

アユ冷水病ワクチンの予防効果が発現する時期

原 日出夫

Time required for developing protective immunity
against coldwater disease in cultured Ayu,
Plecoglossus altivelis altivelis,
after vaccination.

Hideo HARA*

はじめに

アユ *Plecoglossus altivelis altivelis* は内水面漁業および養殖業において重要な魚種であるが、近年アユ冷水病が全国的にまん延し¹⁾、本県においてはアユの魚病診断件数の7割以上を占めており²⁾、その対策が求められている。本病は *Flavobacterium psychrophilum* を原因菌とする細菌性疾病である³⁾。投薬等による完治が難しく、症状が著しい場合は生残しても体表に穴あき等を呈し商品価値が低下するため予防対策としてワクチンの開発が進められてきた。現在、アジュバント添加注射ワクチンの効果は実用化レベルに至っているが^{4,5)}、アジュバントの魚体内への長期残留問題や接種に手間がかかること等から、養殖現場ではより簡易なワクチン投与方法の開発が求められている。簡易な投与方法として経口ワクチンの開発が期待されている。当初、経口ワクチンは胃においてワクチンが変性して効果が低いとされていたが、腸溶解性のマイクロカプセル (MC) にアユ冷水病ワクチンを内包することによって、ある程度の予防効果が得られた⁶⁾。現在、実用化に向けてMCの量産、最小有効抗原量、持続期間および安全性などについて検討が進められている^注。これまでの研究において、注射ワクチン^{4,5)}および経口ワクチン⁶⁾ともにワクチン投与完了から14日後には予防効果が確認されているが、予防効果の発現時期については明らかでない。この発現時期が把握できれば、河川放流や養殖用として出荷される日を考慮した計画的なワクチン投与が可能となる。このため本報では、量産MCを用いた経口ワクチンの予防効果の発現時期を解明するため飼育下で攻撃試験を実施し、注射ワクチンと比較検討したので報告する。

材料および方法

試験1

供試魚

神奈川県水産技術センター内水面試験場 (以下「試験場」と記す)において継代(28代)飼育された親魚から、

2005年9月に採卵し、養成したアユ(平均体重0.9g)を各試験区500尾用いた。

ワクチン原液

広島県でアユから分離された冷水病菌PH0424株を馬血清に懸濁し、50 μ Lづつ小分けにして-80 で凍結保存したものを用いた(保存菌液)。培養方法は保存菌液を200mLの1/2CGY培地(カシトン2.5g,ゼラチン1.5g,酵母エキス0.5g,水1L, pH7.2)が入った500mLの三角フラスコに接種し、15, 24時間, 150rpmで振盪培養し(前培養), 前培養液25mLを1200mLの1/2CGY培地が入った2000mLの三角フラスコに接種し, 前培養と同様の条件で24時間培養した(本培養)。本培養後, 外割で0.3%ホルマリンを添加・攪拌後, 24時間静置してワクチン原液(FKB:不活化前生菌数 1.0×10^8 CFU/mL)を作製した。FKBを5000rpm, 20分間遠心分離し, ベレットを1/20量の上清に再懸濁して濃縮ワクチン原液(濃縮FKB)を作製した。なお, これらは(独)水産総合研究センター養殖研究所より提供いただいた。

注射ワクチン

濃縮FKBとオイルアジュバント(セピック社製, ISA-763A)を3対7の容積比でルアーロック式ガラスシリンジを用いて混合して作製した。アユをオイゲノール(田辺製薬株製, FA100)で麻酔し, 腹鰭基部前方から腹腔内に1尾あたり25 μ L接種した。

経口ワクチン

濃縮FKBと水溶性アジュバント(セピック社製, Montanidae IMS 1312)(以下「IMS」と記す)を2対8の割合で混合し(IMS添加濃縮FKB), 既報⁷⁾に準じてMCに内包した。ただし, MC量産のため乳化剤(第一工業製薬株製, DKエステルF-10)0.1%添加流動パラフィン1500mL, IMS添加濃縮FKBを100mL, 膜液(酢酸フタル酸セルロース40g, アセトン400mL, フタル酸酢酸ジエチル12gおよびエタノール40mLで作製)120mLを添加した, 硬化剤はクロロホルムを500mLとした。なお, この量産MCは(独)水産総合研究センター養殖研

2007. 2. 7 受理 神水セ業績No.06-25

脚注* 内水面試験場

注:先端技術を活用した農林水産高度化事業「アユ冷水病の実用的ワクチン開発」平成18年度研究推進会議資料

究所より提供いただいた。MCの投与量および投与期間は、1日当たり魚体重1kg当たりMCを2gとして10日間投与した。ワクチン餌は、規定量のMCを魚体重の1%の配合飼料(大洋飼料㈱製、あゆっ子2号)に混合し、配合飼料の10%のサラダオイルで添着させて作製した。

試験区の設定

試験区は、無処理対照区、注射ワクチン区および経口ワクチン区の3区を設定した。試験期間は2006年5月9日から2006年6月15日までとした。無処理対照区は、配合飼料を魚体重の3.0%給餌した。注射ワクチン区は、5月18日に注射ワクチンを1回接種した。接種の前日および接種3日後までは無給餌とし、それ以外は無処理対照区と同様に給餌した。経口ワクチン区は、ワクチン餌を1日1回、5月9日から5月18日まで投与した。投与中、MCを含まない配合飼料は魚体重の2.0%とし、投与完了後は無処理対照区と同様に給餌した。攻撃試験直前までは、円型2.0t水槽を用い水温 20.4 ± 0.9 で循環ろ過飼育した。

攻撃試験による評価

ワクチン投与完了から3日後(5月21日)、7日後(5月25日)および14日後(6月1日)に生菌液の浸漬攻撃による評価を行った(以下それぞれ「3日後攻撃」、「7日後攻撃」および「14日後攻撃」と記す)。攻撃菌株はPH0424株とし、培養方法は保存菌液を200mLの1/2CGYが入った300mLの三角フラスコに接種し、15、24時間、150rpmで振盪培養し(前培養)、前培養液10mLを300mLの1/2CGYが入った500mLの三角フラスコに接種し、前培養と同様の条件で16時間培養して生菌原液(2.0×10^9 CFU/mL)を作製した。1/2CGYを井戸水で2倍希釈した液で生菌原液を希釈し、2濃度(1.0×10^6 CFU/mLおよび 1.0×10^5 CFU/mL)の攻撃用生菌液を調製した。これらの菌液1000mLに30分間、各区からそれぞれ25尾を浸漬した。攻撃後14日間の死亡数を経日的に観察した。冷水病発病の確認は、外部所見および酵素抗体法で行った。攻撃試験期間中の飼育管理は20Lの角型スチロール樹脂製水槽(412mm×240mm×301mm)を用い、3日後攻撃および7日後攻撃は水温 15.4 ± 0.4 の河川伏流水のかけ流し(20.7L/時)で飼育し、14日後攻撃は水温 14.9 ± 0.5 で同様に飼育した。無処理対照区と各ワクチン区における死亡率の差の検討はFisherの直接確率計算法により行い、ワクチンの有効率(Relative percent survival :RPS(%))=(1-ワクチン区の死亡率/無処理対照区の死亡率)×100)は、Cory and Amend⁸⁾に従い算出した。

試験2

供試魚

試験場において継代(28代)飼育された親魚から、2005年9月に採卵し、養成したアユ(平均体重1.6g)を各試験区150尾用いた。

ワクチン原液、注射ワクチン、経口ワクチンおよび試験区の設定

ワクチン液、注射ワクチン、経口ワクチンおよび試験区の設定は、試験1と同様とした。ただし、試験期間は、2006年6月21日から2006年7月28日までとし、注射ワクチン区は6月30日に注射ワクチンを1回接種、経口ワクチン区はワクチン餌を6月21日から6月30日まで投与した。また、ワクチン投与開始から攻撃試験直前までは、円型0.2t水槽を用い、水温 15.1 ± 0.4 の河川伏流水のかけ流しで飼育した。

攻撃試験による評価

ワクチン投与完了から3日後(7月3日)、7日後(7月7日)および14日後(7月14日)に生菌液の浸漬攻撃による評価を行った(以下それぞれ「3日後攻撃」、「7日後攻撃」および「14日後攻撃」と記す)。生菌原液、発病の確認および飼育管理は試験1と同様とした。ただし、攻撃用生菌液の濃度および供試尾数について、3日後攻撃は2濃度(3.6×10^6 CFU/mLおよび 3.6×10^5 CFU/mL)に調整して各試験区から20尾、7日後攻撃は1濃度(1.1×10^7 CFU/mL)に調整して各試験区から20尾、14日後攻撃は2濃度(1.0×10^7 CFU/mLおよび 2.2×10^6 CFU/mL)に調整して各試験区から25尾を浸漬した。また、3日後攻撃は水温 15.9 ± 0.5 、7日後攻撃は水温 16.1 ± 0.4 および14日後攻撃は 16.4 ± 0.3 の伏流水のかけ流しでそれぞれ飼育した。無処理対照区と各ワクチン区における死亡率の差の検討およびRPSは試験1と同様とした。

結果

試験1

攻撃試験の結果を表1および図1、2に示した。

注射ワクチン区は、3日後攻撃の死亡率は無処理対照区を上回ったが、7日後攻撃で同程度となり、14日後攻撃では有意($P < 0.05$)に低下した。また、3日後攻撃および7日後攻撃のRPSは-38.9~10.5%であったが、14日後攻撃では45.0~53.8%に上昇した。経口ワクチン区は、3日後攻撃、7日後攻撃および14日後攻撃いずれも無処理対照区とほぼ同程度の死亡率であった。また、RPSはすべての攻撃をとおして-11.1~21.1%であった。

試験2

攻撃試験の結果を表1および図3、4に示した。

注射ワクチン区は、試験1同様に3日後攻撃の死亡率は無処理対照区を上回ったが、7日後攻撃で同程度となり、14日後攻撃では有意($P < 0.05$)に低下した。また、3日後攻撃および7日後攻撃のRPSは-25.0~-5.6%であったが、14日後攻撃では40.9~42.1%に上昇した。経口ワクチン区は、すべての攻撃をとおして無処理対照区より死亡率は低く、3日後攻撃では有意($P < 0.05$)に低い値も示した。また、RPSは11.1%以下の値が2例

表1 冷水病菌 (PH0424株) による攻撃試験の結果

試験	攻撃試験	攻撃菌数 (CFU/mL)	試験区	供試尾数 (尾)	死亡尾数 (尾)	死亡率 (%)	RPS ^{*1} (%)
試験1	3日後攻撃	1.0×10^6	無処理対照	25	19	76.0	-
			注射ワクチン	25	25	100.0	-31.6
			経口ワクチン	25	15	60.0	21.1
	7日後攻撃	1.0×10^5	無処理対照	25	18	72.0	-
			注射ワクチン	25	25	100.0	-38.9
			経口ワクチン	25	20	80.0	-11.1
		1.0×10^6	無処理対照	25	19	76.0	-
			注射ワクチン	25	17	68.0	10.5
			経口ワクチン	25	19	76.0	0.0
	14日後攻撃	1.0×10^5	無処理対照	25	18	72.0	-
			注射ワクチン	25	18	72.0	0.0
			経口ワクチン	25	15	60.0	16.7
		1.0×10^6	無処理対照	25	20	80.0	-
			注射ワクチン	25	11	44.0 ^{*2}	45.0
			経口ワクチン	25	18	72.0	10.0
試験2	3日後攻撃	3.6×10^6	無処理対照	20	18	90.0	-
			注射ワクチン	20	19	95.0	-5.6
			経口ワクチン	20	16	80.0	11.1
	7日後攻撃	3.6×10^5	無処理対照	20	16	80.0	-
			注射ワクチン	20	20	100.0	-25.0
			経口ワクチン	20	10	50.0 ^{*2}	37.5
		1.1×10^7	無処理対照	20	17	85.0	-
			注射ワクチン	20	19	95.0	-11.8
			経口ワクチン	20	13	65.0	23.5
	14日後攻撃	1.0×10^7	無処理対照	25	22	88.0	-
			注射ワクチン	25	13	52.0 ^{*2}	40.9
			経口ワクチン	25	21	84.0	4.5
		2.2×10^6	無処理対照	25	19	76.0	-
			注射ワクチン	25	11	44.0 ^{*2}	42.1
			経口ワクチン	25	13	52.0	31.6

*1; RPS=(1-(ワクチン区の死亡率/無処理対照区の死亡率)) × 100

*2; Fisherの直接確率計算法による (P<0.05)

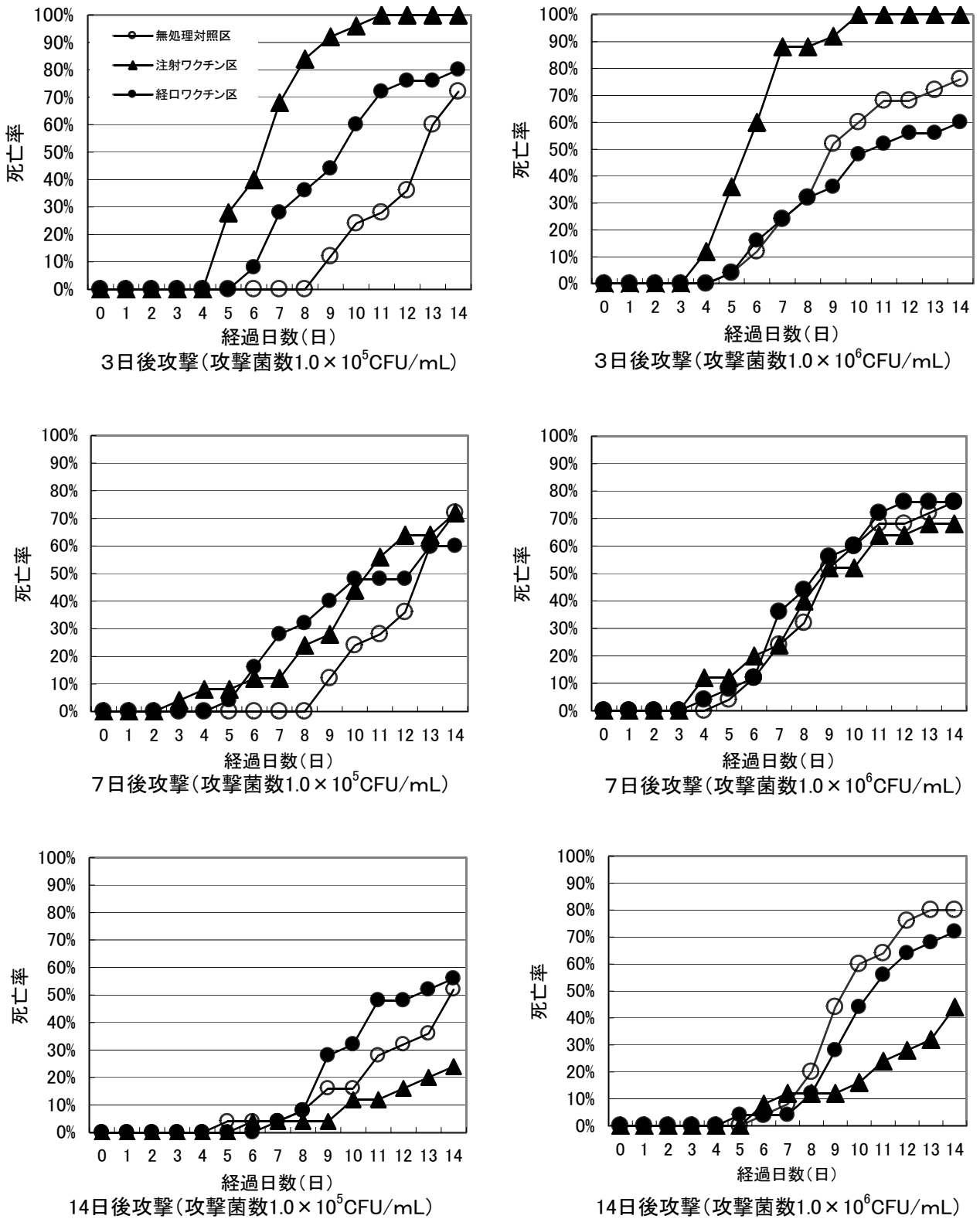


図1 試験1における攻撃試験の死亡率の推移

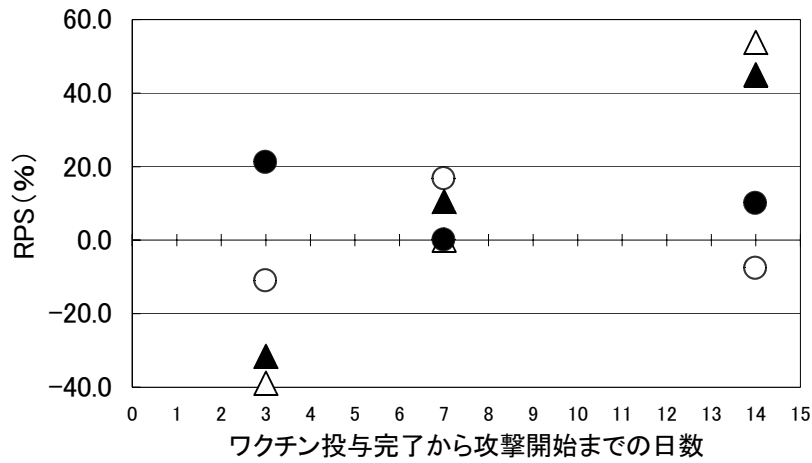


図2 試験1の攻撃試験実施時期別RPSの比較
 ▲：注射ワクチン区（攻撃菌数： 1.0×10^6 CFU/mL）
 ●：注射ワクチン区（攻撃菌数： 1.0×10^6 CFU/mL）
 ○：経口ワクチン区（攻撃菌数： 1.0×10^6 CFU/mL）
 △：経口ワクチン区（攻撃菌数： 1.0×10^5 CFU/mL）

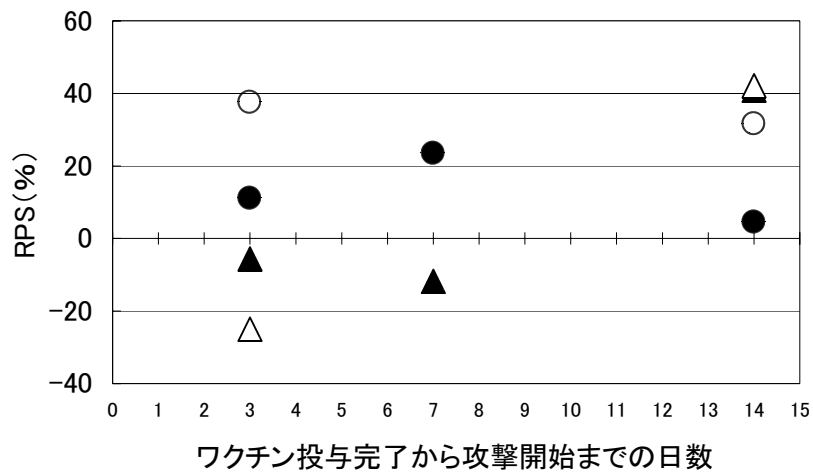
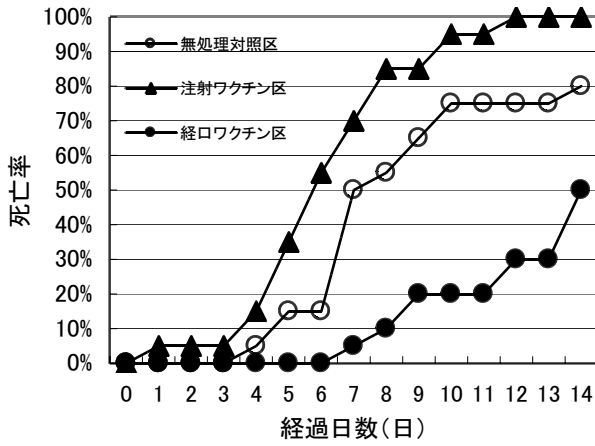
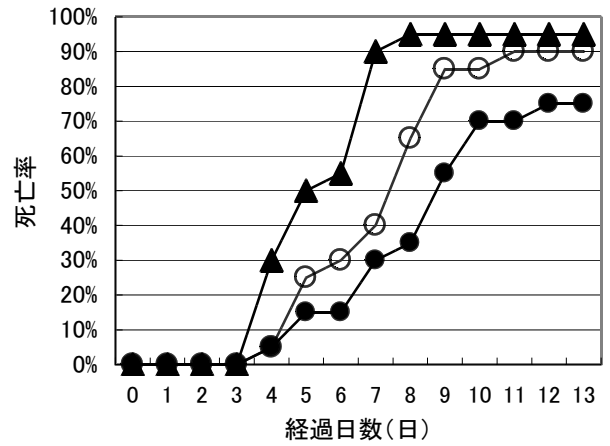


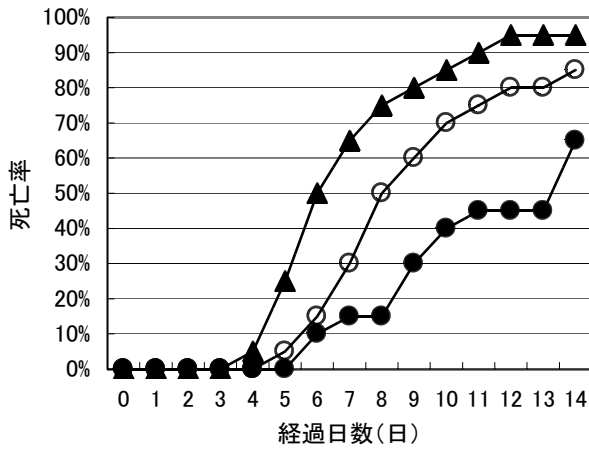
図4 試験2の攻撃試験実施時期別RPSの比較
 ▲：注射ワクチン区（攻撃菌数：3日後攻撃 3.6×10^6 CFU/mL，7日後攻撃 1.1×10^7 CFU/mL，14日後攻撃 1.0×10^7 CFU/mL）
 ●：注射ワクチン区（攻撃菌数：3日後攻撃 3.6×10^6 CFU/mL，14日後攻撃 2.2×10^6 CFU/mL）
 ○：経口ワクチン区（攻撃菌数：3日後攻撃 3.6×10^6 CFU/mL，7日後攻撃 1.1×10^7 CFU/mL，14日後攻撃 1.0×10^7 CFU/mL）
 △：経口ワクチン区（攻撃菌数：3日後攻撃 3.6×10^6 CFU/mL，14日後攻撃 2.2×10^6 CFU/mL）



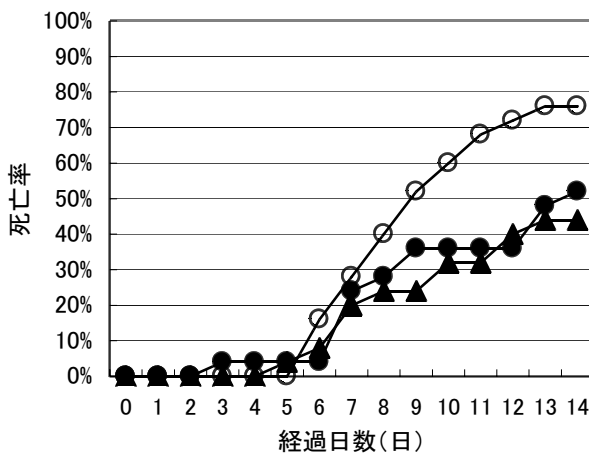
3日後攻撃 (攻撃菌数 3.6×10^5 CFU/mL)



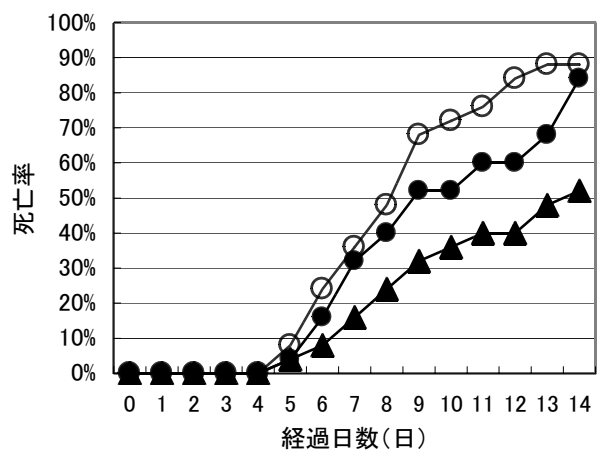
3日後攻撃 (攻撃菌数 3.6×10^6 CFU/mL)



7日後攻撃 (攻撃菌数 1.1×10^7 CFU/mL)



14日後攻撃 (攻撃菌数 2.2×10^6 CFU/mL)



14日後攻撃 (攻撃菌数 1.0×10^7 CFU/mL)

図3 試験2における攻撃試験の死亡率の推移

見られたが、その他は23.5～37.5%を示した。

考 察

平均体重0.9gおよび1.6gのアユに対するアユ冷水病の注射ワクチンの予防効果はいずれも投与完了7日後までは期待できず、8日後から14日後の間に発現すると考えられた。一方、量産MCを用いた経口ワクチンについて、平均体重1.6gのアユは投与完了3日後には一定の予防効果が発現したが、平均体重0.9gのアユでは投与完了14日後においても予防効果が判然としなかった。これらのことから、経口ワクチンにおいては魚体重により予防効果の発現が異なる可能性が考えられた。

まず、注射ワクチンについて、3日後攻撃の死亡率が無処理対照区を上回った理由として、腹腔内への注射によるダメージが3日では回復せず、弱っている状態で攻撃試験を行ったためと思われる。7日後攻撃では無処理対照区と同程度の死亡率であり、注射によるダメージは回復したが、予防効果は発現していなかったと思われる。これまでの研究では、注射ワクチン接種から14日後に予防効果が確認されており^{9,10)}、本試験においても同様の予防効果が確認された。これらのことから、注射ワクチンは接種後8日後から14日後の間に予防効果が発現すると思われた。

次に経口ワクチンについては、平均体重1.6gのアユを用いた場合、3日後攻撃で有意に死亡率が低下した事例が認められ、RPSが全ての攻撃においてプラスの値を示した。本試験のワクチン投与期間は10日間であり、3日後攻撃を行った日はワクチンの投与開始から12日後にあたる。注射ワクチンでは接種後14日後には予防効果が確認されていること^{9,10)}および経口ワクチンを5日間投与した場合、投与開始から14日後に抗体価の上昇が確認されていること¹¹⁾から、3日後攻撃時には既に一定の予防効果が発現していたと思われる。しかしながら、14日後攻撃のRPSは注射ワクチンと同等の結果は得られていない。過去の研究では、MCを用いた経口ワクチンの投与により注射ワクチン並みのRPSが得られた⁶⁾が、本試験では明らかに効果が低下した。この一因として、過去の研究⁶⁾では無処理対照区の死亡率が50.0%から65.0%の範囲であったのに対して、本試験では攻撃が強く、死亡率が76.0%から90.0%と高かったことが考えられた。この他に、本試験では製造工程をスケールアップして量産化したことによりMCの性状に何らかの変化が生じ、ワクチンの効果に影響を及ぼした可能性も考えられるが、詳細は不明である。今後、今回用いた量産MCのRPSの低下原因を早急に解明する必要がある。

一方、平均体重0.9gのアユを用いた場合、14日後攻撃においても予防効果の発現は判然としなかった。魚体重とワクチンの予防効果に関して、アユのピブリオ病の浸漬ワクチン¹²⁾は平均体重3.0g以下、ニジマス

Oncorhynchus mykiss のピブリオ病の浸漬ワクチン¹³⁾は平均体重2.0～3.0gにおいて、予防効果の持続期間が短くなることが知られており、アユ冷水病の経口ワクチンにおいて、魚体重が予防効果に影響を与えた可能性が考えられる。今後、予防効果の発現時期と魚体重の関係について、さらに詳しく検討する必要がある。

摘 要

アユ冷水病ワクチンの実用化を目指し、量産MCを用いた経口ワクチンの予防効果が発現する時期について注射ワクチンと比較検討した。

注射ワクチンは、平均体重0.9gおよび1.6gのアユについて、ワクチン接種8日後から14日後の間に予防効果が発現すると思われた。

経口ワクチンは、平均体重1.6gのアユでは投与完了3日後には一定の予防効果が発現したが、注射ワクチンと同等の予防効果は認められず、量産MCの効果低下原因について早急に検討する必要がある。また、平均体重0.9gのアユに経口ワクチンを投与した場合、14日後においても予防効果が判然とせず、魚体重により予防効果の発現が異なる可能性が考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、(独)水産総合研究センター養殖研究所乙竹充博士には、ワクチンおよびMCを提供いただき厚くお礼申し上げます。また、試験魚の飼育管理等にご協力いただいた日本大学生物資源科学部坂本晋之君および東海大学海洋学部佐川信三君に感謝いたします。本研究は平成18年度先端技術を活用した農林水産研究高度化事業により実施した。

引用文献

- 1) 井上潔(2000)：アユの冷水病，海洋と生物，126，35-38.
- 2) 原日出夫(2006)：水産動物保健対策推進事業，神奈川県水産技術センター業務概要，56-57.
- 3) Wakabayashi H., Toyama T. and Iida T. (1994) : A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan. *Fish Pathol.*, 29, 101-104.
- 4) Rahaman M. H., Ototake M., Iida Y., Yokomizo Y. and Nakanishi T. (2000) : Efficacy of oil-adjuvanted vaccine for coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, 35, 199-203.
- 5) Rahaman M. H., Ototake M. and Nakanishi T. (2003) : Water-soluble adjuvants enhance the protective effect of *Flavobacterium psychrophilum* vaccines in ayu *Plecoglossus*

- altivelis*. *Fish Pathol.*, 38, 171-176.
- 6) 原日出夫(2004): アユの冷水病ワクチン等に関する研究. 平成16年度養殖衛生対策技術開発研究成果報告書, (社)日本水産資源保護協会, 55-65.
 - 7) 原日出夫(2000): アユ冷水病に対する経口ワクチンの研究. 神水研研報, 6, 109-112.
 - 8) CORY T. R. and AMEND D. F. (1977) : Immunization of sockeye salmon(*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. *Aquaculture*, 12, 317-325.
 - 9) 原日出夫(2006): アユの冷水病ワクチン等に関する研究. 平成17年度養殖衛生対策技術開発研究成果報告書, (社)日本水産資源保護協会, 71-78.
 - 10) 湯浅明彦・谷本剛(2006): アユの冷水病ワクチン等に関する研究. 平成17年度養殖衛生対策技術開発研究成果報告書, (社)日本水産資源保護協会, 99-113.
 - 11) 原日出夫(2002): アユ冷水病に対する経口ワクチンの研究. 神水研研報, 8, 17-20.
 - 12) 城泰彦(1991): アユとニジマスのピブリオ病ワクチン ワクチンの有効性試験 水産試験場における試験 (1)アユ, 水産増養殖叢書, 41, 102-110.
 - 13) 森川進(1991): アユとニジマスのピブリオ病ワクチン ワクチンの有効性試験 水産試験場における試験 (2)ニジマス, 水産増養殖叢書, 41, 111-117.