

アユ冷水病に対するオイルアジュバント添加 ワクチンとビタミン剤の併用効果

原 日出夫

Vitamin-supplemented Diet Improves Efficacy of
Oil-adjuvanted Vaccine for Coldwater Disease
in Cultured Ayu, *Plecoglossus altivelis*.

Hideo HARA*

Abstract

Vitamin-supplemented diet was fed to ayu that had been injected with oil-adjuvanted vaccine for coldwater disease to test whether the diet could improve the efficacy of the vaccine. Ayu were challenged by intramuscular injection with live pathogenic *Flavobacterium psychrophilum*, 3 weeks after vaccination. Without vaccination, feeding of vitamin-supplemented diet for 3 weeks prior to the bacterial challenge did not decrease the mortality in the challenge test. Vaccination with oil-adjuvanted vaccine (ISA) decreased mortality in the challenge test. Relative percentage survival (RPS) were 31.6% (challenge level: 2.1×10^7 CFU/fish) and 47.1% (challenge level: 1.3×10^7 CFU/fish). Vaccination with the oil-adjuvanted vaccine and subsequent feeding of vitamin-supplemented diet for 3 weeks (ISAV) decreased mortality in the challenge test. Relative percentage survival (RPS) were 68.4% (challenge level: 2.1×10^7 CFU/fish) and 47.1% (challenge level: 1.3×10^7 CFU/fish). For both ISA and ISAV groups, agglutinating antibody titers were raised in 2 individuals out of 10 fish examined. Agglutinating antibody titers of ISAV group were higher than those in ISA group. These results suggest that feeding of vitamin-supplemented diet can improve the efficacy of oil-adjuvanted vaccine for coldwater disease in cultured Ayu.

はじめに

近年、全国的にアユ冷水病が発生し、その予防対策が求められている。本県では、1996年から予防対策として、アユ冷水病ワクチン（以下「ワクチン」と記す）の研究に着手し（相川・相澤¹⁾）、オイルアジュバント添加ワクチンを注射により腹腔内に接種することにより、へい死遅延効果および血中凝集抗体価の上昇が確認されたものの、攻撃試験開始後14日間の累積へい死率においては、オイルアジュバント添加ワクチン注射区と対照区との間に差が見られなかった（相川²⁾）ことから累積へい死率の低減が課題となっている。

ワクチンの効果を上げる目的でワクチンとともに投与する物質はアジュバントと呼ばれ、大別して3種類に分

類され、①ワクチンの取り込みを上げるための物質、②オイルアジュバントおよび③免疫賦活物質としている（酒井³⁾）。

本研究では、オイルアジュバントとともに市販ビタミン剤を免疫賦活物質として併用し、これら2種類のアジュバントによるワクチン効果を調べたところ、累積へい死率の低減等が認められたので報告する。

材料および方法

供試魚

平均体重4.0gの人工産アユを、屋内の150 l 円形水槽4基にそれぞれ100尾ずつ収容した。飼育水は、井戸水をヒートポンプで20℃に加温し、かけ流しとした。飼料は、

1日あたり魚体重の2%量の配合飼料（日本農産工業(株)製「あゆソフトNo. 2」）を1日4回に分けて給餌した。

ワクチンの調製

ワクチン液は、徳島県のアユから分離された冷水病菌株FPC840 (WAKABAYASHI *et.al.*¹⁾)を、改変サイトファーガ液体培地で96時間振とう培養し、ホルマリンを0.3%濃度となるように添加後、4℃で24時間以上保存して不活化した。このワクチン液とオイルアジュバント（セピック社製 Montanidae ISA 763A（以下、「763A」と記す））を容積比3:7でルアーロック式ガラスシリンジを用いて混合し、763A添加ワクチンを調製した。

試験区

試験区を次のとおり4区設定した。

V区は、攻撃試験開始までの21日間、配合飼料の給餌量に対して市販ビタミン剤（日本配合飼料(株)製「ビタパワー」）を外割りで5%添加して投与した。このビタミン剤は、1g中にビタミンC（アスコルビン酸カルシウム、以下、「VC」と記す）を150mg、ビタミンE（ α -トコフェロール、以下、「VE」と記す）を20mg、ビタミンB₁を2mg、ビタミンB₂を1mg、ビタミンB₆を1mg、パントテン酸を10mgおよび塩化コリンを10mg含有する。

ISA区は、763A添加ワクチンを 2.0×10^5 CFU/尾となるよう腹腔内に50 μ l/尾注射により投与した。ISAV区は、ISA区と同様の方法でワクチン投与した後、V区と同様に市販ビタミン剤を投与した。対照区は、市販ビタミン剤およびワクチンともに投与なしとした。

攻撃試験

攻撃菌株および培養方法は、ワクチン調製の場合と同様とした。攻撃菌濃度は2種類の濃度を設定し、オイゲノールにより麻酔したアユの背鰭基部筋肉内に、 $2.1 \times$

10^7 CFU/尾または 1.3×10^7 CFU/尾となるよう各試験区20尾ずつ注射後、60cmガラス水槽にそれぞれ収容し、無給餌で14日間疾病発生状況を観察した。飼育水は井戸水のかけ流しとし、水温は12.0~12.7℃で推移した。

血中凝集抗体価の測定

冷水病菌に対する血中凝集抗体価の測定のためにワクチン投与前に10尾、ワクチン投与後3週目にISA区およびISAV区からそれぞれ10尾ずつ、注射器を用いて尾柄部より採血した。採集した血液は、24時間、4℃で保存し、その後、4℃、4500rpmで20分間遠心分離して血清を得た。冷水病菌に対する凝集素価はマイクロタイター法により測定した。

結 果

攻撃試験

結果をTable1、Fig.1およびFig.2に示した。

攻撃菌量 2.1×10^7 CFU/尾の試験では、V区、ISA区、ISAV区および対照区の累積へい死率がそれぞれ100.0%、65.0%、30.0%および95.0%であり、対照区に対してISA区およびISAV区において有意差（ISA区： $P < 0.05$ 、ISAV区： $P < 0.01$ ）が認められた。ワクチンの有効率（RPS=(1-(mortality of vaccinated group/ mortality of unvaccinated control group)) $\times 100$ ）（CORY and AMEND²⁾）は、ISA区で31.6%、ISAV区で68.4%となった。累積へい死率の推移が最も低水準となったのはISAV区で、次いでISA区であった。V区は5日目まで対照区より低く推移したが、最終的には対照区の累積へい死と差がみられなくなった。攻撃菌量 1.3×10^7 CFU/尾の試験では、V区、ISA区、ISAV区および対照区の累積へい死率がそれぞれ95.0%、45.0%、45.0%および85.0%であり、対照区に対してISA区およびISAV区において有意差（両区とも $P < 0.01$ ）が認められた。ワクチ

Table1 Relative percentage survival (RPS) of Vaccinated ayu after challenge with *F. psychrophilum* strain FPC 840.

表 1 冷水菌（FPC 840株）による攻撃試験の結果

Groups	Challenge dose (CFU/fish)	Total (numbers of fish)	Specific loss (numbers of fish)	Mortality (%)	RPS (%)
V	2.1×10^7	20	20	100.0	
	1.3×10^7	20	19	95.0	
ISA	2.1×10^7	20	13	65.0 *	31.6
	1.3×10^7	20	9	45.0 **	47.1
ISAV	2.1×10^7	20	6	30.0 **	68.4
	1.3×10^7	20	9	45.0 **	47.1
Control	2.1×10^7	20	19	95.0	
	1.3×10^7	20	17	85.0	

Water temperature, 12.0 ~ 12.7℃

Asterisks indicate that the mortality is significantly different from the control group of the same challenge dose. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

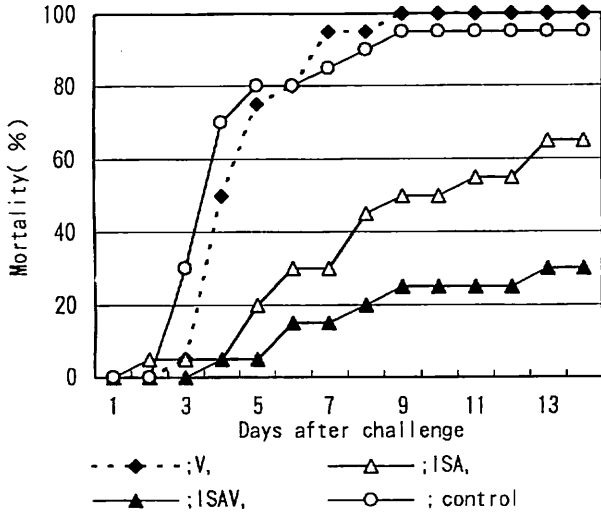


Fig 1 Changes in cumulative mortality for 14 days after challenge (challenge level was 2.1×10^7 CFU/fish).

図 1 攻撃試験における累積へい死率の推移 (攻撃菌量: 2.1×10^7 CFU/尾)

ンの有効率はISA区およびISAV区とも47.1%となった。累積へい死率の推移は、最終的にはISA区およびISAV区が同じ値となったものの、ISAV区の方が若干低めに推移した。V区は7日目まで対照区より低く推移したが、最終的に対照区の累積へい死率との差がみられなくなった。

血中凝集抗体価

ワクチン投与前の測定では、供試魚の血清中の供試菌に対する抗体価は全ての個体で検出限界以下であった。ワクチン投与後3週目の測定結果をTable 2に示した。ISA区は10個体中、8個体が検出限界以下であったが、2個体に1:16の抗体価が認められた。ISAV区は10個体中、8個体が検出限界以下であったが、2個体に1:64の抗体価が認められた。

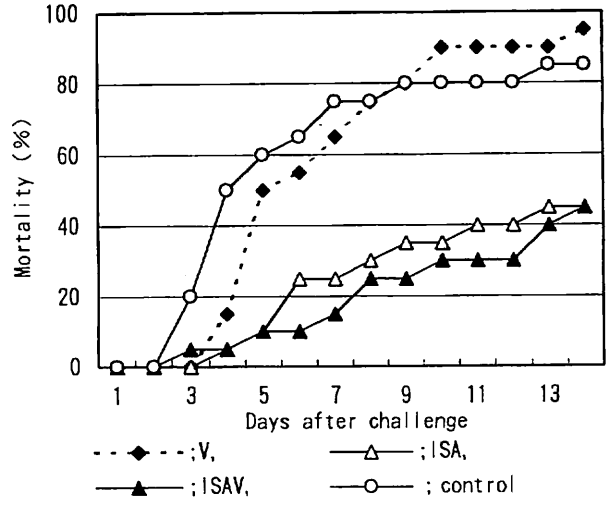


Fig 2 Changes in cumulative mortality for 14 days after challenge (challenge level was 1.3×10^7 CFU/fish).

図 2 攻撃試験における累積へい死率の推移 (攻撃菌量: 1.3×10^7 CFU/尾)

考 察

VCやVEの単独投与またはVCのほか数種のビタミン投与による抗病性の向上については、ブリ(木村・福田⁶⁾、三重県水産技術センター⁷⁾宮崎県水産試験場⁸⁾、関屋・山田⁹⁾、長崎県水産試験場¹⁰⁾、マダイ(矢野他¹²⁾)および channel catfish (LI and LOVELL¹³⁾)等で報告されている。アユにおいてもビタミン剤添加飼料を投与することにより冷水病に対する抗病性の向上、特に、ワクチン処理後の免疫機構がより強く誘導され、ワクチン効果が向上するものと考え、ビタミン添加飼料のみの場合、763A添加ワクチンのみの場合、ビタミン飼料と763A添加ワクチン併用の場合および無処理対照区を設定し、ワクチン処理3週間後に攻撃試験および血中凝集抗体価による評価を行った。

V区は、攻撃菌量 2.1×10^7 CFU/尾および 1.3×10^7 CFU

Table2 Agglutinating antibody titers in sera of ayu 21days after vaccination.

表 2 ワクチン投与後21日目のアユの血中凝集抗体価

Groups	Individual serum titers									
ISA	<2,	<2,	<2,	<2,	16,	16,	<2,	<2,	<2,	<2
ISAV	<2,	<2,	<2,	<2,	<2,	<2,	<2,	<2,	64,	64

／尾の試験において、へい死遅延効果がそれぞれ3日目、7日目まで認められたものの、14日間の観察で累積へい死率がそれぞれ100.0%、95.0%となり、対照区との差がみられなくなった。森・池田¹⁴⁾は、アユをVC欠乏飼料により飼育し、軽度の眼球突出、眼球・鰭基部の出血、頭部後方うっ血などVC欠乏症の発生を確認している。また、YAMAMOTO *et. al*¹⁵⁾は、アユのVC生合成能についてL-グラノラクトンオキシダーゼ活性を測定したところ、活性が認められなかったとしている。さらに、佐藤他¹⁶⁾は、ニジマスの傷治癒には大量のVCを要求すると報告している。これらのことから、アユにとって健康を維持するためにVCの摂取が重要であり、傷などのストレスを受けたときにニジマスと同様に大量のVCを必要とする可能性が考えられる。本研究では、攻撃直後から給餌を停止したことにより、アユの体内のVC等が消失したことに伴い、抗病性も消失したと思われる。同様に、ブリにおいても2か月間VCを投与した後、*Streptococcus sp.* の感染試験を行った結果、斃死率の低減が認められていない（長崎県水産試験場¹⁰⁾）。ISA区は、攻撃菌量 2.1×10^7 CFU/尾および 1.3×10^7 CFU/尾の試験において、累積へい死率がそれぞれ65.0%、45.0%となり、対照区に対する有意差がそれぞれ($P < 0.05$, $P < 0.01$)認められたものの、ワクチンの有効率はそれぞれ31.6%、41.7%であり、ピブリオ病ワクチンにおいて有効と判断される60.0%以上（城¹⁷⁾）に至っていない。RAHMAN 他¹⁸⁾は、763A添加ワクチン注射後4週目に、冷水病生菌による注射攻撃を実施し、60.0%の高い有効率を得た。一方、全国湖沼河川養殖研究会アユ冷水病研究会¹⁹⁾が763A添加ワクチンを投与後、14日目から37日目の間に冷水病生菌の注射による攻撃試験を実施したところ、7例中、有効率60.0%以上となったのは76.0%の1例のみで、その他は23.9~40.9%であった（有効率0.0%の事例は除く）。これらのことから、763A添加ワクチン単独投与の場合、へい死率の低減効果は期待できるが、高い効果を安定的に得ることは難しいと思われる。ISAV区は、攻撃菌量 2.1×10^7 CFU/尾および 1.3×10^7 CFU/尾の試験において、累積へい死率がそれぞれ30.0%、45.0%となり、後者は14日目にISA区と同じ値になったものの、6日目から13日目までの間は常にISA区より低く推移した。対照区に対して有意差($P < 0.01$)が認められた。ワクチンの有効率はそれぞれ68.4%、41.7%であり、前者はピブリオ病ワクチンにおいて有効と判断される基準を満たした。

また、ワクチン投与後3週目の血中凝集抗体価は、ISA区では10個体中、2個体に1:16の抗体価が、ISAV区では10個体中、2個体に1:64の抗体価がそれぞれ認められた。ISAV区は763A添加ワクチンと飼料に対してVCおよびVEなどを強化したビタミン剤を併用しているが、VCの効果について、マダイでは自然血球凝集素価の向上（矢野他²⁰⁾）、channel catfishでは抗体産生能、補体活性および貪食細胞活性の向上（Li and Lovell²¹⁾）が報告されている。また、VCおよびVEの投与効果につ

いて、ブリでは血中の凝集抗体価の向上（三重県水産技術センター²²⁾）が報告されている。これらのことから、アユにおいてもVCやVEを多く含むビタミン剤の併用が、763A添加ワクチンによって誘導される免疫機能をより強く誘導したものと考えられる。しかしながら、抗体価が検出限界以下の個体が8尾存在したにもかかわらず、へい死率の低減が認められたことについては、抗体が生産されたものの検出レベルに至らなかったのか、抗体以外の免疫機能が作用したのか原因は不明であり、今後、抗体以外の免疫機能を併せて評価することが必要である。

本研究により、763A添加注射ワクチンとビタミン剤の併用がワクチン効果を高めると考えられた。今後は、ワクチン投与後に誘導されるアユの免疫機構の研究を進めるとともに、各種ビタミンと免疫機構の関係についても研究を進め、それに基づく経済的かつ効果的なビタミンの投与濃度や投与期間の検討が必要である。また、魚体重0.5g以下の魚は注射による負担が大きいため、注射法に代わる投与方法の開発が必要とされる（乙竹²³⁾）ことや注射作業の手間などを考慮すると、注射法に比較して稚魚や大量の魚への投与が容易な経口法や浸漬法などの投与方法の開発も必要と考える。

摘 要

- 1) アユ冷水病ワクチンについて、ワクチンの効果の向上を目的にオイルアジュバント添加注射ワクチンとビタミン剤添加飼料の併用効果を調べた。
- 2) V区は、対照区に対して延命傾向が認められたものの、累積へい死率の低減は認められなかった。
- 3) ISA区は、対照区およびV区に対して累積へい死率の低減が認められ、有効率は、攻撃菌量 2.1×10^7 CFU/尾の場合31.6%、 1.3×10^7 CFU/尾の場合47.1%となった。
- 4) ISAV区は、攻撃菌量 2.1×10^7 CFU/尾の場合、ISA区に対して累積へい死率の低減が認められ、有効率は68.4%となった。同じく攻撃菌量 1.3×10^7 CFU/尾の場合、ISA区と同じ累積へい死率となったものの、その推移は概ね低水準であり、有効率は47.1%となった。
- 5) 血中凝集抗体価の獲得割合は、ISA区およびISAV区とも10個体中2個体であったものの、ISA区の抗体価は2個体ともに1:16であったのに対しISAV区は2個体ともに1:64とISA区より高かった。
- 6) これらのことから、763A添加注射ワクチンとビタミン剤添加飼料の併用により、ワクチン効果の向上が期待できると考えられた。

謝 辞

本報告をまとめるにあたり、独立行政法人水産総合研究センター生物機能部の三輪理博士には、英文の御校閲を賜りました。日本大学農獣医学部の若木博志君には、試験魚の飼育管理等に御協力いただきました。厚くお礼

申し上げます。

引用文献

- 1) 相川英明・相澤康(1997): アユ冷水病のワクチン試験, 平成8年度神奈川県水産総合研究所業務概要, 77.
- 2) 相川英明(2000): アユ冷水病防除技術開発と診断手法の研究, 平成11年度魚病技術開発研究成果報告書, 161-171.
- 3) 酒井正博(2001): アジュバント等の開発, 魚病研究, 36(2), 112.
- 4) WAKABAYASHI H., T. TOYAMA and T. IIDA (1994): A Study on Serotyping of Cytophaga psychrophila Isolated from Fishes in Japan, Fish Pathology, 29(2), 101-104.
- 5) CORY, T. R. and D. F. AMEND (1977): Immunization of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. *Aquaculture*, 12, 317-325.
- 6) 木村正雄・福田功一(1979): 細菌性疾病(類結節症)罹病ハマチに対する水産用ビタミンE・C・B群剤(V.E-63-004)投与効果, 水産増殖, 26(4), 143-146.
- 7) 三重県水産技術センター(1987): 総合栄養剤が生態防御に及ぼす影響, 昭和62年度魚病技術開発研究成果報告書, 65-70.
- 8) 宮崎県水産試験場(1987): 総合ビタミン剤及び強肝剤が生態防御に及ぼす影響, 昭和62年度魚病技術開発研究成果報告書, 14-57.
- 9) 関屋朝裕・山田卓郎(1991): 魚類の生体内脂質過酸化と生態防御との関連に関する研究, 平成3年度魚病技術開発研究成果報告書, 1-17.
- 10) 関屋朝裕・山田卓郎(1991): 魚類の抗病性と飼料素材に関する研究, 平成3年度魚病技術開発研究成果報告書, 18-31.
- 11) 長崎県水産試験場(1987): VC、Eが生態防御に及ぼす影響, 昭和62年度魚病技術開発研究成果報告書, 58-64.
- 12) 矢野友紀・中尾実樹・古市政幸・米康夫(1988): マダイの補体活性に及ぼす飼料中のコリン、パントテン酸およびビタミンCの影響, 日本水産学会誌, 54(1), 141-144.
- 13) LI, Y. and R. T. LOVELL (1985): Elevated Levels of Dietary Ascorbic Acid Increase Immune Responses in Channel Catfish, *Journal of nutrition*, 115, 123-131.
- 14) 森政次・池田静徳(1978): アユの水溶性ビタミン欠乏症, 昭和53年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 309, 83.
- 15) YAMAMOTO Y., M. SATO and S. IKEDA (1978): Existence of Gulonolactone Oxidase in Some Teleosts, *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries*, 44(7), 775-779.
- 16) SATO M., R. YOSHINAKA and S. IKEDA (1978), Dietary Ascorbic Acid Requirement of Rainbow Trout for Growth and Collagen Formation, *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries*, 44(9), 1029-1035.
- 17) 城泰彦(1991): ワクチンの有効性試験, 水産増養殖叢書, 41, 102-110.
- 18) RAHMAN, M. H., M. OTOTAKE, Y. IIDA, Y. YOKOMIZO and T. NAKANISHI (2000): Efficacy of Oil-adjuvanted Vaccine for Coldwater Disease in Ayu *Plecoglossus altivelis*, *Fish Pathology*, 35(4), 199-203.
- 19) アユ冷水病研究会(2000): アユの冷水病研究, 50-54.
- 20) 乙竹 充(2001): アユの冷水病・細菌性出血性腹水病(シールドモナス症)ワクチンの開発, 魚病研究, 36(2), 110.