

実用的使用法によるアユのビブリオ病ワクチンの効果

山本章造・石田公行・直原治子

Efficacy of Practical Immersion Vaccination against Vibriosis of Cultured Ayu Fish *Plecoglossus altivelis*

Syozo YAMAMOTO, Kimiyuki ISHIDA, and Haruko JIKIHARA

アユ *Plecoglossus altivelis* のビブリオ病ワクチンは、高濃度短時間浸漬法¹⁾で、高い有効性が確認されている。しかし、この方法は、多数のアユを高濃度のワクチン液に浸漬する方法であるために、処理時にアユが受ける打撃が大きい。また、現場の養殖場などでは、一度に大量のアユを処理する必要があり、この方法は実用性に欠ける。そのため、より実用的な使用法として、低濃度長時間浸漬による免疫方法について検討した。

なお、本試験は、社団法人 動物用生物学的製剤協会からの依頼により、全国湖沼河川養殖研究会アユビブリオ病研究部会の連絡試験として実施した。

材料と方法

供試魚は、岡山県水産試験場栽培漁業センターで人工生産した淡水馴致後の稚アユを、1986年3月24日に、同魚病指導センターの実験水槽に移し、ワクチン投与まで予備飼育を行った。試験に供するまでに、自然発病や投薬はなかった。

供試ワクチンと免疫方法 ワクチンは微生物化学研究所が試作した BVK-2 を使用した。これは *Vibrio anguillarum* PT-479 株を用い、2%食塩加ブレインハートインフュージョンブイヨン(日水製)で48時間培養後、0.3%の割合にホルマリンを添加して不活化したもので、不活化前生菌数は 10^9 CFU/ml 以上であった。これをワクチン原液として使用した。

試験区は、500倍希釈ワクチン液30分浸漬区と60分浸漬区の2区設け、それぞれ500尾ずつ供試した。試験区1は、原液を飼育水で500倍に希釈したワクチン液15 l 中に、供試魚1.58 kg を30分浸漬した。使用ワクチン液の液温は16.6°C、飼育池の水温は15.6°Cであった。試験区2は、試験区1と同様の方法で作成したワクチン液に、供試魚1.63 kg を30分間浸漬した。ワクチン液の液温は16.6°Cであった。対照区は、供試魚1.60 kg を、ワ

クチンを除いて試験区1と同様に処理した。浸漬中はブローアで瀑気した。

上記の方法による免疫は'86年6月11日に実施し、以後実験水槽に移して、攻撃試験まで飼育した。

飼育条件 実験水槽は、2.5×1.0×0.7m(水深0.35 m)の長方形コンクリート水槽で、水量は0.88m³であった。飼育用水は伏流水を用い、1日10回の換水をしたが、ブローアで瀑気した。飼育試験期間中は、1日3回、日間給餌率で3%を目安にして給餌した。飼料には市販の配合飼料(日配製3-C)を使用した。

攻撃試験 攻撃試験は免疫30日後の'86年7月10日と60日後の8月9日の2回実施した。

攻撃に使用した菌株は、*Vibrio anguillarum* PT-479 株で、血清型は JO-1 型である。培養直前に魚体を通過させたこの菌株を、1%食塩加ブレインハートインフュージョンブイヨン(日水製)を用いて、25°Cで24時間培養した。

免疫30日後は、1 ml 当たり 9.6×10^8 個の菌液を培養し、これを1%食塩水で10段階希釈し、1 ml 当たり $9.6 \times 10^4 \sim 6$ 個の3段階の菌液を調整した。この各段階の菌液5 l 当たり30尾の供試魚を10分間浸漬して攻撃した。攻撃時の水温は21.1°C、飼育水温は19.5°Cであった。免疫60日後は、1 ml 当たり 5.0×10^8 個の菌液を培養し、免疫30日後と同様の方法で攻撃した。攻撃時の水温は20.6°C、飼育水温は18.9°Cであった。攻撃後の飼育水槽には円型、黒色の FRP 水槽(底面積0.47m²)を用いた。攻撃後14日間飼育し、その間のビブリオ病による死亡状況を観察した。ビブリオ病による死亡の判定は、抗血清とのスライド凝集反応によった。

ワクチンの効果の判定基準は、攻撃試験における対照区の死亡率が60%以上で、有効率*が60%以上とした。

$$* \text{ 有効率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{ワクチン区の死亡率}}{\text{対照区の死亡率}} \right) \times 100$$

結果と考察

免疫後攻撃試験に供するまでの飼育試験結果を、第Ⅰ期と第Ⅱ期に分けて表1に示した。飼育試験期間中に、ビブリオ病などの自然発病はなく、投薬もなかった。

第Ⅰ期の生残率は、いずれの試験区も98%以上で高かった。しかし、飼育水温が若干低かったためか成長は悪く、飼料効率は54.7~66.7%の範囲であった。第Ⅱ期の生残率は、99%以上で高く、飼育水温が上昇したこともあって、飼料効率が71.9~84.7%の範囲に向上した。

免疫30日後の攻撃試験の結果を表2に示した。9.6×10⁶個で攻撃した場合、対照区の死亡率は96.7%であるのに対し、試験区1、2ともに0%で、有効率は100%であった。9.6×10⁶攻撃区は3槽で実施し、試験区内のバラツキも検討した。対照区の死亡率が96.7%以上であるのに対し、試験区1の死亡率は0~13.3%の範囲で、有効率は94.4%と高かった。試験区2でも有効率は96.7%で高かった。なお、試験区、対照区とも、水槽間の死亡率の差は少なかった。

さらに、9.6×10⁶攻撃区は、試験区1の死亡率は3.3%であり、有効率は96.6%で高く、試験区2の有効率も90%で、いずれも有効性が認められた。いずれの攻撃区

においても、死亡のピークは攻撃2~4日後であった。

以上の結果、アユのビブリオ病ワクチンは、500倍希釈液、30分及び60分浸漬法のどちらも高い有効性を示し、両者に差はなかった。免疫後30日以内では、500倍希釈液に30分間浸漬すれば、効果は十分持続すると考えられた。

次に、免疫60日後に攻撃試験をした結果を表3に示した。5×10⁶攻撃区は、対照区の死亡率が20%であったので、攻撃試験は成立しなかった。5.0×10⁶攻撃区では、対照区の死亡率が70%以上に対し、試験区1、2区の死亡率はともに0%で、有効率は100%になった。水槽間における死亡率のバラツキも少なかった。

さらに、5.0×10⁶攻撃区は、対照区の死亡率が93.3%に対し、試験区1が13.3%、試験区2が3.3%で低かった。有効率はおのおの85.7及び96.5%で、高い有効性が認められた。

いずれの試験区においても、死亡のピークは攻撃4~5日後であった。

以上の結果、免疫60日後においても、試験1、2でもともに高い有効率を示し、ワクチンの有効性が認められた。また、両試験区で効果に差はなく、ワクチン500倍希釈液に30分浸漬すれば、免疫60日後においても、ワクチンの効果は十分高いと判断された。

表1 飼育試験結果

飼 育 期 間	第Ⅰ期			第Ⅱ期		
	飼 育 期 間					
試 験 区	'86. 6. 11~7. 10 (30日間)			'86. 7. 10~8. 9 (30日間)		
	試験区1	試験区2	対 照 区	試験区1	試験区2	対 照 区
開 始 時 総 重 量 (kg)	1.58	1.63	1.60	(1.48)	(1.58)	(1.58)
〃 尾 数 (尾)	500	499	500	(342)	(341)	(347)
〃 平均体重 (g)	3.16	3.26	3.20	4.33	4.62	4.54
終 了 時 総 重 量 (kg)	(2.13)* ¹	(2.27)	(2.27)	2.92	2.84	2.73
〃 尾 数 (尾)	(492)	(491)	(497)	(340)	(338)	(345)
〃 平均体重 (g)	4.33* ²	4.62	4.54	8.6	8.4	7.9
死 亡 尾 数	8	8	3	2	3	2
〃 原 因	不 明	不 明	不 明	不 明	不 明	不 明
ビブリオ病による死亡率 (%)	0	0	0	0	0	0
生 残 率 (%)	98.4	98.4	99.4	99.4	99.1	99.4
給 餌 量 (kg)	1.005	1.005	1.005	1.70	1.60	1.60
増 重 量 (kg)	0.55	0.64	0.67	1.44	1.26	1.15
飼 料 効 率 (%)	54.7	63.7	66.7	84.7	78.8	71.9
増 重 倍 率	1.22	1.24	1.23	1.99	1.12	1.74
飼 育 水 温	14.2~19.5	平均15.6℃		16.4~18.9	平均17.5℃	

*1 ()は推定値

*2 死亡魚の平均体重

表2 免疫30日後の攻撃試験結果

試験区	攻撃菌数 (個/ml)	供試尾数	経 過 日 数														ビブリオ病 による死亡数	同 死亡率(%)	有効率 (%)
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
1 500倍 30分	9.6×10^4	試験区	30								(1)*						0	0	100
		対照区	30			18	10		1								29	96.7	
		試験区	30			2	1		1								4	13.3	94.4
		対照区	30														0	0	
	9.6×10^5	試験区	30														1	3.3	94.4
		対照区	30			2	27	1									30	100	
		試験区	30			2	24	2	1								29	96.7	94.4
		対照区	30			3	26		1								30	100	
	9.6×10^6	試験区	30														1	3.3	96.7
		対照区	30			28	2										30	100	
	2 500倍 60分	9.6×10^4	試験区	30									(1)		(4)		0	0	100
			対照区	30			18	10		1							29	96.7	
		試験区	30														0	0	100
		対照区	30			1	2										3	10	
9.6×10^5		試験区	30			1	2										0	0	96.7
		対照区	30			2	27	1									30	100	
		試験区	30			2	24	2	1								29	96.7	96.7
		対照区	30			3	26		1								30	100	
9.6×10^6		試験区	30														3	10	90.0
		対照区	30			28	2										30	100	

水温 14.2~17.2℃

* ビブリオ病以外の原因による

表3 免疫60日後の攻撃試験結果

試験区	攻撃菌数 (個/ml)	供試尾数	経 過 日 数														ビブリオ病 による死亡数	同 死亡率(%)	有効率 (%)
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
1 500倍 30分	5×10^3	試験区	30													0	0	100	
		対照区	30					2	3	1						6	20.0		
		試験区	30													0	0	100	
		対照区	30													0	0		
	5×10^4	試験区	30													0	0	100	
		対照区	30			1	12	8			1					22	73.3		
		試験区	30			1	12	8								21	70.0	85.7	
		対照区	30			13	8	2	1							24	80.0		
	5×10^5	試験区	30					3		1						4	13.3	85.7	
		対照区	30			11	10	6		1						28	93.3		
	2 500倍 60分	5×10^3	試験区	30												0	0	100	
			対照区	30					2	3	1					6	20.0		
		試験区	30												0	0	100		
		対照区	30												0	0			
5×10^4		試験区	30												0	0	100		
		対照区	30			1	12	8			1				22	73.3			
		試験区	30			1	12	8							21	70.0	100		
		対照区	30			1	13	8	2		1				24	80.0			
5×10^5		試験区	30					1							1	3.3	96.5		
		対照区	30			11	10	6		1					28	93.3			

水温16.4~18.3℃

一般に、アユ養殖においては、種苗を入手してから出荷するまでの養成期間は、約2カ月であるので、ワクチンの効果が60日間持続すれば十分である。また、種苗の輸送中などに、ワクチン液を30分間浸漬すればよいので、この使用法は実用性が高いと考えられる。

要 約

1. アユのビブリオ病ワクチンの実用的使用法として、原液500倍希釈液、30分及び60分間の浸漬法による、ワクチンの有効性を検討した。

2. 免疫30日後の攻撃では、有効率がいずれも94.4%以上になり、高い有効性を示した。

3. 免疫60日後の攻撃でも、有効率が90%以上で、有効性が認められた。

4. 攻撃試験に当たっては、水槽間に結果のバラツキは少なかった。

5. 以上の結果、アユ養殖場における養成期間が、約60日間であることと考え合わせると、現場での実用性が極めて高いと考えられた。

文 献

- 1) ビブリオ病研究部会, 1983: アユのビブリオ病, pp.71, 部会報告第4号, 全国湖沼河川養殖研究会