

アユ冷水病ワクチンの検討 (1/2CGY 液体培地に Ca を添加したワクチン)

岡村 貴司

1. 目的

現在、アユ冷水病ワクチンの実用化に向けて、より効果を高めることが求められている。

冷水病菌が産生するプロテアーゼ (タンパク質分解酵素) も抗原となりうると考えられ、1/2CGY 液体培地にカルシウム (Ca) を添加することによってプロテアーゼの活性が高まることが確認された。^{1),2)}

このため、より効果の高いワクチンを作製することを目的として、プロテアーゼ活性を高めたワクチンについての検討を行った。

2. 方法

冷水病に対する免疫が付与されていないアユを、2 倍希釈した下記の試作ワクチンに 5 分間浸漬させた。その 14 日後に培養した冷水病菌 (PH0424) に浸漬させて人為的に冷水病に感染させ、14 日間の生残を確認した。対照区としてワクチン無処理の試験区を設けた。効果の確認は、3 回の繰り返し試験を行った。

試作ワクチンの作製：Ca 5mM を添加した 1/2CGY 液体培地で冷水病菌 (PH0424) を 24 時間培養した後、同組成の新たな培地により 44 時間培養した。その後、ホルマリンを 0.1% 添加して、その 24 時間後にワクチン処理に用いた。試作ワクチンの O.D.₆₆₀ は、1 回目の Ca 無添加区が 0.630、Ca 添加区が 0.586、2 回目の Ca 無添加区が 0.481、Ca 添加区が 0.493、3 回目の Ca 無添加区が 0.481、Ca 添加区が 0.493 であった。

浸漬感染時の菌濃度は、1 回目が 6.1×10^7 CFU/ml、2 回目が 1.4×10^8 CFU/ml、3 回目が 2.5×10^7 CFU/ml であった。

試作ワクチン中のプロテアーゼ活性の測定については前報²⁾に従って実施した。

3. 結果

図 1 に浸漬感染によって得られた結果を有

効率 (相対生残率、計算式：(1 - 試験区の死亡率 / 対照区 [ワクチン処理なしの試験区] の死亡率) × 100) で示す。

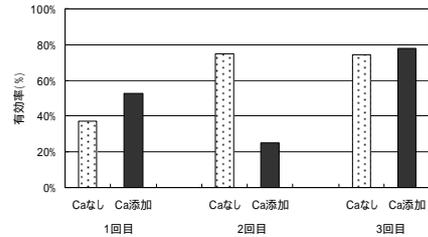


図 1. Ca を添加したワクチンの有効率

1 回目の試験では Ca 無添加のワクチンよりも有効率が高くなったが、53%と低い値であった。2 回目は有効率が低くなり、3 回目はほぼ同様の有効率であった。

次に、Ca 無添加および Ca 1mM、Ca 5mM を添加して作製したワクチンについて、ホルマリン添加直前および添加 24 時間後のプロテアーゼ活性を測定したところ、いずれの区においてもホルマリンの添加によりプロテアーゼ活性 (O.D.₄₂₀) が低下した (図 2)。

ホルマリンによりプロテアーゼ活性が低下したため、ホルマリン添加濃度を 0.05% としたワクチンを作製したが Ca 無添加のワクチンより有効率が低くなった (データ未提示)。

これらのことからワクチン作製にあたり、ホルマリンによる不活化を前提とする限りプロテアーゼをワクチンに活用することは難しいと考えられる。

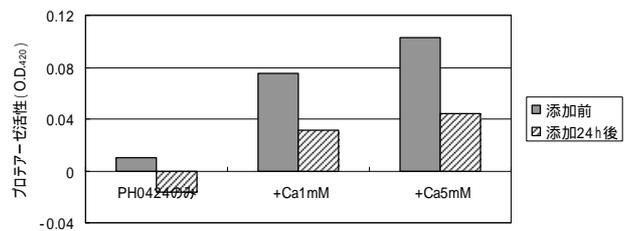


図 2. ホルマリン添加前後のプロテアーゼ活性