アユの細菌性出血性腹水病に対する アセトン乾燥菌体を用いた経口免疫

金辻宏明*・二宮浩司・山本充孝

(2006年5月15日受付)

Vaccination with Acetone-dry Bacterin against Bacterial Hemorrhagic Ascites of Ayu *Plecoglossus altivelis*

Hiroaki Kintsuji*, Koji Ninomiya and
Michitaka Yamamoto

Shiga Prefectural Fisheries Experimental Station, Hikone,
Shiga 522-0057, Japan

(Received May 15, 2006)

ABSTRACT—We developed an acetone-dry oral bacterin against bacterial hemorrhagic ascites of ayu *Plecoglossus altivelis*. The bacterin was prepared from the cultured cells of *Pseudomonas plecoglossicida*, which were killed in acetone at 37°C for 2 h and dehydrated. The experiment was performed twice in 2002. The bacterin was orally administered to ayu (average body weight: 4.0 g and 3.6 g) with food twice at 2-week-interval. The fish were challenged by immersion or injection with *P. plecoglossicida* 2 weeks after the second vaccination. The bacterin showed significant efficacy with RPS of 40–79 %.

Keywords: bacterial hemorrhagic ascites, *Pseudomonas plecoglossicida*, oral vaccination, *Plecoglossus altivelis*, ayu

Pseudomonas plecoglossicida を原因菌とするアユの細菌性出血性腹水病 (BHA) はアユ養殖において問題となる疾病であり、一度発生すると深刻な被害をもたらすことが知られている¹⁾。本菌は薬剤に対してほとんど感受性を示さないため、化学療法剤による治療が極めて困難であることから、予防のためのワクチン開発が切望されている。近年、Sukenda and Wakabayashi²⁾ は BHA に対する浸漬ワクチンに効果があり、その有効期間は 2 回のワクチン投与で 6 週間と報告している。また、二

宮・山本³⁾ はオイルアジュバントと混合したホルマリン不活化死菌 (FKB) 注射ワクチンに 52 日間の有効性が認められると報告している。しかし、浸漬ワクチンの場合、投与時に魚を取り上げる必要があり、これにより魚体に傷を付けたり強度のストレスを与えてしまうことがある。さらに、注射ワクチンの場合には麻酔や入針によるストレスが生じてしまうばかりでなく、小さな仔稚魚には投与が難しい。一方、経口ワクチンの場合には、餌に均一に混合する手間は必要なものの、魚に加わるストレスは通常の給餌と大きく変わらない。このためアユの場合でも養魚現場への普及の容易さの点から、経口ワクチンは浸漬や注射ワクチンより優れていると考えられる。

これらのことから、本研究ではアユの BHA に対する経口ワクチンの開発を試みた。

材料および方法

供試魚には琵琶湖で 2001 年 11 月および 2002 年 1 月に採捕し、屋内池で飼育した湖産アユを用いた。供試魚は試験に使用するまで水温約 17.5°C の地下水を注入した 7.5 t の 8 角形コンクリート水槽で 1 日あたり魚体重の 2 % のアユ用市販飼料 (日本配合飼料) を給餌して飼育した。なお、本供試魚には実験に供するまで BHA の感染歴はなかった。供試菌には 1994 年に BHA で死亡したアユの腎臓から分離した *Pseudomonas plecoglossicida* FPC-941 株¹⁾ を用いた。供試菌の培養はハートインフュージョン液体培地 (日水) 1 L に種菌を接種し、25°C、100 rpm で振盪しながら 24 時間培養した。培養液は 20 分間の冷却遠心分離 (4°C、8,900×g) を行い、沈渣を蒸留水で冷却遠心 (4°C、16,900×g) により 3 回洗浄した。洗浄後、供試菌の沈渣を 40 mL のアセトンに再浮遊させ、37°C で 2 時間静置して脱水と固定を行なった。静置後、冷却遠心分離 (4°C、16,900×g) により集菌し、再度 40 mL のアセトンに浮遊、遠心分離を 2 回繰り返して完全に脱水した。遠心後、沈渣を室温で 2 時間減圧下で静置して乾燥させ、供試菌乾燥菌体は使用まで 4°C で保存した。なお、供試菌乾燥菌体は全ての試験で同一のロットを用いた。BHA 経口ワクチンは乾燥菌体 (4°C で 2 ヶ月間保存したもの)、アユ用市販飼料および市販ナネ油を 2 : 100 : 5 の重量比で混合して調製した。

試験区および対照区として水温約 17.5°C の地下水を注入した 300 L 水槽に供試魚を 32 尾収容し、それぞれ 2 個 (合計 4 水槽) を用い、2 週間の馴致飼育を行なった後、供試した。BHA 経口ワクチンの投与は 1 日当たり供試魚体重の 2 % の重量を 5 回 (6:00, 9:00, 12:30, 15:00 および 18:00) に分けて投与した。また、ワクチン投与 2 週間後に前述と同様に再度ワクチンを投与した。対照区には乾燥供試菌体を除いた飼料を試験区と同様に与え

滋賀県水産試験場

* Corresponding author

E-mail: kintsuji-hiroaki@pref.shiga.lg.jp

Table 1. Mortalities and relative percent survivals (RPS) in ayu orally immunized with acetone-dry *Pseudomonas plecoglossicida* bacterin

Experiment	Vaccination	Challenge method	Number of fish	Number of fish died	Mortality (%)	RPS ^{*1} (%)
First Exp.	Immunized	Immersion (1.1×10^6 CFU/mL) ^{*2}	25	8	32 ^{*4}	66.7
	Control		25	24	96	—
	Immunized	Injection (1.1×10^3 CFU/fish) ^{*3}	25	12	48 ^{*4}	47.8
	Control		25	23	92	—
Second Exp.	Immunized	Immersion (1.2×10^6 CFU/mL) ^{*2}	25	12	48 ^{*4}	40.0
	Control		25	20	80	—
	Immunized	Injection (6.3×10^3 CFU/fish) ^{*3}	25	4	16 ^{*4}	78.9
	Control		25	19	76	—

^{*1} RPS = (1-Mortality of vaccinated fish/Mortality of unvaccinated fish) × 100.

^{*2} The fish were challenged by soaking for 10 min with *P. plecoglossicida*.

^{*3} The fish were challenged by intraperitoneally injection with *P. plecoglossicida* at a dose as shown above.

^{*4} Significant difference from control ($p < 0.01$, Fisher's exact probability)

First experiment were performed in January, 2002, and second were in July, 2002.

て飼育した。

初回ワクチン投与4週間後、試験区および対照区から25尾を取り上げ浸漬法および注射法で攻撃試験を行なった。浸漬法では地下水（17.5℃）で希釈した *P. plecoglossicida* 培養液（1回目 1.1×10^6 CFU/mL、2回目 1.2×10^6 CFU/mL）に10分間浸漬し、注射法では *P. plecoglossicida* 培養液を生理食塩水で希釈して供試魚の腹腔内に接種（1回目 1.1×10^3 CFU/fish、2回目 6.3×10^3 CFU/fish）した。死亡したアユは症状を観察するとともに細菌検査を行なって BHA による死亡を確認した。累積死亡率は攻撃開始から21日後に算出し、試験区と対照区の差は Fisher の直接確率計算法により判定した。ワクチンの有効率（Relative percent survival：RPS）は Croy and Amend⁴⁾ にしたがって算出した。

なお、試験は2回、すなわち1回目は2002年1月（試験開始時の供試魚平均体重 4.0 g）に、2回目は2002年7月（平均体重 3.6 g）に実施した。

結果および考察

攻撃試験の結果を Table 1 に示した。1回目の浸漬および注射攻撃試験ではワクチン接種区の死亡率はそれぞれ32および48%であり対照区の96および92%より有意（ $p < 0.01$ ）に低かった。RPS は66.7および47.8%であった。2回目の攻撃試験ではワクチン接種区の死亡率はそれぞれ48および16%で対照区の80および76%より有意

（ $p < 0.01$ ）に低かった。RPS は40.0および78.9%であった。以上の結果より、2回の試験ともに、ワクチン処理の効果が示され、今回作製したアセトン乾燥経口ワクチンは BHA に対して有効であると考えられた。また、攻撃方法の違いにより有効性に差は認められなかった。なお、浸漬法による攻撃では攻撃12日後から出血性腹水を伴う死亡を確認した。注射法による攻撃ではワクチン接種区および対照区ともに出血性腹水は認められず攻撃後3～6日の間に死亡が認められた。

2回の試験で有効率には比較的大きなばらつきが認められたが、これは供試魚の摂餌の違いによりワクチンの摂取量に差が生じたためと考えられた。そうであるとする、ワクチンの投与方法の改良またはワクチン投与回数を増やすことなどによって有効性はさらに安定すると考えられる。今回の試験ではアセトン乾燥法でワクチンを作製したが、今後、通常用いられる FKB 等で作製したワクチンとの有効性の比較が必要と考えられる。

本稿を校閲頂いた滋賀県水産試験場の藤岡康弘博士に深謝する。

文 献

- 1) 若林久嗣・沢田健蔵・二宮浩司・西森 栄 (1996)：魚病研究, **31**, 239–240.
- 2) Sukenda and H. Wakabayashi (1999)：Fish Pathol., **34**, 163–164.
- 3) 二宮浩司・山本充孝 (2001)：魚病研究, **36**, 183–185.
- 4) Croy, T. R. and D. F. Amend (1977)：Aquaculture, **12**, 317–325.