

ビブリオ病・せっそう病・連鎖球菌症不活化ワクチン連絡試験結果

加地 弘一

日本においては、サケ科魚類を対象としたワクチンとしてビブリオ病浸漬ワクチンが市販され、高い効果をあげている¹⁾。しかし、ビブリオ病以外の魚病に対するワクチンは現在認可されておらず²⁾、その対策は抗菌剤による治療が中心である。近年、我が国では食の安全に対する意識が高まっており、抗菌剤に頼らない安心安全な魚作りの観点から、その他の魚病に対するワクチンの早期開発が望まれる。本試験ではサケ科魚類を対象としたビブリオ病・せっそう病・連鎖球菌症不活化多価ワクチンについて、試作ワクチンの有効性を検討した。

なお、本試験は全国養鱒技術協議会魚病対策研究部会の連絡試験として実施した。2008年度はワクチンによるせっそう病への有効性について検討した。

材料及び方法

供試魚

当所産アマゴ1年魚（平均体重28g）を供試魚とした。

ワクチン接種

供試ワクチンは岐阜県河川環境研究所より供与されたアジュバント（Montanide ISA-207）乳化済みのビブリオ病・せっそう病・連鎖球菌症不活化多価ワクチンを使用した。供試魚は5,000倍希釈したFA100（製造元：田村製薬㈱）で麻酔し、トップ二段針を用いて腹腔内に0.05mL/尾のワクチン液を接種した。ワクチンの接種は、2008年12月26日に実施し、合計176尾にワクチン処理を行った。

飼育管理

ワクチン処理した供試魚は容積230LのFRP製水槽に放養し、感染試験に供するまで水温12.5℃の地下水で飼育管理を行った。対照区として、ワクチン無処理アマゴ200尾も別に用意した230L FRP水槽で同様に管理した。給餌はライトリッツ給餌率表に基づき朝、夕2回給餌とした。

オイルアジュバント残留の確認

ワクチン接種翌日から7日間隔でワクチン区、対照区それぞれ5尾ずつ開腹し、腹腔内の油球の有無を観察することによりアジュバントの残留を確認した。残留の確認はワクチン区での残留が、5尾すべてで認められなくなるまで実施した。

せっそう病の実験感染試験

ワクチン接種から15日後に、せっそう病原菌（275株）による攻撃試験を注射法により実施した。保存してあった菌株を増菌し、攻撃用の菌液を調整した。

本試験で80%程度の死亡率が得られる菌液濃度を決定するために、予備試験として菌液（希釈前濃度 3.2×10^8 CFU/mL）をTS液体培地で $10^2 \sim 10^6$ に段階希釈し、それぞれ10尾ずつ腹腔内に注射し、30Lのアクリル水槽に収容し14日間観察状況を観察した。観察期間中は毎日死亡魚の計数及び死亡魚からの細菌分離を実施した。また、試験終了時には生残魚全ての細菌分離を行った。

本試験は、菌液（希釈前濃度 1.4×10^8 CFU/mL）をTS液体培地で $1/4 \times 10^5$ 、 10^5 、 4×10^5 の3段階に希釈し、ワクチン区、対照区それぞれ20尾ずつ腹腔内に注射し14日間死亡状況を観察した。非攻撃区はTS液体培地を腹腔内に注射し、同様に死亡状況の観察を行った。観察期間中は死亡魚の計数及び死亡魚からの細菌分離を実施した。また、試験終了時には生残魚全ての細菌分離を行った。

試験結果

オイルアジュバントの残留状況

オイルアジュバントの残留状況を表1に示した。ワクチン区ではアジュバントは内臓表面に散在し、接種後7日目までは5尾すべてで残留が確認された。接種後14日目以降は残留が確認されるのは1尾に減少し、28日目では残留が認められる個体が0尾となった。

表1 オイルアジュバントの残留状況

接種後日数	ワクチン区	対照区
1	5/5	0/5
7	5/5	0/5
14	1/5	0/5
21	1/5	0/5
28	0/5	0/5

実験感染での死亡状況

予備試験の供試魚の死亡状況を表2に示した。 10^2 希釈区 (3.2×10^6 CFU/mL) と 10^3 希釈区 (3.2×10^5 CFU/mL) の死亡率は100%であった。 10^4 希釈区 (3.2×10^4 CFU/mL), 10^5 希釈区 (3.2×10^3 CFU/mL), 10^6 希釈区 (3.2×10^2 CFU/mL) の累積死亡率はそれぞれ80%, 70%, 20%であった。予備試験の結果、供試魚の6割程度が死亡する希釈倍率は 10^5 程度と考えられた。

表2 予備試験での死亡状況および死亡率

攻撃後日数	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	非接種
1						
2						
3						
4	3(3)	1(1)				
5	3(3)	2(2)	1(1)			
6	1(1)	2(2)	7(7)			
7	3(3)	3(3)		3(3)	2(2)	
8						
9						
10		2(2)		4(4)		
11						
12						
13						
14						
15						
累積死亡尾数	10(10)	10(10)	8(8)	7(7)	2(2)	0
累積死亡率 (%)	100	100	80	70	20	0

* 希釈前の菌液の菌数は、 3.2×10^8 CFU/ml

* () 内はうち陽性尾数

本試験における供試魚の死亡状況を表3に示した。対照区では、 3.5×10^2 CFU/mL 攻撃区、 1.4×10^3 CFU/mL 攻撃区、 5.6×10^3 CFU/mL 攻撃区の累積死亡率はそれぞれ、45%, 75%, 90%であった。また、死亡魚全てからせつそう病原菌が分離された。一方、ワクチン接種区では、 3.5×10^2 CFU/mL 攻撃区、 1.4×10^3 CFU/mL 攻撃区、 5.6×10^3 CFU/mL 攻撃区での累積死亡率はそれぞれ10%, 5%, 25%であった。 3.5×10^2 CFU/mL 攻撃区、 5.6×10^3 CFU/mL 攻撃区の死亡魚からは全てせつそう病原菌が分離されたが、 1.4×10^3 CFU/mL 攻撃区からは分離されなかった。

表3 実験感染による死亡尾数および死亡率

攻撃後日数	非攻撃		3.5×10 ² (CFU/mL)		1.4×10 ³ (CFU/mL)		5.6×10 ³ (CFU/mL)	
	ワクチン区	対照区	ワクチン区	対照区	ワクチン区	対照区	ワクチン区	対照区
1								
2								
3								
4								
5								
6							1(1)	1(1)
7				2(2)		2(2)		8(8)
8			2(2)	4(4)	1(0)	6(6)	2(2)	2(2)
9				1(1)		3(3)	1(1)	1(1)
10							1(1)	
11				2(2)		1(1)		
12						1(1)	1(1)	
13								
14						1(1)		
15								
累積死亡尾数	0	0	2(2)	9(9)	1(0)	15(15)	5(5)	18(18)
累積死亡率 (%)	0	0	10	45	5	75	25	90

* () 内はうち陽性尾数

実験感染法による効果判定

実験終了時の生残魚も含めた感染尾数と感染率を表4に示した。対照区の感染率は3.5×10² CFU/mL 攻撃区, 1.4×10³ CFU/mL 攻撃区, 5.6×10³ CFU/mL 攻撃区でそれぞれ45%, 75%, 90%であった。一方, ワクチン区では3.5×10² CFU/mL 攻撃区, 1.4×10³ CFU/mL 攻撃区, 5.6×10³ CFU/mL 攻撃区でそれぞれ10%, 5%, 25%であった。3.5×10² CFU/mL 攻撃区では対照区の死亡率が45%で基準の60%を下回ったことから, 効果の判定はできなかった。対照区の死亡率が60%を越えた, 1.4×10³ CFU/mL 攻撃区でと5.6×10³ CFU/mL 攻撃区で効果判定を行ったところ, 有効率はそれぞれ100%と72.2%であった(表5)。

表4 実験感染による感染尾数および感染率

攻撃菌濃度 (CFU/mL)		供試尾数	感染尾数	感染率 (%)
3.5×10 ²	ワクチン区	20	2	10.0
	対照区	20	9	45.0
1.4×10 ³	ワクチン区	20	0	0.0
	対照区	20	15	75.0
5.6×10 ³	ワクチン区	20	5	25.0
	対照区	20	18	90.0
非攻撃区	ワクチン区	20	0	0.0
	対照区	20	0	0.0

表5 実験感染によるワクチンの有効率

攻撃菌濃度 (CFU/mL)		供試尾数	陽性死亡尾数	陽性死亡率 (%)	有効率 (%)
3.5×10 ² (参考)	ワクチン区	20	2	10.0	77.8
	対照区	20	9	45.0	
1.4×10 ³	ワクチン区	20	0	0.0	100.0
	対照区	20	15	75.0	
5.6×10 ³	ワクチン区	20	5	25.0	72.2
	対照区	20	18	90.0	
非攻撃区	ワクチン区	20	0	0.0	
	対照区	20	0	0.0	

* 有効率 (%) = (対照区陽性死亡数 - ワクチン区陽性死亡数) / 対照区陽性死亡数 × 100

** 3.5×10² CFU/mL 攻撃区は, 対象死亡率が60%に達していないため参考値

要 約

1. ビブリオ病・せつそう病・連鎖球菌症不活化ワクチンの有効性に関する試験を実施した。
2. ワクチンのアジュバントに用いたオイルは、摂取後 21 日目まで確認されたが、28 日目には確認されなくなった。
3. アマゴを用いてせつそう病原菌の感染実験を実施したところ、攻撃濃度が 1.4×10^3 CFU/mL と 5.6×10^3 CFU/mL のワクチン有効率は、それぞれ 100% と 72.2% であり、本ワクチンの有効性が確認された。

文 献

- 1) (社) 日本水産資源保護協会 (1990)：魚類防疫技術書シリーズⅧ アユとニジマスのビブリオ病ワクチン，111-117.
- 2) 農林水産省消費・安全局衛生管理課 (2003)：水産用医薬品の使用について第 17 報.