

アユの冷水病に対する注射ワクチンの予防効果

増成伸文・難波洋平・植木範行・河原栄二郎*

Efficacy of Vaccination for Coldwater Disease in Ayu *Plecoglossus altivelis*

Nobufumi MASUNARI, Youhei NANBA, Noriyuki UEKI, and Eijiro KAWAHARA

Abstract

Coldwater disease is one of the most serious fish diseases in Japan and has caused high mortality of ayu not only in farms but also in natural waters. We investigated the efficacy of formalin-killed bacterin vaccine(FKB), water-soluble adjuvanted vaccine(S-A) and oil adjuvanted vaccine(O-A) against the coldwater disease in ayu.

Flavobacterium psychrophilum, the causative agent of bacterial coldwater disease, was cultured with stir in nutrient broth and then inactivated with formalin(10^6 CFU/ml before inactivation). FKB thus prepared was mixed with water-soluble adjuvant (Montanide IMS 1312) or oil adjuvant (Montanide ISA 711). These three kinds of vaccines were administered by intraperitoneal injection. The efficacy of vaccination was tested by exposing fish to the bacteria discharged from naturally infected ayu.

The agglutinating antibody titers of each group after vaccination was : O-A>S-A \geq FKB>unvaccinated control group. The relative percent survival (RPS) after challenge was : O-A(81)>S-A(55) \approx FKB(50)>unvaccinated control group. Even FKB group constantly showed lower mortality than control group. Therefore, the efficacy of vaccination(especially O-A) was steady, and continued until at least 56 days after vaccination, but some questions remained. RPS values continued decreasing day by day after the challenge, even in O-A group(RPS : 81 \rightarrow 56(14 days after challenge) \rightarrow 28(22 days after challenge)).

キーワード：冷水病，アユ，ワクチン，アジュバント，魚病

アユの冷水病は1987年（昭62）に徳島県で初めて確認されたが，現在では全国各地の養魚場や河川で多発しており，アユ養殖業やアユ放流事業に甚大な被害を及ぼしている¹³。1998年（平10）には大学，水産庁研究所，三十数都府県の水産試験場などで構成されるアユ冷水病対策研究会が発足し様々な調査研究がなされてきたが，河川で発生するアユ冷水病に対する有効な対策は確立されていない¹²。

岡山県の調査によると，岡山県の人工産種苗は出荷時には冷水病フリーと考えられる一方，湖産種苗の殆どの

群が放流時点で既に冷水病菌を体内に保菌していることが明らかになっているほか，河川のアユや産卵親魚などからも冷水病菌が検出されている¹⁶。また，養魚場では，保菌種苗放流以後の河川水を使用すると冷水病が発生する事例が確認されている。このため，少なくとも保菌種苗の放流開始時期（4月下旬頃）から河川アユの産卵終期（11月下旬頃）までの期間は，殆どの河川に冷水病菌が存在していると考えられる。このため冷水病対策，特に河川で発生するアユ冷水病の対策として冷水病ワクチンの開発が期待されている。

* 福山大学海洋生物工学科

冷水病のワクチン研究に関しては、ニジマス(Obach and Laurencin,1991)⁹⁾ やアユ(Rahaman et al,2000)⁹⁾ で報告されている。アユではこのほかにアユ冷水病対策研究会の連絡試験として1999年以降いくつかの水産試験場等でも取り組まれているが¹⁰⁾, その殆どはワクチン投与後の供試魚に、培養した多量の冷水病菌 ($10^4 \sim 10^8$ CFU/fish) を注射して攻撃することでワクチンの効果判定を行っている。アユの冷水病菌は条件性の病原体とされており⁹⁾, 供試魚や菌株等の諸条件で異なるが、半数致死量は強毒株でさえ 10^6 CFU/fish オーダーであるとされる¹⁰⁾。

しかしながら、養魚場では一時的に河川水を使用しただけでその10~14日程度後に冷水病が発生した事例や、非保菌群に保菌魚を混ぜたところ容易に感染が成立し大量死を招いた事例が岡山県だけでもかなり確認されている。さらに、馬久地¹⁰⁾ によると自然発病アユでは同居感染が成立するが、培養菌を接種し発病した発病アユでは排菌量は多いものの同居感染が成立しないと報告している。このため人工的に培養した冷水病菌と天然の冷水病菌では感染力や病原性等が異なる可能性が考えられる。

我々の今回の報告がこれまでのものと異なる点は、自然発病魚を用いて攻撃試験を行いワクチンの予防効果を判定した点である。さらに、ワクチンの作製は液体培地で培養した菌液を不活化するだけとしたため、他者に比較すると(菌体自体の濃度は)明らかに低濃度である点である。この方法で2カ年にわたって試験を行った結果、ホルマリン不活化ワクチン、特にオイルアジュバント添加ホルマリン不活化ワクチンの効果が確認されたので報告する。

今回の試験を実施するにあたり、アジュバントの分与と使用方法等を御指導くださった日本大学生物資源科学部中西照幸教授並びに水産庁養殖研究所乙竹充免疫研究室長に心から御礼申し上げます。

材料と方法

Table 1に本実験の概要を示した。Exp.1ではホルマリン不活化ワクチン及びオイルアジュバント添加ワクチンの効果を検討した。Exp.2では、Exp.1の再現性の確認、更にオイルアジュバントに比較し魚体内残留性が低いため食品衛生上問題が少ないと考えられる水溶性アジュバントを添加したワクチンの検討を行った。なお、ワクチンは腹腔内注射により投与し、その後、冷水病自然発病魚を用いて攻撃試験を行い、ワクチンの効果判定を行った。

1. 供試魚

Exp.1は岡山県水産試験場栽培漁業センターで、Exp.2は高梁川漁業協同組合鮎種苗生産センターで各々種苗生産され、その後岡山県水産試験場魚病指導センターで地下水を用いて飼育したアユを供試魚とした。供試魚の由来は人工継代で、継代数はExp.1がF₂₄、Exp.2がF₂₅であった。試験に供するまでの発病歴や投薬歴はなかった。なお両センターで生産された種苗からは冷水病菌は検出されておらず⁴⁻⁶⁾、さらに実験前後の検査により供試魚が冷水病フリーであることを確認している。

ワクチン投与時の平均体重は、Exp.1が8.1g/尾(1999年5月31日)、Exp.2が21.3g/尾(2000年9月5日)であった。Exp.2では成熟を抑制するため電照して飼育を行った。

2. ワクチン作製株

Exp.1では1999年5月に河川水で飼育中の死亡アユの腎臓から分離した *Flavobacterium psychrophilum* OY99AY-1株、Exp.2では2000年5月に河川の死亡アユの腎臓から分離したOY00AY-15株を用いた。

3. ワクチンの作製 (Fig.1)

ホルマリン不活化ワクチン(FKB): 改変サイトファーガ液体培地を用い18°Cで3~3.5日間スターラで攪拌培

Table 1 Outline of Experiments

Year	Experiments	Vaccination (vaccines)	Challenge test	
			-test number : C0 ^{*2}	Infection method
1999	Exp.1	FKB. ^{*1} O-A	-challenge 1 : V30 ^{*3}	Exposure of fish to <i>F. psychrophilum</i> discharged from naturally infected ayu ^{*4}
2000	Exp.2	FKB. S-A. FKB. S-A. O-A S-A. O-A	-challenge 1 : V24 -challenge 2 : V39 -challenge 3 : V56	“

^{*1} FKB: formalin killed bacterin vaccine. S-A: water-soluble adjuvanted vaccine. O-A: oil adjuvanted vaccine.

^{*2} C: days after challenge. Challenge test was started on C0.

^{*3} V: days after vaccination. Vaccination was administered on V0 by injection.

^{*4} see Attached Fig.1.

養した。これに0.3~0.5%となるようホルマリンを加え18℃で24時間攪拌して不活化した。不活化前の生菌数はExp.1は 3.6×10^6 CFU/ml, Exp.2は 4.3×10^6 CFU/mlであった。なお生菌数の測定はミスラ法¹⁰⁾(希釈は滅菌蒸留水, 培地は改変TYE寒天培地)によった。

水溶性アジュバント添加ワクチン(S-A): 水溶性アジュバント(Montanide IMS 1312, Seppic社)とFKBを1:1の容積比でスターラにより混合した。

オイルアジュバント添加ワクチン(O-A): オイルアジュバント(Montanide ISA 711, Seppic社)とFKBを, Exp.1では7:3, Exp.2では3:1の容積比で混合した。混合は2本のガラス製注射器を連結針で連結し交互に往復運動を繰り返すことで行い, 十分にエマルジョン化するまでこれを繰り返した。(なおMontanide ISA AdjuvantsのうちISA711は, ISA763A[®]と同じくwater-in-oil emulsionの状態で使用し, 含有オイルは植物オイルをベースとしたmetabolizable(none-mineral)タイプのものである)

なお, 各ワクチンに含まれる単位容積あたりの抗原量は多い順に, FKB>S-A>O-A, であった。

4. ワクチン投与

供試魚1尾あたり0.05mlのワクチンを腹鳍基部後方の腹腔内に注射法で投与した。対照区は無処理とした。な

おワクチン投与は供試魚をm-アミノ安息香酸エチルメタンスルホネート(C₁₀H₁₃NO₅S, ナカライテスク(株))で麻酔して行った。ワクチン投与日の水温はExp.1が18.4℃, その後攻撃試験までが16.5~20.6℃であった。同様にExp.2ではワクチン投与日が21.6℃, その後攻撃試験までがchallenge 1では18.9~23.8℃, challenge 2では18.9~23.8℃, challenge 3では15.0~23.8℃であった。

なお, Exp.2-challenge 1, challenge 2ではワクチン投与後から攻撃試験に供するまでの期間, 水槽内で激しい縄張り行動がみられた。

5. 効果の判定

1) 攻撃の方法

Exp.1では養魚場から入手した冷水病自然発病アユを貯水タンク(ろ過槽)に投入し, その排水で攻撃した。なお, 感染材である発病魚は攻撃試験の開始当日(Table 2のC0)に20尾, 開始1日後(C1)に3尾, 2日後(C2)に4尾を各々投入した。感染材とした発病アユは同一発病群から入手したものであった。

Exp.2では冷水病菌に汚染された水槽に供試魚をセットすることにより攻撃した。すなわち, 攻撃用水槽に健康なアユを定期的に投入することで冷水病感染群を維持し, 攻撃試験前に感染群を取り除き, そこへ供試魚をセットした。

Vaccine preparation

Culture in modified cytophaga broth (*F. psychrophilum* was cultured with stir for 3-3.5 days at 18°C).

Inactivation with formalin (Add formalin up to 0.3-0.5% and stir for 24h at 18°C).

• **FKB vaccine** (formalin-killed bacterin vaccine) : Exp.1: 3.6×10^6 CFU/ml before inactivation.
Exp.2: 4.3×10^6 CFU/ml before inactivation.

• **S-A vaccine** (water-soluble adjuvanted vaccine) : The water-soluble adjuvant Montanide IMS 1312 (Seppic, France) was combined with FKB vaccine in a 1:1 (v/v) ratio. The adjuvant and FKB vaccine was mixed by stirrer.

• **O-A vaccine** (oil adjuvanted vaccine) : The oil adjuvant Montanide ISA 711 (Seppic) was combined with FKB vaccine in both 7:3 (Exp.1) and 3:1 (Exp.2) (v/v) ratio. The adjuvant and FKB vaccine was mixed well until it become a stable emulsion, by the two-syringe/double hub needle method*. So that a single drop of the stable emulsion would remain cohesive when floated on cold water.

*The two-syringe/double hub needle method : Load one syringe with the adjuvant. Load the other syringe with the antigen (FKB vaccine). Connect the two syringes via a double hub emulsifying needle. Mix the adjuvant with the antigen by forcing the materials back and forth through the needle between the syringes.

Vaccination

Intraperitoneal injection (0.05ml of FKB, S-A or O-A vaccine per fish).

The average body weight of fish vaccinated was 8.1g/fish (Exp.1) and 21.3g/fish (Exp.2).

Fig. 1 Vaccine preparation and Vaccination

なお攻撃試験時の飼育水は、地下水と簡易ろ過循環水を併用した。ここで、ろ過循環水を併用した理由は、各水槽の排水を再循環させることで冷水病が全水槽に確実かつ均等に蔓延することをねらったものである。参考までにその概要をAttached Fig. 1に示した。

2) 攻撃試験 (Table 1)

各ワクチンの予防効果を判定するため、前述の方法により、Exp.1はワクチン投与30日後に、Exp.2では24, 39, 56日後に各々攻撃を開始した。その後Exp.1では22日間、Exp.2では14日間にわたり供試魚の死亡状況等を観察した。

観察中は毎日給餌し、更に死魚の取り上げを行い死亡率を求めた。更に、冷水病特有の口周辺や体表にみられる穴あき症状の有無の確認と、死亡魚の腎臓から改変TYE寒天培地を用いた菌分離を行い、冷水病による死亡か否かを調べた。なお冷水病菌の判定は、冷水病菌らしき黄色（透明感のある山吹色）コロニーを形成し、且つ長桿菌であるものを冷水病菌と判定したが、必要に応じ抗冷水病血清（抗FPC840¹²³血清）を用いた凝集試験も行った。

攻撃試験終了後は各ワクチンの効果を判定するため、次式により有効率(RPS: The relative percent survival)¹²⁴を算出した。なおRPS60は対照区の死亡率が60%以上になった時点で計算されるRPSである。例えばExp.1-challenge 1 (Table 2) では、対照区の死亡率が初めて60%以上になったのは攻撃後9日目であり、この時点の死亡率(対照区:77%,FKB:35%,O-A:8%)で計算されるRPS値のことである。

$$RPS = \left(1 - \frac{\text{mortality of vaccinated group}}{\text{mortality of unvaccinated control group}}\right) \times 100 \quad [\%]$$

RPS60: RPS value calculated on the day when the mortality of unvaccinated control group is 60% or over.

6. 生残魚の保菌検査

攻撃試験終了後の生残魚については、冷水病菌の保菌検査を行った。保菌検査は分離培養法（検出部位:腎臓, 培地:改変TYE寒天培地, 培養温度:13~15℃）で行った。冷水病菌の同定は、1) 冷水病らしき黄色コロニーを形成する、2) 長桿菌である、3) 抗冷水病血清を用いた凝集試験で陽性反応を示す、の三条件全てを満たすものを冷水病菌と判定した。なお凝集試験では冷水病菌の自発凝集性をなくすため、供試菌を滅菌蒸留水に懸濁し、60℃以上×5分間以上の加熱処理後に凝集試験を行った。

7. 血中抗体価

Exp.2において、ワクチン投与4,6,8週間後に、供試魚から個体別に採血した。その後採血した血清を用いて、供試菌株(OY00AY-15)に対する凝集抗体価をマイクロタイター法により測定した。

結 果

1. 攻撃試験による死亡魚の診断結果

何れの攻撃試験においても、全死亡魚の64~99%の個体で冷水病特有の口周辺や体側のえぐったような穴あき症状がみられた。また、75~95%の個体の腎臓から冷水病菌が分離された(Attached Table 1)。特にExp.2-challenge 1, challenge 2では、体側に著しく深い穴あき症状をもつ個体が多数確認された。

2. 攻撃試験の結果 (Table 2,3,4,5, Table 6)

Exp.1-challenge 1 (ワクチン投与30日後攻撃): 攻撃後6日目に死亡が始まり、9日目に対照区の死亡率が60%を超えた。有効率RPS60はFKB:55, O-A:90であった。RPSは14日目にはFKB:55, O-A:90であったが、22日目には両区とも低下しFKB:5, O-A:28であった。

Exp.2-challenge 1 (ワクチン投与24日後攻撃): 攻撃後4日目に死亡が始まり、7日目に対照区の死亡率が60%を超えるという急激な死亡が認められた。RPS60はFKB:44, S-A:50と両者で大差なかった。RPSはともに低下しFKB:20, S-A:5であった。

Exp.2-challenge 2 (ワクチン投与39日後攻撃): Exp.2-challenge 1と同様に急激な死亡が認められ、攻撃後4日目に死亡が始まり、7日目に対照区の死亡率が60%を超えた。RPS60はFKB:50, S-A:49, O-A:79であった。RPSは3区とも低下しFKB:10, S-A:2, O-A:36であった。

Exp.2-challenge 3 (ワクチン投与56日後攻撃): 攻撃後6日目で死亡が始まり、11日目に対照区の死亡率が60%を超えた。RPS60はS-A:67, O-A:75であった。RPSはS-Aで若干低下し、S-A:47, O-A:79であった。ワクチンの予防効果が、ワクチン投与56日後においても認められた。

まとめ: ワクチン区(FKB, S-A, O-A)の死亡率は、いずれの攻撃試験においても、常に対照区よりも低い値を示した。全攻撃試験の有効率をまとめてTable 6に示した。各ワクチンの予防効果をRPS60でみると、FKBでも平均50(44~55)と、安定して高い有効率が得られた。S-Aでも平均55(49~67)と安定して高い有効率が得られたが、FKBと大差なかった。O-Aでは平均81(75~90)と極めて

Table 2 Mortality and relative percent survival (RPS) of vaccinated ayu after challenge
Exp.1-challenge 1 (Challenge was started on 30 days after vaccination)

Vaccines	Total (fish)	V30*1		Dead fish														Mortality (%)	RPS60 (%)	RPS (%)	Carrier*3/survivor
		C0*2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14					
Control	22						1	8	3	4	1	1			1	2	95				
	21						1	5	5	6	2	1					95				
										77*4							95				
FKB	20								3	3		3	3	1	1		70				
	20								5	3	2	1					60				
									35								65	55	32		
O-A	19									2				4	1		37				
	19									1	2	1	2	1	1	2	53				
										8							45	90	53		

Temp.17.4-19.4°C.

*1 V : days after vaccination.

*2 C : days after challenge. Challenge test was started on C0.

*3 Carrier : After the challenge test, survivor in which *F. psychrophilum* was detected in kidneys by isolate-cultivate method (13-15°C on MTYE agar).

Survivor : Fish that survived challenge test.

*4 These mortalities were the criterion on which RPS60 was calculated.

Dead fish	Mortality (%)	RPS (%)	Carrier/survivor				
				15	16	17	18
	95		0/1				
	95		1/1				
	95		50%				
2	95		0/1				
2	85		1/3				
1	90	5	25%				
2	63		1/7				
1	74		1/5				
1	68	28	17%				

Table 3 Mortality and relative percent survival (RPS) of vaccinated ayu after challenge
Exp.2-challenge 1 (Challenge was started on 24 days after vaccination)

Vaccines	Total (fish)	V24		Dead fish														Mortality (%)	RPS60 (%)	RPS (%)	Carrier/survivor
		C0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14					
Control	20					1	5	4	4	3	1				2	100					
	20					1	4	7	6							100					
									80							100					
FKB	20				1	1	2	4	4		1		2	1		80			4/4		
	20				1	6	3	1	3	1	1					80			2/4		
									45							80	44	20	75%		
S-A	20					1	3	4	1	5		3	1	1		95			1/1		
									40							95	50	5	100%		

Temp.15.9-17.9°C.

Table 4 Mortality and relative percent survival (RPS) of vaccinated ayu after challenge
Exp.2-challenge 2 (Challenge was started on 39 days after vaccination)

Vaccines	Total (fish)	V39		Dead fish														Mortality (%)	RPS60 (%)	RPS (%)	Carrier/survivor
		C0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14					
Control	20					1	7	4	3	1	1			1	1	100					
	20					1	7	3	2	2	3			1	1	100					
									70							100					
FKB	20					4	2	1	2	2	3	1		1	2	90			1/2		
									35							90	50	10	50%		
S-A	19				1		3	2	4	2	1		4	1	1	100			1/1		
	20				4		4	1	1	2	4		1		2	95			1/1		
									36							98	49	2	100%		
O-A	21					1	1	4	1	1	2		2	2		57			4/9		
	20					2	1	1	3	1	2		1	1	2	70			1/6		
									15							64	79	36	33%		

Temp.15.2-18.0°C.

Table 5 Mortality and relative percent survival (RPS) of vaccinated ayu after challenge
Exp.2-challenge 3 (challenge was started on 56 days after vaccination)

Vaccines	Total (fish)	V56		Dead fish														Mortality (%)	RPS60 (%)	RPS (%)	Carrier/survivor
		C0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14					
Control	10						2	1			2	1	1	1	1	90			1/1		
	10						1		1	2	2		1	2	1	100					
											60					95			100%		
S-A	10									1	1			2	1	50			5/5		
											20					50	67	47	100%		
O-A	10									1				1		10			4/9		
	10															30			4/7		
											15					20	75	79	50%		

Temp.13.5-18.0°C.

高い有効率が得られ、さらに観察期間中の摂餌状況等も他のワクチン区に比較し良好であった。

ワクチン効果の持続性に関してはTable 5,6に示すように、投与56日後の攻撃試験でも、RPS60でS-Aが67、O-Aが75と、高い有効率が確認された。

ただし、攻撃開始後の日数が14日、22日と経過するに従い、いずれのワクチン区も冷水病による死亡は続き、対照区との死亡率の差は小さくなり、有効率が徐々に低下した。今回RPS60が平均81(75~90)と極めて高い有効率の得られたO-Aでさえも、攻撃開始後14日目の有効率は平均56に、更に22日目には平均28にまで低下した。

3. 生残魚の保菌状況

攻撃試験後の生残魚における冷水病の保菌検査結果をTable 7に示した。すなわち対照区のみならずワクチン区でも冷水病菌が腎臓から分離された。平均値で比較するとO-Aの保菌率が33%と最も低かった。

4. 血中抗体価

血清中におけるワクチン作製株に対する抗体価はTable 8に示すとおりで、O-A>O-S≧FKB>対照区の順で高かった。また、ワクチン区の抗体価は投与後56日経過してもなお対照区より高い値を示した。

Table 6 Days after vaccination and RPS values

Vaccines	Experiments	C0* ¹	Condition of challenge test (LDay60)* ³	RPS		
				C7-11* ⁴	C14	C22
FKB	Exp.1-challenge1	V30* ²	C9	55	32	5
	Exp.2-challenge1	V24	C7	44	20	·
	Exp.2-challenge2	V39	C7	50	10	·
	Exp.2-challenge3	V56	C11	·	·	·
	Average			50	21	5
S-A	Exp.1-challenge1	V30	C9	·	·	·
	Exp.2-challenge1	V24	C7	50	5	·
	Exp.2-challenge2	V39	C7	49	2	·
	Exp.2-challenge3	V56	C11	67	47	·
	Average			55	18	·
O-A	Exp.1-challenge1	V30	C9	90	53	28
	Exp.2-challenge1	V24	C7	·	·	·
	Exp.2-challenge2	V39	C7	79	36	·
	Exp.2-challenge3	V56	C11	75	79	·
	Average			81	56	28

*¹ C : days after challenge. Challenge test was started on C0.

*² V : days after vaccination.

*³ LDay60 (60% lethal day) : the day when the mortality of control group is 60% or over.

*⁴ RPS(C7-11) = RPS60.

Table 7 *F. psychrophilum* carriers among survivors after challenge test

Experiments	Control	Vaccinated groups		
		FKB	S-A	O-A
Exp.1-challenge 1	1/2*	1/4	·	2/12
Exp.2-challenge 1	/0	6/8	1/1	·
Exp.2-challenge 2	/0	1/2	1/1	5/15
Exp.2-challenge 3	1/1	·	5/5	8/16
Average (%)	75	50	100	33
Range (%)	50-100	25-75	100	17-50

* number of *F. psychrophilum* carrier / number of survivor
 carrier : survivor in which *F. psychrophilum* was detected in kidney
 survivor : fish that survived challenge test.

Table 8 Agglutinating antibody titers in sera of vaccinated ayu in Exp.2

Vaccinated with	Individual serum titers (1:)																	
	V28 (4weeks)* ¹					V42 (6weeks)				V56 (8weeks)								
Control	2	2	2	2	2	2*	2	2	2	2	<2	2	2	2	2	2		
FKB	8	8	8	8	4	7	8	8	8	8	8	8	8	4	4	4	5	
S-A	8	8	4	4	4	5	32	32	16	8	4	14	8	8	4	4	2	5
O-A	32	32	16	8	4	14	64	32	32	16	16	28	16	8	4	4	4	6

*¹ V: days after vaccination. Vaccine was injected on V0.

*² geometric average.

考 察

攻撃方法について 今回の試験では、自然発病魚の飼育水の排水を用いて攻撃試験を行った。その結果、養魚場や河川で発生する冷水病が上手く再現された。このことからワクチンの評価は良好に行われたものと考えられた。なお、今回の攻撃試験による死魚からの冷水病菌の分離率は100%ではなかったが、養魚場や河川での冷水病自然発病魚の分離率と比較しても遜色なく、さらに今回は鮮度不良魚も検査したことを考慮すると、分離率に問題はないと思われる。

今回の攻撃方法は攻撃菌量が全く不明なことが欠点であるが、感染強度を対照区の死亡率が60%に達するのに要する攻撃後日数(Table 6のLDay60)などで示すことで、この点のある程度カバーできるとと思われる。

ワクチンの予防効果 攻撃試験の結果から、アジュバント無添加のFKBでさえも、その予防効果は安定しており確かなものであると考えられる。また水溶性アジュバントの添加効果は、攻撃試験からは大幅な効果アップは確認されなかったが、抗体価がFKB単体より高かったことなどを考慮すると再度検討の余地があると思われる。一方、FKBにオイルアジュバントを添加することで、その効果が大幅に（今回の試験ではRPS60値で平均50から平均81へ）増強されることが確認された。また、効果の持続性については、少なくともワクチン投与56日後でも高い有効率が確認されたことは、今後の実用化に向け注目に値すると思われる。

ただし、極めて高い有効率が確認されたO-Aでさえも、攻撃後の日数経過に伴い有効率が徐々に低下した。さらに攻撃後の生残魚からは冷水病菌が高率に分離された。その原因としては、対照区の死亡率が90から100%と高かったことから、単に攻撃時の感染強度が強すぎた可能性が考えられる。また、一定以上の感染強度下ではワクチンの予防効果は不完全で遅延的にしか働かない可能性も考えられるが、その真相は不明である。

今回のワクチン試験に関連して、重篤な冷水病を経験した生残アユは冷水病に強いとの報告¹⁴⁾があるものの、アユの冷水病は一旦終息してもその後再発することが極めて多いとの報告³⁾がある。今回のワクチン試験でみられた攻撃後の日数経過に伴う有効率の低下原因については、アユ養魚場での冷水病の再発原因の究明と併せて、詳細な調査研究が望まれる。

ワクチンの作製方法 これまでに冷水病ワクチンに関する報告がニジマスやアユでなされているが、その殆どが寒天培地で培養後に集菌し液体に懸濁させたり、液体培地で培養後に遠心分離による濃縮等の操作を行ったものであり、高濃度の不活化菌体を含むものであった。一方、今回は液体培地で培養後にホルマリンで不活化し、これを即ホルマリン不活化ワクチンとした。不活化前の生菌数は 10^6 CFU/mlと菌体自体は比較的低濃度であったが、他で行われている高濃度のワクチン液（FKBの不活化前生菌数 $10^9 \sim 10^{11}$ CFU/ml^{8,10,15-17)}、 $7 \times 10^8 \sim 10^9$ cells/ml¹⁹⁾を投与した結果に比べて全く遜色のない有効率が得られた。攻撃方法等の諸条件が異なるため単純に比較できないが、濃縮等の操作は必ずしも必要ではないと考えられる。また今回の作成方法は操作が簡単なため、大量のワクチン液の作製も比較的容易に行うことができる。

今後の課題 岡山県だけでも毎年約40トンもの種苗が極短期間のうちに放流されており、例え連続注射機を用いても放流種苗への対応は非現実的と思われる。このため今後は、多量の放流種苗にも対応できる投与方法（浸漬法や経口法など）の開発が切望される。また冷水病はニジマス等のサケ科魚類でも問題となっており¹⁸⁾、サケ科魚類への応用も可能と思われる。

要 約

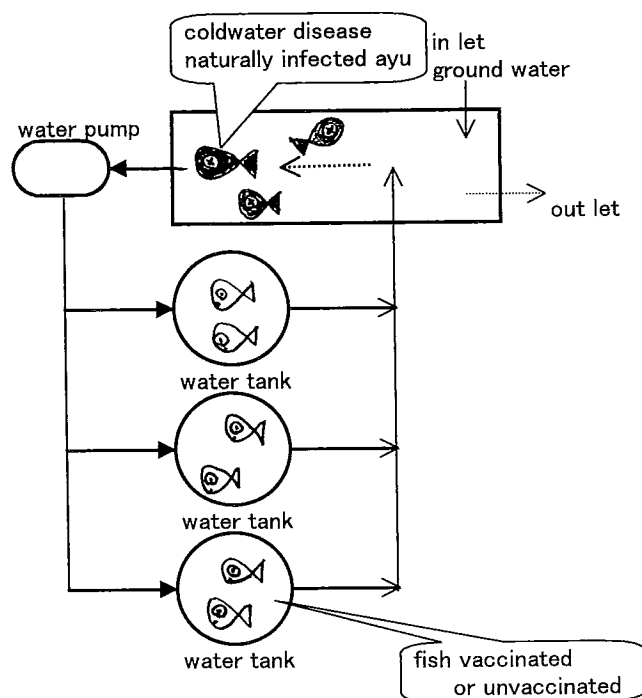
1. アユの冷水病に対する三種類のワクチン（ホルマリン不活化ワクチン(FKB)・水溶性アジュバント添加ホルマリン不活化ワクチン(S-A)・オイルアジュバント

添加ホルマリン不活化ワクチン(O-A) を作製し、供試魚に注射法で投与した。その後、自然発病魚で攻撃試験を実施し、ワクチンの有効性を検討した。

2. 攻撃試験の結果、実験室レベルでの、ホルマリン不活化ワクチンの効果が確認された。更にこれにオイルアジュバントを添加することで、更に高い有効率が得られた。水溶性アジュバント添加では、大幅な有効率の上昇はみられなかった。
有効率(RPS60) : O-A区(81) > S-A区(55) ≒ FKB区(50) > 無処理対照区
3. ワクチンの予防効果は、ワクチン投与56日後でも認められた。
4. いずれのワクチン区でも攻撃開始後の日数経過に伴い有効率が低下し、更に攻撃後の生残魚からは冷水病菌が分離された。この原因については不明であり、追跡調査が望まれる。
5. ワクチン投与後の血中抗体価は高い順に、O-A区 > S-A区 ≧ FKB区 > 無処理対照区、であった。
6. 今後は、大量の放流種苗にも対応できる投与方法(浸漬法や経口法など)の開発が望まれる。

文 献

- 1) アユ冷水病対策研究会・水産庁, 1999: アユ冷水病の現状と対策-上-, 月刊養殖, 緑書房, 1999年8月号, 91-96.
- 2) 若林久嗣, 2000: 冷水病の正体, 月刊釣情報, 2000年5月号, 58-63, ミリオンエコー出版株式会社.
- 3) 二宮浩司・山本充孝, 2000: アユ冷水病に対する治療技術に関する研究, 平成11年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会, 139-148.
- 4) 増成伸文・植木範行, 1999: 岡山県の河川における天然常在魚及び放流アユ種苗等の冷水病原因菌の保菌状況, 岡山水試報, 14, 64-69.
- 5) 増成伸文, 2001: 我が県の内水面振興作戦 アユの冷水病対策研究について, 広報ないすいめん, No.24 2001.4 全国内水面漁業協同組合連合会, 37-39.
- 6) 増成伸文, 2000: 岡山県の河川における冷水病の発生状況と問題点, 全国湖沼河川養殖研究会第73回大会要録(平成12年8月), 92-96.
- 7) A. Obach and F. Baudin Laurencin, 1991: Vaccination of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* against the visceral form of coldwater disease, Dis. Aquat. Org., 12, 13-15.
- 8) M. Habibur Rahman, Mitsuru Ototake, Yosisuke Iida, Yuichi Yokomizo and Teruyuki Nakanishi, 2000: Efficacy of Oil-adjuvanted Vaccine for Coldwater Disease in Ayu *Plecoglossus altivelis*, Fish Pathology, 35, 199-203.
- 9) アユ冷水病対策研究会, 2001: アユ種苗の取扱および放流に関する留意事項 平成13年3月版, 1.
- 10) 馬久地隆幸, 2000: アユ冷水病、特にその原因菌 *Cytophaga psychrophila* に関する研究, 平成11年度魚病対策技術開発成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会, 129-138.
- 11) 社団法人 日本水産資源保護協会, 1993: 平成4年度 魚類防疫技術基盤確立事業基本マニュアル 平成5年3月, 34.
- 12) Shotaro Izumi and Hisatsugu Wakabayashi, 2000: Sequencing of *gyrB* and Their Application in the Identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR, Fish Pathology, 35, 93-94.
- 13) Croy, T.R. and D.F. Amend (1977): Immunization of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic unfiltration technique. Aquaculture, 12, 317-325. 121-124.
- 14) 山本充孝・二宮浩司, 2000: アユの冷水病水平感染試験における感染状況の把握, 平成11年度滋賀県水産試験場事業報告, 112-113.
- 15) 二宮浩司・山本充孝, 2000: アユ冷水病に対するアジュバント添加注射ワクチンの予防効果, 平成11年度滋賀県水産試験場事業報告, 102-103.
- 16) 中野亜木子・久下敏宏・吉沢和俱, 2000: アユ冷水病、特に *Flavobacterium psychrophilum* に関する研究, 平成11年度魚病対策技術開発成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会,
- 17) 相川英明, 2000: アユ冷水病防除技術開発と診断方法の研究, 平成11年度魚病対策技術開発成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会, 159-171.
- 18) 全国養鱒技術協議会魚病対策研究部会(静岡県水産試験場富士養鱒場とりまとめ), 2000: 魚病ダイジェスト, 第24回全国養鱒技術協議会要録 平成11年7月 青森県, 143.



Attached Fig.1 Outline of challenge test with naturally infected ayu

Attached Table 1 Result of the diagnoses of coldwater disease in dead fish during challenge test

Challenge tests	Ulceration* ² +	<i>F. psychrophilum</i> * ³	
		+~++	++
Exp.1 (C0-14)* ¹	64%	87%	77%
(C15-22)	84%	95%	95%
Exp.2-challenge1	99%	75%	58%
-challenge2	91%	89%	84%
-challenge3	97%	95%	91%

*¹ C : days after challenge. Challenge test was started on C0.

*² Ulceration on body surface.

*³ *F. psychrophilum* was isolated from kidney on MTYE agar.

+ : isolated.

++ : isolated dominantly more than 10 colonies at least.

Attached Table 2 Ingredients of MCP and MTYE medium

Ingredients	MCP broth	MTYE agar
Trypton(Difco)	2.0g	2.0g
Yeast extract(Difco)	0.5g	0.5g
Lab-Lemco Powder(Oxoid)	0.2g	—
CH ₃ COONa·3H ₂ O	0.2g	—
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.2g	0.2g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g	0.5g
Bacto-Agar(Difco)	—	13.0g
Distilled Water	1,000ml	1,000ml

Adjust pH7.0-7.2

MCP: modified Cytophaga. MTYE: modified TYE.