

せっそう病に関する研究—VII

アマゴに対する超音波処理経口ワクチン投与について(1)

森川 進・田代文男

Studies on the Furunculosis in Salmonoid Fishes. —VII

On the Oral Immunization of Ultrasonicated Antigen
to Amago Salmon, *Oncorhynchus rhodurus*.(1)

SUSUMU MORIKAWA, FUMIO TASHIRO

¹⁾ 前報では、加熱死菌とホルマリン死菌の経口
²⁾ ワクチンの有効性が否定されたが、KLONTZ は
超音波処理をした菌体水溶性成分からの明ばん
沈殿抗原による経口免疫の有効性を認めている。
³⁾ そこで本報では KLONTZ の製法に準じて経口ワ
クチンを作成しアマゴに投与してその効果を検
討した。

なお本研究は、昭和48、49年度水産庁指定調
査研究総合助成事業「病害研究」として実施し
た。またこの一部について昭和50年度日本水產
⁴⁾ 學会春季大会にて口頭発表した。

試験の方法

試験は1973年と1974年の両年に行い、第1表
に示した試験区を設けた。

供試魚は岐阜水試で孵化したアマゴ稚魚を用
い、供試尾数は餌付け時に約5,000尾とし、池
出し時('73年6月1日、'74年4月19日)に正確
な尾数を計数した。

飼育は、池出し時までは屋内に設置した木製
水槽(長さ170×巾45×水深30cm)で地下水を
用いて行った。池出し後は、屋外の長方形コン
クリート池(長さ390×巾130×水深50cm)で河川
水を用いて行った。飼育水温を第一図に示した。

第1表 経口ワクチン試験の試験区

	1973年	1974年
無投与区	無投与	無投与
投与I区	150mcg*1/尾/日・30回投与	150mcg /尾/日・60回投与
投与II区	300mcg /尾/日・30回投与	150mcg /尾/日・60回投与**2

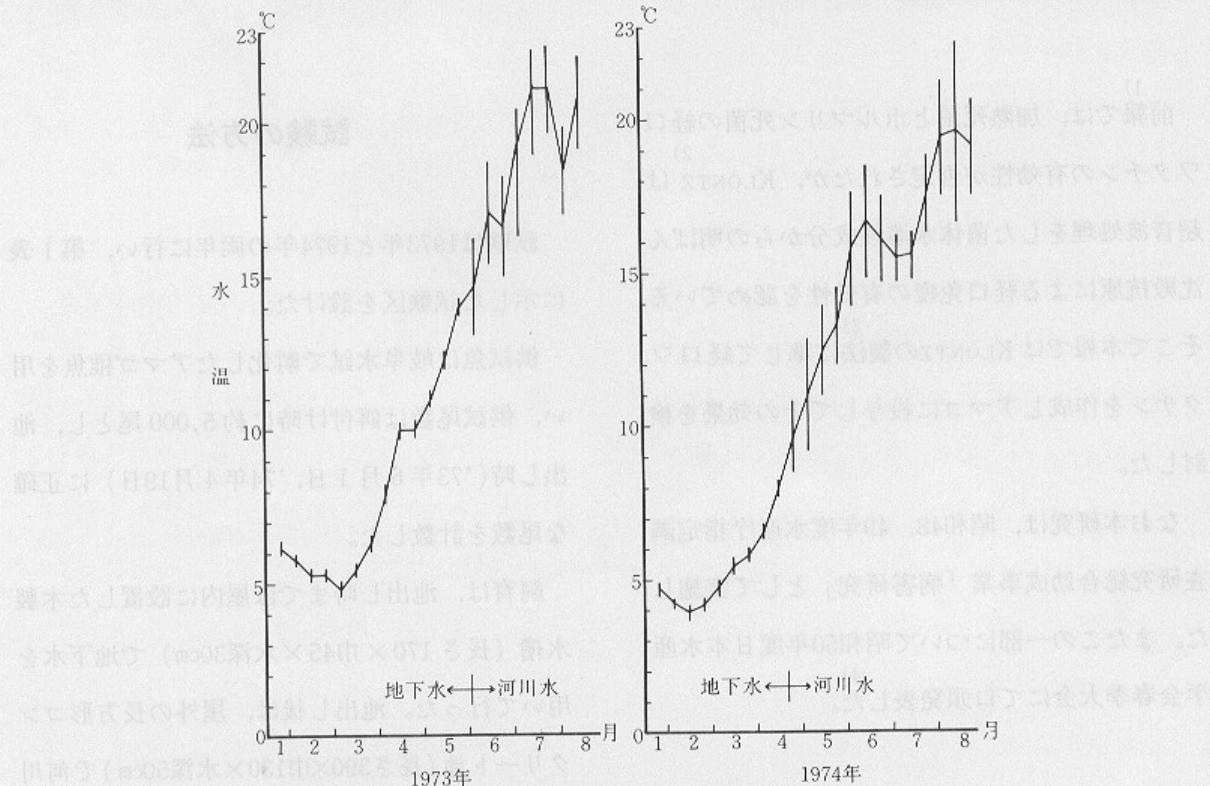
*1 湿菌重量 *2 同一試験区

ワクチンの製造は化学及び血清療法研究所に依頼した。使用した抗原は、東京・長野・岐阜・滋賀の各地で、1972年に分離された、*Aeromonas salmonicida* で、各株を等量に混合し、多価ワクチンとした。³⁾ 製法は KLONTZ に準じ、48時間培養菌体を超音波で破壊し、その遠心上清を凍結乾燥した。

ワクチン投与は、餌付け開始と同時に実行した。1973年の場合は、1月27日～2月10日まで15日間連続投与した後、5月19日まで1週間毎に15

回、合計30回の投与を行った。1974年の場合は、1月25日～2月14日まで21日間連続投与した後、1週間に2回、7月1日まで39回、合計60回の投与を行った。投与方法は、ワクチンを滅菌生理食塩水または無菌水で溶解し、飼料（餌付け粉末・クランブル）に吸着させて投与した。

1973年は8月20日、1974年は8月25日に試験を終了したが、池出し後の斃死魚について、その死因を肉眼観察または細菌分離によって推定し、自然発病による生残率、せっそう病斃死率



第1図 飼育水温(旬平均及び最高、最低水温)

を比較するとともに、数回の攻撃試験によってワクチン効果を検討した。また1973年には、7月20日に、各区10尾のプールサンプルとして、常法に従って凝集素価の測定を行った。

攻撃試験は、筋肉接種と菌浴の二通りを行った。供試した菌株は *A. salmonicida* G7202株で、供試前に2回魚体通過を行った。筋肉接種の場合は、普通寒天培地（ニッスイ）で20°C・48時間培養した菌体を、湿菌重量で0.005~50mcg/kg·BW, 0.1ml/尾づつ背部筋肉に接種した。菌浴の場合は、普通ブイヨン（ニッスイ）での、20°C・48時間振とう培養液（菌体+ブイヨン）を井戸水で100倍に稀釀したもの（ 10^7 cells/ml）に、供試魚を30分又は24時間浸漬した後、清水中に戻して観察を行った。供残尾数は各区10尾または20尾とした。

結 果

試験結果を第2表と第3表に、せっそう病の自然発病状況を第2図に、生残率・せっそう病斃死率の推移を第3図と第4図に、攻撃試験の結果を第4表~第7表に示した。なお、第2表、第3表中、斃死尾数内訳の「せっそう病」は、菌分離あるいは外観所見からせっそう病と判断したもの（水生菌着生魚を含む）、「水生菌症」は水生菌が着生し、せっそう病の外観所見が見られないもの、「不明」は外観所見がまったく見られないものの尾数である。尚せっそう病による斃死魚のうちでも、外観所見のないものが数多く見られ（特に流行盛期において）、「水生菌症」「不明」の中にも、せっそう病による斃死魚

第2表 経口ワクチン試験結果（1973年）

		無 投 与 区	投 与 I 区	投 与 II 区
ワクチン投与量		—	150mcg/尾/日・30回	300mcg/尾/日・30回
放養尾数	1月27日	約 5,000尾	約 5,000尾	約 5,000尾
	6月1日	4,310〃	4,360〃	4,390〃
生残尾数	8月20日	2,898〃	3,946〃	4,044〃
生残率		67.2%	90.5%	92.1%
斃死尾数(6月1日~8月20日)		1,412尾	414尾	346尾
内 訳	せっそう病	689〃	68〃	42〃
	水 生 菌 症	350〃	128〃	137〃
	不 明	373〃	218〃	167〃
せっそう病斃死率		16.0%	1.6%	1.0%
凝集素価	7月20日	32	32	32

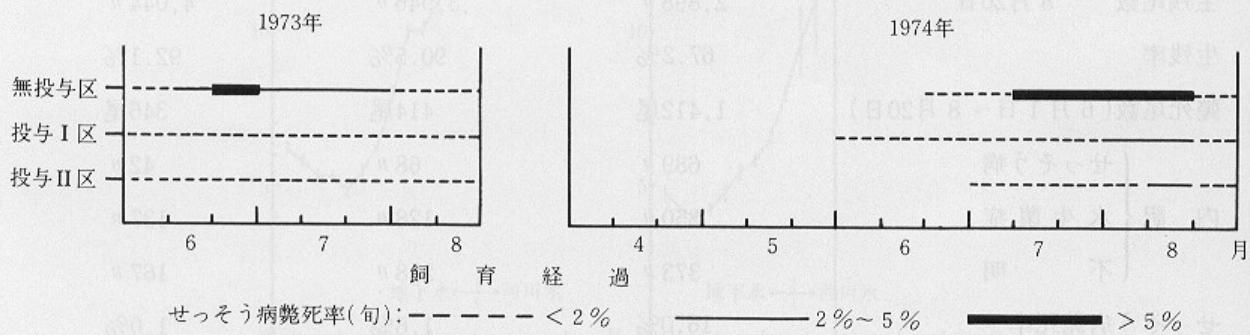
第3表 経口ワクチン試験結果（1974年）

	無 投 与 区	投 与 I 区	投 与 II 区	
ワクチン投与量	—————	150mcg/尾/日・60回	150mcg/尾/日・60回	
放養尾数 1月25日	約 5,000尾	約 5,000尾	約 5,000尾	
4月19日	4,750 "	4,750 "	4,750 "	
生残尾数 8月25日	2,990 "	3,962 "	4,002 "	
生残率	62.9%	83.4%	84.3%	
斃死尾数(4月19日～8月25日)	1,760尾	788尾	748尾	
内訳	せっそう病 水生菌症 不明	1,277 " 108 " 375 "	302 " 133 " 353 "	214 " 143 " 391 "
せっそう病斃死率	26.9%	6.4%	4.5%	

が含まれていると考えられるので、ワクチン効果の判定には、全斃死魚数と「せっそう病」斃死魚数の両者について検討した。

1973年の試験では、第2図に示すように、各区とも6月上旬よりせっそう病の自然発病が始まった。対照区では6月中旬より病勢が強くなり、6月下旬がそのピークで7月下旬まで比較的強い病勢を保ったのに対し、いずれのワクチ

ン投与区も散発的な発病しか見られなかった。飼育期間81日間の生残率は、対照区が67.2%であったのに対して、投与I区は90.5%，投与II区は92.1%であり、せっそう病斃死率も対照区の16.0%に対して、投与I区は1.6%，投与II区は1.0%であった。ワクチンの有効率を算出すると、投与I区71%（せっそう病斃死率では90%）投与II区76%（同94%）で、明らかにワクチン



第2図 セッソウ病自然発病状況

投与の効果が認められた。なお投与II区のワクチン投与量は、投与I区の倍量であったが、これらの中には、生残率、せっそう病斃死率ともに顕著な差は認められなかった。

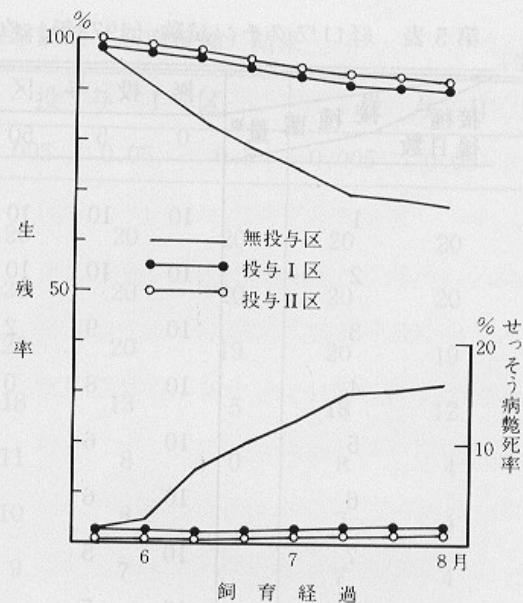
7月20日に測定した凝集素価は、各区とも32で、ワクチン投与区における凝集素価の上昇は認められなかった。

攻撃試験の結果については、7月下旬に実施した菌浴（第4表）では、処理後10日目の生残率（供残尾数各区20尾）は、対照区45%に対して、投与I区90%，投与II区75%で、投与区の生残率が高かった。8月中旬に実施した筋肉接種（第5表）では、50mcg/kg・BW接種の場合は、各区とも4—5日後に全数（供試尾数各区10尾）が斃死したが、5mcg/kg・BW接種の場合、接種

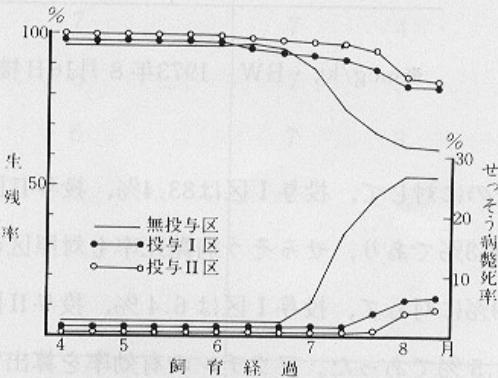
第4表 経口ワクチン試験（1973年）攻撃試験（菌浴）結果
(生残尾数)

処理後日数	無投与区	投与I区	投与II区
1	20	20	20
2	19	20	20
3	18	20	19
4	18	19	18
5	18	19	18
6	15	19	16
7	13	19	15
8	11	18	15
9	11	18	15
10	9	18	15

1973年7月22日処理 $10^7 \text{ cells/ml} \cdot 30\text{分浸漬}$
W.T. 21.2~22.1°C



第3図 生残率・せっそう病斃死率の推移(1973)



第4図 生残率・せっそう病斃死率の推移(1974)

8日後における生残尾数は、対照区5尾、投与I区8尾、投与II区8尾で、ワクチン投与区の方が多い傾向が見られた。

1974年の試験におけるせっそう病自然発病状況は、第2図のように、対照区は6月下旬より発病が始まり、7月中旬～8月中旬に高い斃死率を示した。投与I区は6月上旬より発病が始まったが、8月上旬～中旬に比較的病勢が強まつたのみで、他の時期は散発的であった。投与II区も7月上旬より発病が始まったが、8月中旬にやや斃死率が高くなったのみであった。飼育期間129日間の生残率は、対照区が62.9%であ

第5表 経口ワクチン試験（1973年）攻撃試験（筋肉接種）結果 (生残尾数)

接種後日数	接種菌量*	無投与区			投与I区			投与II区		
		0	5	50	0	5	50	0	5	50
1		10	10	10	10	10	10	10	10	10
2		10	10	10	10	10	10	10	10	10
3		10	9	2	10	10	2	10	10	7
4		10	8	0	10	10	0	10	10	1
5		10	6		10	8		10	10	0
6		10	6		10	8		10	9	
7		10	5		10	8		10	8	
8		10	5		10	8		10	8	

※mcg/kg・BW 1973年8月16日接種 W.T.20.0~21.3°C

ったのに対して、投与I区は83.4%，投与II区は84.3%であり、せっそう病斃死率も対照区の26.9%に対して、投与I区は6.4%，投与II区は4.5%であった。ワクチンの有効率を算出すると、投与I区55%（せっそう病斃死率では76%）、投与II区58%（同83%）で、明らかにワクチン投与の効果が認められた。投与I区と投与II区は、試験の信頼性を高めるために同一試験区を設定したものであるが、これらの間には生残率、せっそう病斃死率ともに有意差は認められなかった。

攻撃試験については、9月下旬に実施した菌浴（第6表）では、処理後7日目に無投与区で全数（供試尾数各区20尾）が斃死したのに対し、投与I区は2尾、投与II区は1尾の生残魚が見られた。同時に実施した筋肉接種（第7表）では、3段階の接種菌量による攻撃とも無投与区

第6表 経口ワクチン試験（1974年）攻撃試験（菌浴）結果 (生残尾数)

処理後日数	無投与区	投与I区	投与II区
1	20	20	20
2	20	20	20
3	17	17	16
4	4	4	4
5	1	4	4
6	1	2	1
7	0	2	1
8		2	1
9		2	1
10		2	1
11		2	1
12		2	1

1974年9月21日処理 10⁷cells/ml・24時間浸漬 W.T. 15.0~17.9°C

第7表 経口ワクチン試験(1974年)攻撃試験(筋肉接種)結果

(生残尾数)

接種後日数 菌量*	無投与区			投与I区			投与II区		
	0.005	0.05	0.5	0.005	0.05	0.5	0.005	0.05	0.5
1	20	20	20	20	20	20	20	20	20
2	20	20	20	20	20	20	20	20	20
3	20	20	18	20	20	19	20	19	19
4	17	13	7	18	13	5	18	12	7
5	11	4	2	11	8	0	8	4	1
6	8	4	2	10	8		7	4	1
7	8	4	2	9	7		7	4	1
8	8	4	2	9	7		7	4	1
9	8	4	2	9	7		7	4	1
10	8	4	2	9	6		7	3	1
11	8	4	2	9	6		7	3	1
12	7	4	2	9	6		7	3	1
13	5	4	2	9	6		7	3	1
14	5	4	2	9	6		7	3	1

*mcg/kg・BW 1974年9月21日接種 W.T. 17.4~17.9°C

と投与区の間に、生残率の差は認められなかつた。

考 察

せっそう病に対する経口ワクチンについての既往の研究は、有効性の認められるものと認められないものとに二分されている。

最初の有効例は DUFF (1942)⁵⁾ によるクロロホルム死菌の投与試験である。その結果は、投

与区に対照区より高い凝集価を認め、また攻撃試験でも投与区の斃死率は対照区に比して低く、ワクチン効果が認められたとした。しかし、KRANTZら(1964)⁶⁾ は、DUFF の追試と共に生菌の投与を行ったが、いずれの投与区も凝集価の上昇は認められなかったとしている。また SNIESZKO ら (1949)⁷⁾ は加熱死菌、SPENCE ら (1965)⁸⁾ はホルマリン死菌の投与を試みたが、いずれも有効性を認めていない。著者ら (1972)¹⁾ と、東京水試 (1971)⁹⁾ も加熱死菌、ホルマリン死菌をそれぞれアマゴ、ヤマメに投与したが有

効性は認められなかった。

一方 KLONTZ (1966)²⁾ は、超音波処理をした菌体の水溶性成分からの明斑沈殿抗原 (Hagerman strain) (以下 FSA と称する) を brook trout に 60mcg/尾, 25回投与した所、蛍光抗体法により抗体が検出され、自然感染による斃死率も投与区 0%, 対照区は 58% と著しい効果を認めている。また OVERHOLSER (1968)¹⁰⁾ は、 FSA (Siletz strain) を coho salmon に 160~380 mcg/尾, 20~30回投与し有効性を認めている。

これらの 2 例は、投与区の供試尾数が 100 ~ 150 尾と実験室段階のものであったが、KLONTZ (1967)¹¹⁾ は、360,000 尾の coho salmon に FSA (Hagerman strain) を 33mcg/尾, 16回投与し、自然感染による斃死率が投与区 5.6%, 対照区 11.4% とやや投与区が低い結果を得ている。更に KLONTZ (1968)¹²⁾ は 3 箇所のふ化場において、商品化された FSA (Issaquah strain) と加熱死菌 (Quilcene strain) を、200,000~1,160,000 尾の coho salmon に 150mcg/尾, 15回投与したが、自然発病による斃死率はいずれの投与区も対照区と差がなかったとしている。

KLONTZ らの一連の試験において実験室段階では著効が得られたのに、ふ化場における大規模な投与試験では充分な効果が認められなかつた理由として、KLONTZ¹¹⁾ は供試した *A. salmonicida* の strain 間の血清学的な差異と、商品化された FSA は、経口投与では抗体形成部位へ充分量到達し得ないためではないかと推察している。

以上のように実験例によって異った成績が得られているが、本試験の結果を検討すると、19

73年、1974年とも著しいワクチンの有効性が認められた。本試験では春期から夏期にかけてのせっそう病自然発病期における生残率を、ワクチン有効性の判定基準としているので、その実用性は高いと考えられる。また、自然発病を基準とする場合、試験結果の信頼性が問題になると考えられるが、本試験では両年とも投与区を 2 区づつ設置し、特に 1974 年は同一条件の投与区を 2 区設置して、両区とも同程度の高い有効性を示したので、その信頼性は高いと思われた。

投与区と無投与区の自然発病による生残率の差は 21~25%, せっそう病斃死率の差は 14~22 % であり、アマゴ 0 年魚の池中養殖での春期から秋期までの歩留りは通常 7 割前後であるので、これらの斃死率の差、すなわちワクチン投与の意義は大きいと思われた。

攻撃試験については、1973 年には菌浴、筋肉接種の二通りの攻撃方法とも投与区の方が生残尾数が多く、自然発病において認められたワクチン効果を裏づける結果であった。1974 年には、自然発病においてワクチン効果が認められたにもかかわらず、いずれの攻撃方法でも投与区と無投与区との間に生残尾数の差は認められなかつた。

この両年の攻撃試験結果の差異の原因としてワクチン投与から攻撃試験までの日数の差が考えられた。すなわち連続投与終了後から攻撃試験までの日数は、1973 年の薬浴の場合 161 日、筋肉接種の場合 185 日であったのに対し、1974 年はいずれも 218 日であった。この傾向は、せっそう病研究会で本試験と同様な経口ワクチン

投与試験を行った各地の試験例でも認められ,
免疫の持続性を今後更に検討する必要があると思われた。⁴⁾

凝集素価については、DUFF⁵⁾はクロロホルム死菌投与区が対照区より高かったとしているが、本試験では、凝集素価の上昇は認められなかつた。また KRANTZ⁶⁾らもクロロホルム死菌投与、生菌投与の場合に凝集素価の上昇は認められなかつたとしている。これらのことから本試験における経口ワクチンの有効性には、細胞性免疫が関与しているものと推察された。

投与量については、本試験では150mcg/尾と、300mcg/尾のいずれの投与量でも有効であったが、KLOONTZ⁷⁾らの一連の研究では33~60mcg/尾の投与量での有効例もあり、今後更に減少させ得る可能性があると思われた。

投与回数については、本試験では30回又は60回の投与を行ったがいずれも有効であった。経口ワクチンのフィールドへの応用に際して、投与回数を減少させることは、労力軽減の意味が大きいので、今後更に検討したい。

本試験では両年の試験とも餌付け開始と同時にワクチン投与を開始し有効性を認めたが、せっそう病研究会における各地の試験では、ワクチン投与開始が餌付け1ヶ月後の場合の無効例⁴⁾が見られた。また OVERHOLSER¹⁰⁾も投与時期が早い方が有効性が高い傾向を認めており、今後も経口ワクチンの投与開始は餌付けと同時に行うべきであると思われた。

攻撃試験の方法としては、なるべく自然感染に近い方法が望まれるところである。本試験で

は従来から行われている生菌筋肉接種の他に、菌浴すなわち飼育水への生菌添加を試み、飼育水1ml中に *A. salmonicida* を10 cells 浮遊させて、30分又は24時間浸漬することでワクチン無投与魚に対する斃死率をそれぞれ55%, 100%とし得た。今後更に菌数、水温、浸漬時間などの細い検討を行えば、せっそう病の人工感染のすぐれた方法の一つになり得ると思われた。

要 約

1. アマゴ0年魚に超音波処理をした経口ワクチンを投与し、効果を検討した。
2. 自然発病による生残率、せっそう病斃死率からは著明なワクチン効果が認められた。
3. 攻撃試験でワクチン効果の認められない例があり、免疫の持続に問題があると思われた。
4. ワクチン投与区に凝集素価の上昇は認められず、細胞性免疫が関与していると思われた。
5. 投与量、投与回数とも減少させ得る可能性が残された。
6. ワクチン投与開始は餌付けと同時に行うべきであると思われた。
7. 攻撃方法として菌浴感染に成功した。

文 献

- 1) 森川進・熊崎隆夫, 1972; せっそう病に関する研究—IV, アマゴに対する

- 経口ワクチン投与について、岐水
試研報No.17, pp51~54
- 2) KLONTZ, G.W. 1966 ; Immunopathology,
In Progress in Sport Fishery Research, 1965, 11~12. Resource Publ. 17, Bur. Sport Fish. Wildl.
- 3) —————— 1970 ; Oral Immunization of Salmonids Against Furunculosis and Alum-Precipitated *Aeromonas salmonicida* Antigenic Fraction Therefor, U. S. Patent office 3,492,400
- 4) せっそう病研究会 1975; 在来マス類に対するせっそう病経口ワクチン投与について, 昭和50年4月, 日本水産学会講演
- 5) DUFF, D.C.B. 1942, The Oral Immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. J.Immunol. 44 pp87~94
- 6) KRANTZ, G.E., J.M. REDDECLIFF, and C. E. HEIST, 1964 ; Immune Response of trout to *Aeromonas salmonicida*. Part II. Evaluation of Feeding Techniques. Progressive Fish-Culturist 26 (2) pp65—69
- 7) SNIESZKO, S.F., and S.B. FRIDDLE 1949 ; Prophylaxis of Furunculosis in Brook Trout(*Salvelinus fontinalis*) by Oral Immunization and Sulamerazine. Progressive Fish-Culturist 11 pp161~168
- 8) SPENCE, K.D., J.L. FRYER, and K.S. PILCHER, 1965 ; Active and Passive Immunization of Certain Salmonid fishes against *Aeromonas salmonicida*. Can. J.Microbiol. 11 pp397~405
- 9) 東京都水試, 1971 ; 昭和45年度病害研究最終報告書
- 10) OVERHOLSER, D.L. 1968 ; Control of furunculosis in Pacific salmon by immunization. M.S.thesis, 58pp. Oregon State University.
- 11) KLONTZ, G.W. 1967 ; Immunopathology. In Progress in Sport Fishery Research, 1966, 81~82, Resource Publ. 39. Bur. Sport Fish. Wildl.
- 12) —————— 1968 ; Ditto. Ibid. 1967, 8~12. Resource Publ 64. Bur. Sport Fish. Wildl.