

# スギの類結節症に対するブリ用類結節症ワクチンの有効性 (安全・安心な養殖魚生産体制整備事業)

中村博幸\*<sup>1</sup>, 知名真智子

## The Efficacy of Pseudotuberculosis Vaccine for *Seriola* against Pseudotuberculosis in cultured *Cobia*

Hiroyuki NAKAMURA\*<sup>1</sup> and Machiko CHINA

スギの類結節症対策を検討するため、魚体重別 (16g、55g、180g) にブリ用類結節症ワクチンを投与し、その有効性を試験した。ワクチン投与から1, 2, 3週間後に類結節症細菌による攻撃を行った結果、16gはワクチン投与3週間後に、55gは1週間及び3週間後に、180gはすべての場合において、死亡軽減の効果が認められた。従って、ブリ用類結節症ワクチンはスギの類結節症に対しても死亡の軽減効果があると判断された。

類結節症は1969年に国内の養殖ブリで初めて確認され(楠田ら, 1970), それ以降ブリ養殖では最も被害の大きい魚病となっている。沖縄県のスギ養殖においても、類結節症による被害が毎年のように発生し(玉城ら, 2008), 大きな被害を与えている。数gの種苗から2kg以上の成魚においても発症が確認されており(中村ら, 2006), 過去5カ年の被害額は約4百万円以上にのぼると推測される。そのため漁業者からは、ワクチン開発による予防技術確立の要望が強い。しかし、ワクチンを用いたスギの魚病対策に関する知見は少なく、さらに、技術面や予算面においてもスギ用類結節症ワクチンの開発には多くの課題がある。

このような中、平成21年1月にブリ用の類結節症ワクチン(アジュバンド加の類結節症および連鎖球菌混合ワクチン)が認可され、ブリ属養殖における魚病被害の軽減、さらには他魚種への適応拡大が期待される場所である。そこで、ブリ用ワクチンがスギの類結節症対策に有効かどうか調べた。

### 方法

#### 1. 供試魚およびワクチン投与

供試魚には、沖縄県栽培漁業センターで生産された類結節症やその他疾病の発生歴の無い健康なスギ人工種苗(平均魚体重16, 55, 180g)を用いた。魚体重別にFRP製1kL水槽を2面設けてワクチン区と対照区とし、同尾数(16gと55gは60尾, 180gは45尾)の供試魚を収容した。ワクチン区の供試魚には、ブリ用の類結節症・ $\alpha$ 溶血性レンサ球菌症不活化ワクチン(インターベット社製: 油性アジュバンド加ワク

チン)を腹腔内に0.1mL/尾注射投与した。ワクチンの投与は、魚体重16gおよび55gは2009年11月20日、魚体重180gは2010年2月12日に行った。両区の供試魚は、攻撃試験に供するまで砂濾過海水のかけ流しによる流水飼育を行い、海産魚類用EP飼料を週3回、飽食量与えた。

#### 2. 攻撃試験

ワクチン投与から3週間後まで、1週間間隔でワクチン区と対照区から供試魚を16gと55gの場合は20尾ずつ、180gは15尾ずつ取り上げ、類結節症細菌の攻撃を行った。攻撃試験に用いた供試細菌は、2009年3月27日に糸満市地先の養殖場で養殖されていた羅病スギから分離・保存した類結節症細菌株である。菌分離にはBHI培地を用い、菌保存にはスキムミルク法(保管温度は $-80^{\circ}\text{C}$ )を用いた。攻撃試験の際には、保存していた菌株をBHI培地に接種して $25^{\circ}\text{C}$ で約24時間培養後、生えた1コロニーをBHI液体培地に懸濁して $25^{\circ}\text{C}$ で20時間培養し、培養菌液の菌量を $1.5\sim 2.1\times 10^2\text{CFU/mL}$ に調整して試験に供した。調整した菌液を、16gと55gは1mL/尾、180gは3mL/尾、腹腔内に注射攻撃した。攻撃後の魚は、図1のとおり魚体重別およびワクチン投与からの経過週別にワクチン区と対照区の水槽を新たに設け、表1のとおり魚体重別のワクチン1~3区および対照1~3区に収容した。攻撃終了から15日間飼育を行い、死亡の有無を観察した。飼育期間中は、砂濾過海水のかけ流しによる流水飼育を行い、海産魚類用EP飼料を週3回、飽食量与えた。

\* Email : nakamuhi@pref.okinawa.lg.jp.

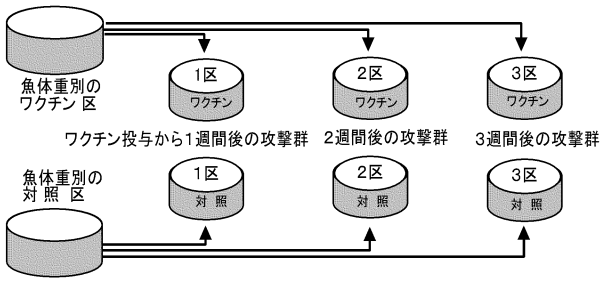


図1 攻撃後の試験魚の区分け

表1 攻撃試験の試験区

平均魚体重 (g)	試験区		
	類結節症細菌攻撃時のワクチン投与からの経過週		
	1週間後	2週間後	3週間後
16	ワクチン1区	ワクチン2区	ワクチン3区
	対照1区	対照2区	対照3区
55	ワクチン1区	ワクチン2区	ワクチン3区
	対照1区	対照2区	対照3区
180	ワクチン1区	ワクチン2区	ワクチン3区
	対照1区	対照2区	対照3区

3. 死亡魚の検査と統計解析

死亡した魚は、類結節症の特徴的な症状である腎臓や脾臓の1mm前後の小白点の有無を確認し、併せてBHI寒天培地を用いた菌分離を行い、類結節症による斃死か判断した(金井, 1996)。ワクチン投与による死亡低減の効果を判定するため、ワクチン投与後の経過週別にワクチン区と対照区の死亡尾数の差の有意性について、Fisherの正確確率検定 ( $P < 0.05$ ) で統計的に解析した。

結果および考察

すべてのワクチン区において、供試魚は投与翌日から摂餌を開始し、遊泳等も正常で、ワクチン投与による悪影響は観察されなかった。

魚体重別の各試験区におけるワクチン区と対照区の累積死亡率を表2に、死亡の推移を図2A-Cに示した。

表2 魚体重別のワクチン区と対照区における累積死亡率

平均魚体重 (g)	試験区	累積死亡率 (%)		
		類結節症細菌攻撃時のワクチン投与からの経過週		
		1週間後	2週間後	3週間後
16	ワクチン区	85.0	75.0	70.0*
	対照区	100	90.0	100
55	ワクチン区	70.0*	70.0	60.0*
	対照区	95.0	80.0	90.0
180	ワクチン区	33.3*	26.6*	26.6*
	対照区	73.3	80.0	73.3

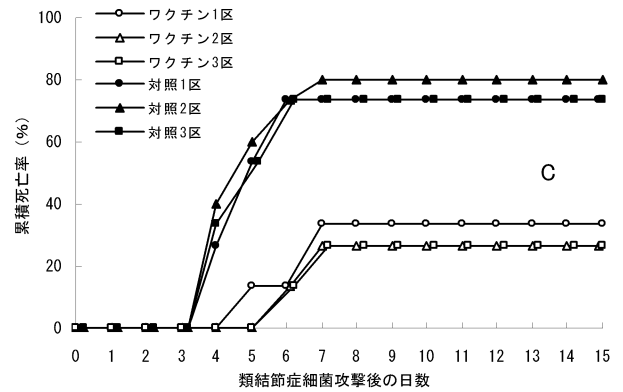
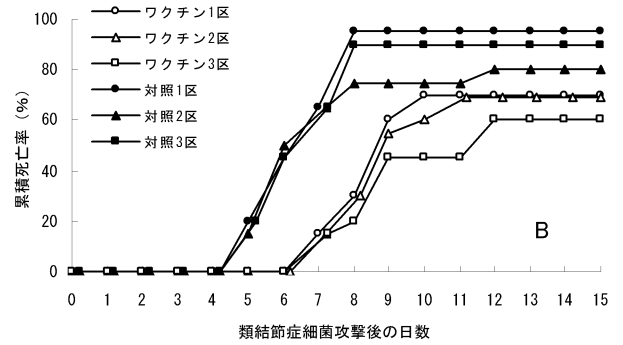
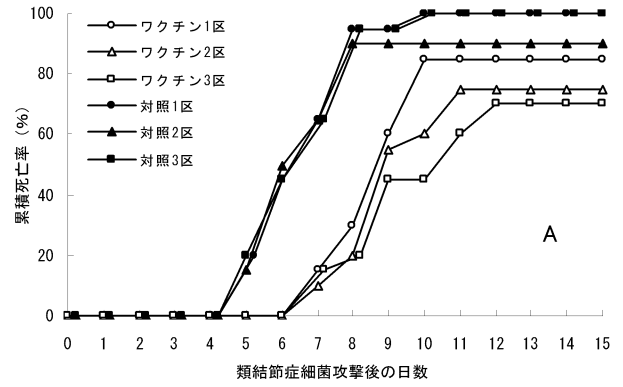


図2 魚体重別の類結節症細菌による攻撃試験の結果 (A; 16g, B; 55g, C; 180g)

魚体重16gのワクチン区は、攻撃7日後から12日後まで死亡がみられた。累積死亡率は、ワクチン1区は85.0%, 2区は75.0%, 3区は70.0%で、投与から攻撃まで長く経過している区ほど死亡率は低くなった。また対照区は、攻撃4日後から10日後まで死亡魚が観察された。累積死亡率は、対照1, 3区は100%, 2区は90%であった。

魚体重55gのワクチン区は、攻撃7日後から12日後まで死亡が観察された。累積死亡率は、ワクチン1, 2区は70.0%, 3区は60.0%であった。対照1~3区では、攻撃5日後から8日後まで連続して死亡が観察され、対照2区のみさらに12日後に1尾の死亡が観察された。累積の死亡率は、対照1区は95.0%, 2区は80.0%, 3区は90.0%であった。

魚体重180g区のワクチン区は、攻撃5日後から7日後まで死亡がみられ、累積の死亡率は26.6~33.3%であった。16, 55gのワクチン区と比較した場合、死亡率は明らかに低い値

を示した。一方対照区は、攻撃4日後から7日後まで死亡が観察され、魚体重16gと55gの対照区同様に、累積死亡率73.3～80.0%という高い死亡率であった。なお、各魚体重の試験区で確認された死亡魚は、すべて類結節症による死亡と診断された。

以上のとおり、類結節症細菌を攻撃した場合の死亡の推移は、魚体重に関係なく、対照区が攻撃3、4日後に死亡魚が観察され、2日ほど遅れてワクチン区でも死亡魚が観察されるという傾向であった。福田、楠田ら（1981）が魚体重10g程度のハマチに対して行った類結節症細菌の攻撃試験では、攻撃方法は異なるが、攻撃2日後から5日後まで死亡が確認されており、スギもハマチ同様に攻撃後数日で死亡することがわかった。

各魚体重について、ワクチン投与からの経過週ごとにワクチン区と対照区の死亡尾数の差について有意差判定を行った。魚体重16gの場合、ワクチン1区と対照1区、ワクチン2区と対照2区の間には有意な差はみられなかった。しかし、ワクチン3区と対照3区では、ワクチン区の死亡尾数が有意に少なく（ $P<0.05$ ）、ワクチンの有効性が確認された。これらのことから、魚体重16g程度のスギの場合、類結節症に対する免疫を獲得するのに、ワクチン投与から3週間程度要すると考えられる。魚体重55gでは、ワクチン1区と対照1区、ワクチン3区と対照3区において、ワクチン区の死亡尾数が有意に少なく（ $P<0.05$ ）、ワクチン投与による死亡軽減効果が認められた。しかし、ワクチン2区と対照2区では、両区に有意な差は認められなかった。他の試験と比較した場合、対照区の斃死率が若干低めに推移しているため有意差が出なかったことが考えられる。使用した菌の病原性が弱まったことや、菌量の調整に不備があった事等が考えられるが、はっきりとした原因はわからなかった。ただ、ワクチン投与から1および3週間後の試験ではワクチンの有効性が確認されており、55g程度のスギの場合、ワクチン投与3週間以内で類結節症に対する免疫を獲得する事が示唆された。魚体重180gの場合、すべての試験区においてワクチン区の死亡尾数が有意に少なく（ $P<0.05$ ）、ワクチンの有効性が確認された。これらのことから、180g程度まで成長したスギは、ワクチン投与により1週間程度で類結節症に対する予防効

果が現れることがわかった。

このように、当該ワクチンを魚体重16～180gのスギに対して投与した場合、投与1～3週間で有効性が認められることがわかった。しかし、魚体重16gおよび55g程度のスギにおいては、統計学的に一定の効果が認められた場合でも劇的な死亡率軽減の効果は認められなかったため、同サイズのスギへの適用に関しては、その効果やコスト等を慎重に検討する必要があるだろう。ただ、魚体重180g程度のスギの場合は比較的良好な結果が得られ、魚体重が大きな魚ほど当該ワクチンの投与による免疫獲得が早いことが示唆された。このことから、数百gまで成長させたスギにワクチンを投与することで被害を軽減することが可能かもしれない。現在、本県のスギ養殖業は衰退傾向にあるが、大型個体への応用も今後の検討課題だろう。

現在のところ、本ワクチンをスギに適用することは薬事法上不可能だが、今後のスギを含めた使用魚種の適応拡大において、ワクチンを用いたスギの類結節症対策の基礎的知見として活用できるものと考えられる。さらには新たな水産用ワクチンの開発に期待したい。

#### 文献

- 金井欣也，1996：海産魚の細菌病，「魚病学概論」（室賀，江草編），恒星社厚生閣，東京，61。
- 楠田三郎，木村正雄，江草周三，1970：養殖ブリ稚魚の細菌性類結節症の研究－I.魚病研究，4，111－118。
- 玉城英信，知名真智子，2008：平成19年度の沖縄県における魚病の発生状況（養殖水産動物保健対策推進事業）。沖縄県水産海洋研究センター事業報告書69，188－192。
- 中村博幸，杉山昭博，玉城英信，牧野清人，小澤明子，2006：スギ養殖における類結節症の被害。平成16年度沖縄県水産試験場事業報告書，66，114－115。
- 福田穰，楠田理一，1981：各種投与方法による養殖ハマチ類結節症ワクチンの有効性。日水誌47，147－150。