

サケ科魚類β溶血性連鎖球菌症不活化注射ワクチンの ヤマメに対する有効性

中居 裕・小松 功*

Effectiveness of β-haemolytic Streptococcal Bacterin by Injection
against Yamame Salmon (*Oncorhynchus masou masou*)

Yutaka NAKAI・Isao KOMATU*

サケ科魚類のβ溶血性連鎖球菌症は、以前は散発的に発病が見られる程度であったが、1994年（いわゆる記録的猛暑の年）以降、局地的に流行がはじまり、1998年度現在、12県で発生が報告されている（全国養鱒技術協議会調査）。本病は累積斃死率が高い事例も多いこと、1kgを越える魚でも発病すること及び、投薬後2～3週間で斃死率が再び上昇するなど、投薬効果が小さいなどの理由で、発病している養魚場によっては深刻な被害を及ぼしており、ワクチン開発が期待されている。

本ワクチンはニジマスに対してその有効性が報告されている¹⁾ため、その他のサケ科魚類に対する有効性を検討するために、本研究を実施した。

方 法

(1) 試験期間：1998年8月21日～9月4日

(2) 供試魚：ヤマメ（当场累代飼育：東京都多摩川産）
平均体重13.75g（ワクチン接種時）

供試2週間位前までカラムナリス病による斃死が見られたが、その後の斃死がなかったため、供試時には健康と判断した。

(3) 供試薬剤：サケ科魚類β溶血性連鎖球菌症不活化注射ワクチン（X-13：Lot3）

供試薬剤の製造方法

BHI液体培地に*Streptococcus iniae* KS-13M株を接種し、25℃で24時間攪拌培養した。これにホルマリンを0.3%となるように添加し、25℃で24時間放置して不活化した。不活化した後は4℃で保存した。

不活化前の生菌数は 1×10^8 個/mlであった。

(4) 接種方法

① ワクチン0.1ml接種区

供試薬剤をよく振り混ぜた後、魚1尾当たり0.1mlずつ日生研式連続注射器で腹腔内に接種した。

② ワクチン0.2ml接種区

同様に1尾当たり0.2mlずつ接種した。

③ 対照区：無処理とした。

なお、供試魚は、供試前3日間は餌止めし、供試前日に選別した。

供試薬剤接種時には、麻酔（FA100：0.2ml/l液温18.5℃）した。

(5) 収容池

各区それぞれ300尾を当场コンクリート製屋外池（4.0m×1.4m×0.6m [水深]）3面に収容した。飼育水は河川水で、注水量は1.5l/秒とした。

(6) 収容期間：14日間とした。

(7) 収容期間中の観察項目（安全性）

遊泳・摂餌行動・体色・斃死数及び成長率を観察した。

(8) 有効性：自然発病がなかったため、攻撃試験により

* 共立商事株式会社

有効性を確認した。

- ① 攻撃用菌株：*Streptococcus iniae* KS-13C株
- ② 攻撃用菌株の調製
ソイビン・カゼイン・ダイジェスト液体培地に凍結保存しておいた攻撃用菌株を接種し、25℃で24時間、静置培養した。
- ③ 攻撃用菌株の毒力の確認
ヤマメに対する本菌の毒力を明らかにするため、攻撃試験前に腹腔内接種でおよそのLD₅₀を算出した。

供試魚：各区1接種区当たり10尾（対照区のみ20尾）を供試した。

攻撃法：調製した菌株を生理食塩水で10⁻²～10⁻⁷に10倍階段希釈した菌液を腹腔内に0.1ml/尾接種した。対照区は生理食塩水で10⁻²に希釈したソイビン・カゼイン・ダイジェスト液体培地を用いた。接種時には浸漬法により麻酔（FA100：0.2ml/ℓ 液温19.5℃）した。

飼育：接種後、20ℓプラスチック水槽（実容18ℓ）に収容した。用水は井戸水を循環用クーラーで冷却して注水（570ml/分）した。給餌は、配合飼料を適宜少量給餌した。なお、飼育排水は、塩化ベンザルコニウム溶液濃度が20ppmとなるように滴下して、30分以上滞留させてから排出した。

水温：18℃となるように投げ込み式ヒーターを用いて調整した。

観察：攻撃後13日間観察した。斃死魚はBHI寒天培地を用いて腎臓からの細菌分離を行い、本菌による斃死を確認した。生残魚についても同様の細菌分離を実施した。本菌の同定は共立商事（株）作製の抗血清を用いたスライド凝集試験で行った。

④ 攻撃実験

供試魚：各区1接種区当たり20尾を供試した。

攻撃法：予想されるLD₅₀とその1/10と10倍の3つの菌量区を設定した。麻酔液温が18.8℃、対照区が生理食塩水で10⁻³に希釈したソイビン・カゼイン・ダイジェスト液体培地を用いた以外は「③攻撃用菌株の毒力の確認」と同じ方法

であった。

飼育：「③攻撃用菌株の毒力の確認」と同じであった。

水温：18℃となるように投げ込み式ヒーターを用いて調整した。

観察：攻撃後14日間観察した。その他は「③攻撃用菌株の毒力の確認」と同じであった。

有効性：各区の生残率の比較により有効率を算出した。

結 果

(1) ワクチン接種後の飼育成績

飼育期間中に斃死は無かった。8月25～29日に濁水による摂餌不良があった。

特に対照区は試験開始から7日間ほどは他の2区に比べて落ち着きがなかった。

詳細は第1表に示した。

(2) 攻撃用菌株の毒力

水温は17.5℃～20.0℃の範囲内であった。

菌液（原液）の生菌数は3.2×10⁸CFU/mlであった。

結果を第2表に示した。

斃死魚は腹膜の出血や腸の炎症、腎臓肥大、肛門腫脹、眼球突出などの症状が認められた。

本試験においてはLD₅₀の算出は出来なかった。

攻撃試験の接種菌量は3.2×10³CFU/尾、3.2×10³CFU/尾、3.2×10⁴CFU/尾とすることとした。

(3) 攻撃試験

菌液（原液）の生菌数は3.2×10⁸CFU/mlであった。

水温は18.0℃～19.0℃の範囲内であった。

結果を第3表に示した。

斃死魚は腹膜の出血や腸の炎症、腎臓肥大、肛門腫脹、眼球突出などの症状が認められた。

3.2×10⁴CFU/尾接種の場合、FISHERの直接確率計算法による有意差検定では、0.1ml及び0.2ml接種区ともに有意差（P≤0.05）があった。有効率は0.1ml及び0.2ml接種区ともに35.3%であった。

3.2×10³CFU/尾接種の場合、有意差検定では、0.1ml接種区では有意差（P>0.05）は無く、0.2ml接種区では有意差（P≤0.01）が見られた。有効率

第1表 飼育成績 (1998年8月21日～9月4日)

実験区	0.1ml接種区	0.2ml接種区	対照区
開始時 総重量 (kg)	4.18	4.11	4.30
尾数	304	299	313
平均体重 (g)	13.75	13.75	13.75
終了時 総重量 (kg)	4.95	4.90	5.00
尾数	304	299	313
平均体重 (g)	16.28	16.39	15.97
斃死尾数	0	0	0
不明尾数	0	0	0
生残率 (%)	100	100	100
給餌量 (g)	960	996	974
増重量 (g)	770	790	700
飼料効率 (%)	80.2	79.3	71.9
増重倍率 (%)	118.4	119.2	116.1
日間給餌率 (%/日)	1.38	1.39	1.42
日間成長率 (%/日)	1.28	1.29	1.28

第2表 攻撃用菌株の毒力測定試験

接種菌数(×3.2CFU/尾)	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	対照
供試尾数	10	10	10	10	10	10	20
累積斃死尾数	6	9	8	7	9	9	0
原因菌分離	6	9	8	7	9	9	-
累積斃死率(%)	60	90	80	70	90	90	0
生残尾数	4	1	2	3	1	1	20
症状発現魚	0	0	1	3	1	1	0
原因菌分離	-	-	1	3	1	1	-
症状無発現魚	4	1	1	0	0	0	20
原因菌分離	1	0	1	-	-	-	0

第3表 攻撃試験結果

攻撃菌数	3.2×10 ⁴ CFU/尾			3.2×10 ³ CFU/尾			3.2×10 ² CFU/尾			無処理対照区		
	0.1ml	0.2ml	対照区	0.1ml	0.2ml	対照区	0.1ml	0.2ml	対照区	0.1ml	0.2ml	対照区
供試尾数	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
累積斃死尾数	11	11	17	6	3	12	6	5	17	0	0	0
原因菌分離	11	11	17	6	3	12	6	5	17	0	0	0
累積斃死率(%)	55	55	85	30	15	60	30	25	85	0	0	0
生残尾数	9	9	3	14	17	8	14	15	3	20	20	20
症状発現魚	5	2	3	1	6	6	0	3	2	0	0	0
原因菌分離	5	2	3	1	6	6	-	3	2	-	-	-
症状無発現魚	4	7	0	13	11	2	14	12	1	20	20	20
原因菌分離	3	6	-	12	6	2	10	7	1	0	0	0
有意差	有	有	-	無	有	-	有	有	-	-	-	-
	P≤0.05	P≤0.05		P>0.05	P≤0.01		P≤0.01	P≤0.01				
有効率 (%)	35.3	35.3	-	50.0	75.0	-	64.7	70.6	-	-	-	-

は0.1ml接種区では50%、0.2ml接種区では75%であった。

3.2×10³CFU/尾接種の場合、有意差検定では0.1ml及び0.2ml接種区ともに有意差（P ≤ 0.01）が見られた。有効率は0.1ml接種区では64.7%、0.2ml接種区では70.6%であった。

考 察

飼育成績では、対照区の飼料効率が他の2区に比べて悪かった。試験開始から7日間ほどは他の2区に比べて落ち着きがなく、その結果として残餌が多く出たものと思われる。そのほかは特に問題となることはなかったため、ワクチン接種による飼育成績への影響はないものと考えられた。

攻撃用菌株の毒力測定では、3.2CFU/尾の接種で60%の累積斃死率があることから、腹腔内接種における本菌のヤマメへの病原性は極めて強いものと考えられた。ただし、接種菌数を増やしても、累積斃死率が100%となることはなかった。一方、3.2×10²CFU/尾以上の菌数を接種した生残魚からはすべて接種菌が再分離された。それら供試魚には、10²CFU接種区の1尾を除くすべてに症状が発現していた。このことから、正確な累積斃死率を出すには実験期間をもう少し長く設定する必要があるものと考えられた。

攻撃試験の結果、0.1ml及び0.2ml接種区ともに有効率60%以上の区があったため、本ワクチンは実験条件下では有効と判断された。

ワクチン効果の傾向としては、0.1ml接種区よりも0.2ml接種区の方が有効率が高く、接種菌濃度の低いほど高い傾向にあった。

攻撃用菌株の毒力測定試験と同様に、生残魚の多くから接種菌が再分離され、症状が発現していた供試魚も多く存在した。このことから、本実験の正確なワクチン効果を見るには観察期間を延長する必要があるものと考えられた。

ただし、生残魚からの接種菌の再分離を比較すると、すべての対照区の生残魚からは接種菌が再分離されたのに対し、ワクチン区には接種菌が再分離されない供試魚が存在した。その数は0.1ml接種区よりも0.2ml接種区の方が、また接種菌数の少ないほど多い傾向にあった。このことから、ワクチン接種魚は接種菌を体内から排除している可能性が考えられる。

ニジマスに本症不活化ワクチンを腹腔内接種した場合、本症原因菌接種後24時間以内に体内から排除された例²⁾があるが、本研究の場合はそれほど顕著な効果ではなかった。その原因は不明であるが、さらなる改善により、体内から原因菌をより効果的に排除できる可能性を示しているものと考えられるため、それら方策を検討する必要があるものと思われる。

したがって、今回使用したワクチンの効果については、効果判定試験の観察期間を延長して再評価する必要があるものの、有効率60%以上の実験区があることと、接種菌が排菌された個体もあることを考えると、ニジマス以外のサケ科魚類においても実用化の可能性のあるワクチン効果があったものと思われる。

要 約

1. サケ科魚類β溶血性連鎖球菌症不活化注射ワクチンはヤマメに対して、高い有効性を示した。
2. ワクチン接種区の生残魚からは、接種菌が再分離されない供試魚が存在した。
3. 上記の結果から、ニジマス以外のサケ科魚類においても実用化の可能性のあるワクチン効果があったものと考えられた。

文 献

- 1) SAKAI, M, R. KUBOTA, S. ATSUTA, and M. KOBAYASHI, 1987 ;Vaccination of Rainbow Trout *Salmo gairdneri* β-haemolytic Streptococcal Disease.Nippon suisan Gakkaishi,53,1373-1376.
- 2) SAKAI, M, S. ATSUTA, and M. KOBAYASHI, 1989;Protective Immune Response in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*,Vaccinated with β-haemolytic Streptococcal Bacterin. Fish Path,24,169-173.