため、ワクチンの作製法等の検討を行う必要がある。

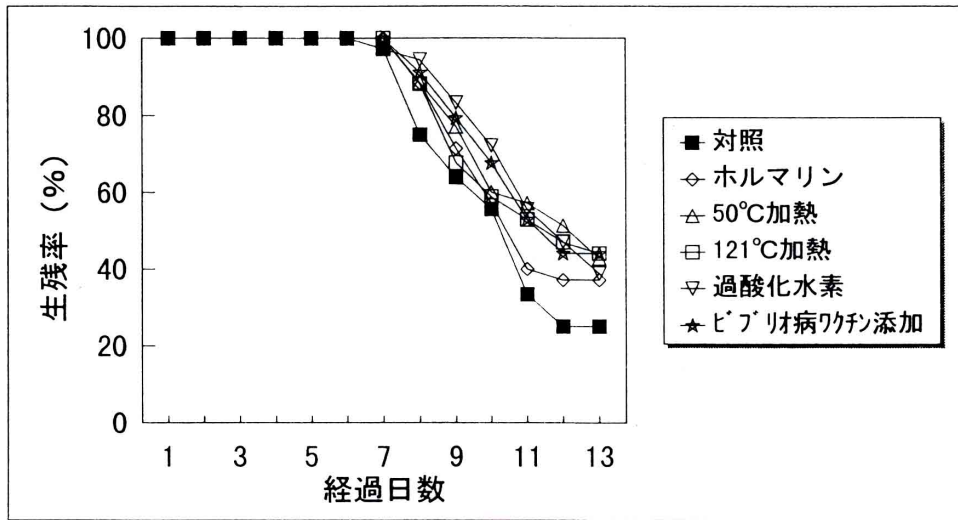


図1. 浸漬ワクチンで免疫したアユの攻撃試験における生残率の推移 (ワクチンの作製法等の検討)