

アユの冷水病およびヤマメのせっそう病に対する 浸漬ワクチンにおける超音波処理の有効性

永 井 崇 裕

Efficacy of ultrasonic immunization in ayu *Plecoglossus altivelis* against *Flavobacterium psychrophilum* and masu salmon *Oncorhynchus masou* against *Aeromonas salmonicida* with immersion vaccine

Takahiro NAGAI

近年、養殖魚の細菌病やウイルス病を予防するための手法としてワクチン処理が広く用いられるようになり、その有効性が示されている。日本では1988年にアユ *Plecoglossus altivelis* のビブリオ病 (*Vibrio anguillarum* 感染症) 不活化ワクチンが製造承認されて以降、ワクチン開発が広く行われ、様々な細菌病やウイルス病に対するワクチンが市販されるようになった¹⁾。市販されているワクチンには注射ワクチン、浸漬ワクチンおよび経口ワクチンがあるが、浸漬ワクチンおよび経口ワクチンは処理が容易であるものの、その有効性は注射ワクチンよりも低い場合が多く、有効性を向上させる手法についての検討が多くなされている^{2,3)}。

アユの冷水病は *Flavobacterium psychrophilum* を原因とする細菌感染症で、1987年に徳島県で最初に確認されて以来⁴⁾、全国で発生が見られるようになった。広島県では1993年に初めて確認されてから⁵⁾、河川や養殖場に蔓延しその被害は毎年確認されている。国、関係県および大学等で予防免疫に用いることのできるワクチンの開発が行われているが^{6,7,8)}、これまでワクチンの実用化には至っていない。また、稚魚の大量処理に適していると考えられる浸漬ワクチンの有効性は確認されているものの⁹⁾、その有効性はアユのビブリオ病ワクチンと比較すると低いままである。一方、せっそう病は *Aeromonas salmonicida* を原因とする細菌感染症で、サケ科魚類の多くが感染することが知られている。日本では1929年頃にその存在が知られていたが、主に養殖されていたニジマス *Oncorhynchus mykiss* は本病の感受性が低く、あまり問題にはならなかった¹⁰⁾。その後、本病の感受性の高い在来マスの養殖が増えるとともに被害が拡大している¹⁰⁾。広島県においても各地の養殖場のヤマメ *O. ma-*

sou masou, アマゴ *O. masou ishikawae* 等で慢性的に発生する疾病となっており、その被害も大きい。せっそう病のワクチンの開発は1960年代後半から行われたが^{11,12)}、実用化されるには至っていない。

Zhou *et al.* はアオハタ *Epinephelus awoara* のビブリオ病 (*V. alginolyticus* 感染症)¹³⁾ およびマダイ *Pagrus major* のビブリオ病 (*V. alginolyticus* および *V. anguillarum* 感染症)³⁾ に対する浸漬ワクチンにおいて、超音波処理を併用することで有効性が向上することを示している。本研究では、有効性が低いアユの冷水病やサケ科魚類のせっそう病に対する浸漬ワクチンの有効性を向上させることを目的に、アユやヤマメの浸漬ワクチンに超音波処理を応用し、その有効性について検討した。

材料と方法

供試魚

アユ 社団法人広島県栽培漁業協会で種苗生産された後、水産海洋技術センターで飼育したアユを用いた。実験前のアユに冷水病の発生は確認されなかった。

ヤマメ 広島県内の養殖場で採卵され、発眼卵として水産海洋技術センターに導入し孵化させたヤマメを用いた。実験前のヤマメにせっそう病の発生は確認されなかった。

供試菌株およびワクチン

冷水病 2004年に広島県内の養殖場で冷水病のアユから分離された *F. psychrophilum* PH-0424株を用いた。改変サイトファーガ培地¹⁴⁾を用い15℃で48時間振盪培養した PH-0424株培養液に、0.3% (v/v) のホルマリンを入れ不活化したものをワクチン液とした。ホルマリンによる不活化前の菌数は $10^{8.3}$ cfu/mL であった。

せっそう病 2001年に広島県内の養殖場でせっそう病のアマゴから分離された *A. salmonicida* OH-0104株を用いた。トリプトソーヤブイヨン（日水製薬）を用い18℃で48時間振盪培養した OH-0104株培養液に、0.6% (v/v) のホルマリンを入れ不活化したものをワクチン液とした。ホルマリンによる不活化前の菌数は $10^{8.5}$ cfu/mLであった。

超音波処理

ステンレス製水槽（210×300×440mm）底面に超音波振動子（振動面：160×250mm, 28kHz クリンパルス、カイジョー製）を設置し、その上部に供試魚を収容したステンレス製丸籠（直径200mm）を設置し超音波処理を行った。水槽内の液量は10Lであり、魚は超音波振動子の上部から25～125mm となるように収容した。実験には酸素濃度が8～9 mg/L（以下通常酸素水）および29～30mg/L（以下高濃度酸素水）の飼育水を用いた。なお、超音波処理中は所定の酸素濃度を維持するために酸素の注入を適時行った。

超音波処理の安全性試験

アユ 平均体重2.8gのアユ（累代系）を用い、強度がそれぞれ100, 280, 600および900mW/cm² (28kHz) の超音波処理による影響を検討した。各区10尾のアユに、それぞれの強度で30秒出力、30秒休止を6回繰り返すことで超音波処理を行った。処理に用いた水は水温15℃の通常酸素水または高濃度酸素水を用い、処理3日後まで経過を観察した。

ヤマメ 平均体重29gのヤマメを用い、強度がそれぞれ600, 800および1000mW/cm² (28kHz) の超音波処理による影響を検討した。処理方法はアユと同様とし、用い

たヤマメは各区5尾とした。

アユの冷水病における実験

超音波処理後の冷水病感染実験

実験1 平均体重3.7gのアユ（累代系）を用い、50および100mW/cm² (28kHz) で30秒出力、30秒休止を6回繰り返すことで超音波処理した。超音波処理に用いた水は水温15.0℃の高濃度酸素水で、10Lの水で30尾のアユを処理した。対照は高濃度酸素水による浸漬処理のみとした。超音波処理直後のアユを改変サイトファーガ培地で15℃、24時間培養し、飼育水で1/2に希釈した PH-0424培養液（ $10^{8.1}$ cfu/mL）に60分間浸漬してから、流水（水温：16.8～17.1℃）で飼育し、冷水病による死亡を観察した。

実験2 平均体重2.0gのアユ（交雑系：海産交配系と累代系の交配）を用い、280mW/cm² (28kHz) で10秒出力、20秒休止を3回繰り返すことで超音波処理した。処理に用いた水および対照は実験1と同様とした。超音波処理直後および超音波処理18時間後に実験1と同様の方法で冷水病菌に感染させてから、流水（水温：18.0～18.1℃）で飼育し、冷水病による死亡を観察した。

浸漬ワクチン実験

実験1～3における超音波強度および処理時間等を表1に示した。何れの処理にも高濃度酸素水を用い、ワクチン浸漬時間は超音波処理も含め10分間とした。また、全てのワクチン処理に、高濃度酸素水で1/10に希釈したワクチン液を用いた。

実験1 実験は平均体重4.5gのアユ（累代系）を用いて、ワクチン処理を行わない対照区、通常のワクチン処理を行う対照ワクチン区、50mW/cm² の超音波処理と

表1 アユ冷水病ワクチン実験における処理条件

実験	試験区	超音波強度 (mW/cm ²)	超音波処理時間
実験1 (4.5g ^{*1})	対照区	—	—
	対照ワクチン区	—	—
	50mW ワクチン区	50	6分間（30秒出力、30秒休止：6回）
	100mW ワクチン区	100	6分間（30秒出力、30秒休止：6回）
実験2 (2.3g)	対照区	—	—
	対照ワクチン区	—	—
	同時ワクチン区	280	90秒間（10秒出力、20秒休止：3回）
	1時間後ワクチン区	280	90秒間（10秒出力、20秒休止：3回） ^{*2}
実験3 (3.8g)	18時間後ワクチン区	280	90秒間（10秒出力、20秒休止：3回） ^{*3}
	対照区	—	—
	対照ワクチン区	—	—
	280mW ワクチン区	280	90秒間（10秒出力、20秒休止：3回）
	500mW ワクチン区	500	10秒間（10秒出力：1回）

何れのワクチン区でも超音波処理時間を含め10分間の処理を行った。

^{*1} 供試魚平均体重

^{*2} 超音波処理1時間後にワクチン処理

^{*3} 超音波処理18時間後にワクチン処理

ワクチン処理を同時に行う50mW ワクチン区および100 mW/cm² の超音波処理とワクチン処理を同時に行う100 mW ワクチン区を設定して行った。対照区ではアユを高濃度酸素水に10分間浸漬し、対照ワクチン区ではワクチン液に10分間浸漬した。50mW ワクチン区では、ワクチン浸漬の最初の6分間は表1に示す超音波処理を行い、その後の4分間はワクチン浸漬のみを行った。100 mW ワクチン区では50mW ワクチン区と同様の処理を行い、超音波強度を100mW/cm² とした。何れの試験区もワクチン液または高濃度酸素水10L にアユ50尾を収容して処理し、処理時の水温は16.5℃であった。ワクチン処理後のアユは14日間給餌飼育した後、冷水病発生水槽の排水を導入した水槽に収容してから、流水（水温：16.9～18.0℃）で飼育し、冷水病による死亡を観察した。

実験2 実験は平均体重2.3g のアユ（交雑系：海産交配系と累代系の交配）を用いて、ワクチン処理を行わない対照区、通常のワクチン処理を行う対照ワクチン区、超音波処理とワクチン処理を同時に行う同時ワクチン区、超音波処理1時間後にワクチン処理を行う1時間後ワクチン区および18時間後にワクチン処理を行う18時間後ワクチン区を設定して行った。対照区および対照ワクチン区は実験1と同様とした。同時ワクチン区では、ワクチン処理の最初の30秒間および最後の8分間はワクチン浸漬のみ、途中の90秒間は表1に示す超音波処理を行った。1時間後ワクチン処理および18時間後ワクチン処理区では、同時ワクチン区と同様の超音波処理のみを行い、それぞれ超音波処理1時間後および18時間後にワクチン液で10分間浸漬した。何れもワクチン液または高濃度酸素水10L にアユ65尾を収容して処理し、処理時の水温は15.5℃であった。ワクチン処理後のアユは17日間給餌飼育した後、改変サイトファーガ培地で15℃、24時間培養し、飼育水で1/2に希釈した PH-0424培養液（10^{7.9}cfu/mL）に30分間浸漬してから、流水（水温：18.0～18.5℃）で飼育し、冷水病による死亡を観察した。

実験3 実験は平均体重3.8g のアユ（交雑系：海産交配系と累代系の交配）を用いて、ワクチン処理を行わない対照区、通常のワクチン処理を行う対照ワクチン区、280mW/cm² の超音波処理とワクチン処理を同時に行う280mW ワクチン区および500mW/cm² の超音波処理とワクチン処理を同時に行う500mW ワクチン区を設定して行った。対照区および対照ワクチン区は実験1と同様とした。280mW ワクチン区ではワクチン処理の最初の30秒間および最後の8分間はワクチン浸漬のみ、途中の90秒間に表1に示す超音波処理を行った。500mW ワク

チン区ではワクチン処理の最初の30秒間および最後の9分20秒間はワクチン浸漬のみ、途中の10秒間に表1に示す超音波処理を行った。何れもワクチン液または高濃度酸素水10L にアユ43尾を収容して処理し、処理時の水温は17.0℃であった。ワクチン処理後のアユは20日間給餌飼育した後、改変サイトファーガ培地で15℃、24時間培養し、飼育水で1/2に希釈した PH-0424培養液（10^{8.0}cfu/mL）に60分間浸漬してから、流水（水温：18.8～19.5℃）で飼育し、冷水病による死亡を観察した。

ヤマメのせっそう病における実験

超音波処理直後のせっそう病浸漬感染

実験は平均体重29.0g のヤマメを用いて同じ実験（実験1および2）を繰り返して行った。超音波区では、高濃度酸素水に収容したヤマメを280mW/cm²（28kHz）で30秒出力、30秒休止を6回繰り返すことで超音波処理し、対照区では高濃度酸素水にヤマメを6分間収容した。処理直後のヤマメを、トリプトソーヤ寒天培地（TSA 培地、日本製薬）で18℃、24時間培養した OH-0104株を10^{4.7}cfu/mL 含む飼育水に60分間浸漬してから、流水飼育し（水温：13.5～14.5℃）せっそう病による死亡を観察した。

浸漬ワクチン実験

実験1および2における超音波強度および処理時間等を表2に示した。何れの実験においても、ワクチン浸漬時間は超音波処理も含め30分間とした。また、ワクチン処理には1/10に希釈したワクチン液を用いた。

実験1 実験は平均体重25.0g のヤマメを用いて、通常のワクチン処理を行う試験区（通常区）、高濃度酸素水を用いてワクチン処理を行う試験区（高酸素水区）、高濃度酸素水と超音波を用いてワクチン処理を行う試験区（高酸素超音波区）で行った。通常区の対照区ではヤマメを通常酸素水に30分間浸漬し、ワクチン区では通常酸素水で希釈したワクチン液に30分間浸漬した。高酸素水区では処理水として高濃度酸素水を用い、他の条件は通常区と同様とした。高酸素超音波区ではワクチン浸漬の最初の6分間は表2に示す超音波処理を行い、その後の24分間はワクチン浸漬のみを行った。対照区は高濃度酸素水のみで同様の超音波処理を行った。用いた飼育水の水温は14.0℃であった。ワクチン処理後のヤマメは17日間給餌飼育した後、TSA 培地で18℃、24時間培養した OH-0104株を含む飼育水（10^{4.1}cfu/mL）に60分間浸漬してから、流水（15.0～15.5℃）で飼育し、せっそう病による死亡を観察した。

実験2 実験は平均体重22.6g のヤマメを用いて、実験

表2 ヤマメせっそう病ワクチン実験における処理条件

実験	試験区	超音波強度 (mW/cm ²)	超音波処理時間
実験1 (25.0g ^{*1})	通常区 ^{*2}	対照	—
		ワクチン	—
	高酸素水区	対照	—
		ワクチン	—
実験2 (22.6g)	通常区	対照	6分間 (30秒出力, 30秒休止: 6回)
		ワクチン	6分間 (30秒出力, 30秒休止: 6回)
	超音波区	対照	800
		ワクチン	800

何れのワクチン区でも超音波処理時間を含め30分間の処理を行った。

^{*1} 供試魚平均体重

^{*2} 処理には通常酸素水を用いた。他の試験区は全て高濃度酸素水を用いた。

1の通常区以外の試験区を設定して行った。用いた飼育水の水温は11.0℃であった。ワクチン処理後のヤマメは21日間給餌飼育した後、TSA培地で18℃、24時間培養したOH-0104株を含む飼育水(10^{4.4}cfu/mL)に60分間浸漬してから、流水(13.9~14.6℃)で飼育し、せっそう病による死亡を観察した。

ワクチンの有効率の算出と統計処理

浸漬ワクチンの有効率(Relative percent survival: RPS)はCroy and Amend^[5]に従って算出した。感染実験およびワクチン実験の死亡数の差についてはFisherの直接確率計数法で検討し、 $P < 0.05$ を有意な差と見なした。

結 果

超音波処理の安全性試験

超音波処理後のアユの死亡数は、通常酸素水を用いた実験区では600mW/cm²で5尾、900mW/cm²で9尾であり、100および280mW/cm²の実験区および高濃度酸素水を用いた全ての実験区では死亡がなかった。死亡したアユの頭部、鰓蓋および下顎には発赤が見られた。

超音波処理後のヤマメの死亡数は、通常酸素水を用いた実験区では600mW/cm²で1尾、1000mW/cm²で2尾

であり、高濃度酸素水を用いた全ての実験区では死亡がなかった。死亡したヤマメの外観に異常は見られなかった。

超音波処理後の冷水病感染実験

感染実験の結果を表3に示した。何れの実験においても超音波処理により冷水病の死亡率が高まる傾向が見られ、超音波処理18時間後も処理直後と同様に超音波処理区の死亡率が高かった。

冷水病の浸漬ワクチン実験

実験1の死亡率および有効率を表4に、感染実験における死亡状況を図1に示した。対照ワクチン区では対照区よりも死亡率が低い傾向が見られたものの、50mWおよび100mW ワクチン区では対照区と同程度の死亡率であった。

実験2の死亡率および有効率を表5に、感染実験における死亡状況を図2に示した。何れのワクチン区の死亡

表4 冷水病浸漬ワクチンにおける超音波処理の有効性(実験1)

試験区	供試数	死亡数	死亡率%	有効率%
対照	50	38	76	—
対照ワクチン	50	29	58	23.7
50mW ワクチン	50	36	72	5.3
100mW ワクチン	50	41	82	-7.9

表3 超音波処理したアユに対する *F. psychrophilum* の感染性

	感染時期	試 験 区	供 試 数	死 亡 数	死亡率%
実験 1	直後	対照	30	13	43.3
		超音波処理 (50mW)	30	16	53.3
		超音波処理 (100mW)	30	17	56.7
実験 2	直後	対照	29	15	50.0
		超音波処理	30	23	76.7
	18時間後	対照	30	6	20.0
		超音波処理	30	14	46.7

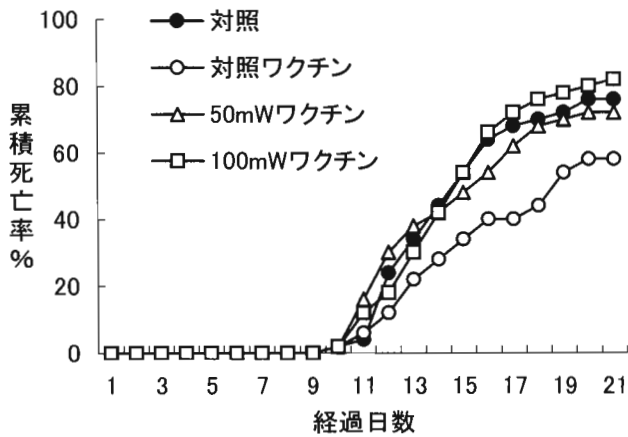


図1 冷水病浸漬ワクチンにおける超音波処理の有効性 (実験1)

表5 冷水病浸漬ワクチンにおける超音波処理の有効性 (実験2)

試験区	供試数	死亡数	死亡率%	有効率%
対照	60	23	38.3	—
対照ワクチン	60	17	28.3	26.1
同時ワクチン	60	11	18.3*	52.2
1時間後ワクチン	60	16	26.7	30.4
18時間後ワクチン	60	15	25.0	34.8

*対照区と有意な差 ($P < 0.05$)

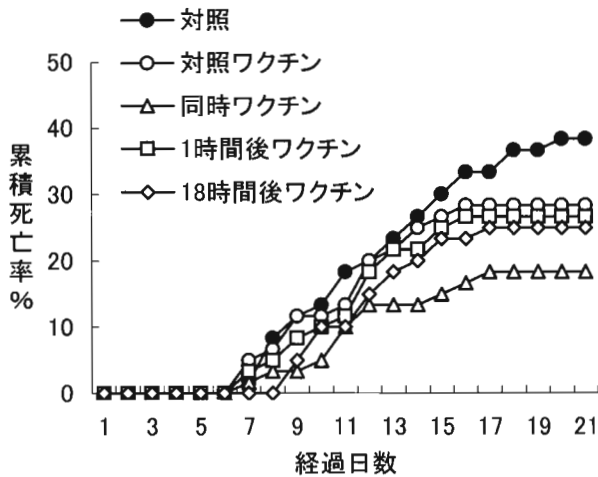


図2 冷水病浸漬ワクチンにおける超音波処理の有効性 (実験2)

率も対照区より低い傾向が見られたものの、同時ワクチン区では有意に死亡率が低かった。

実験3の死亡率および有効率を表6に、感染実験における死亡状況を図3に示した。何れのワクチン区の死亡率も対照区より低い傾向が見られ、500mW ワクチン区ではより死亡が遅れる傾向となった。

超音波処理直後のせつそう病浸漬感染

感染実験の結果を表7に示した。実験1において超音

表6 冷水病浸漬ワクチンにおける超音波処理の有効性 (実験3)

試験区	供試数	死亡数	死亡率%	有効率%
対照	43	18	41.9	—
対照ワクチン	43	14	32.6	22.2
280mW ワクチン	43	14	32.6	22.2
500mW ワクチン	43	11	25.6	38.9

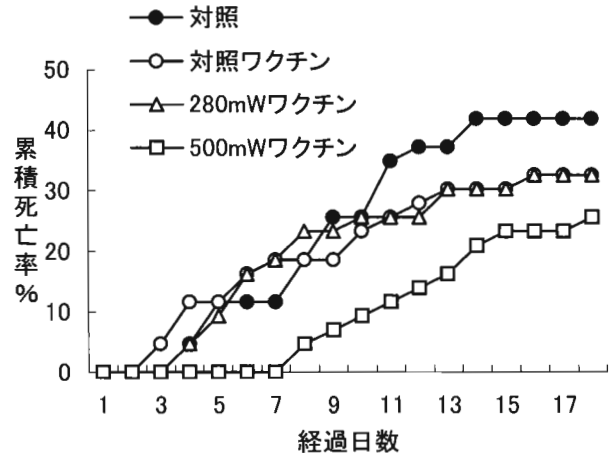


図3 冷水病浸漬ワクチンにおける超音波処理の有効性 (実験3)

表7 超音波処理したヤマメに対する *A. salmonicida* の感染性

	試験区	供試数	死亡数	死亡率%
実験1	対照	20	18	90.0
	超音波	20	11	55.0*
実験2	対照	14	9	64.3
	超音波	14	5	35.7

*対照区と有意な差 ($P < 0.05$)

表8 せつそう病浸漬ワクチンにおける超音波処理の有効性 (実験1)

	試験区	供試数	死亡数	死亡率%	有効率%
通常	対照	25	12	48	—
	ワクチン	25	8	32	33.3
高酸素	対照	25	9	36	—
	ワクチン	25	8	32	11.1
高酸素超音波	対照	25	10	40	—
	ワクチン	25	1	10*	90

*対照区と有意な差 ($P < 0.01$)

波処理によりせつそう病による死亡率が有意に低下し、実験2においても超音波処理によりせつそう病の死亡率が低下する傾向が見られた。

せつそう病の浸漬ワクチン実験

実験1の死亡率および有効率を表8に、感染実験における死亡状況を図4に示した。通常区および高酸素区のワクチンによる死亡率は対照区よりもやや低かったものの、高酸素超音波区ではワクチン処理により死亡率が有

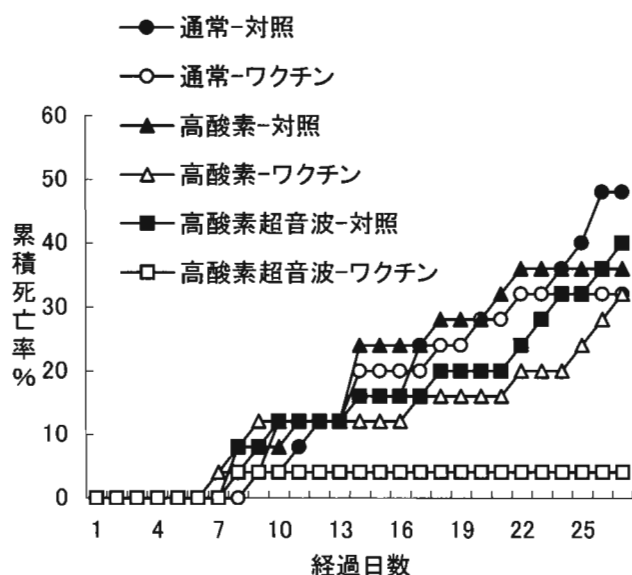


図4 セっそう病浸漬ワクチンにおける超音波処理の有効性（実験1）

表9 セっそう病浸漬ワクチンにおける超音波処理の有効性（実験2）

	試験区	供試数	死亡数	死亡率%	有効率%
通常	対照	17	11	64.7	—
	ワクチン	18	10	55.6	14.1
超音波	対照	16	15	93.8	—
	ワクチン	15	5	33.3*	48.5

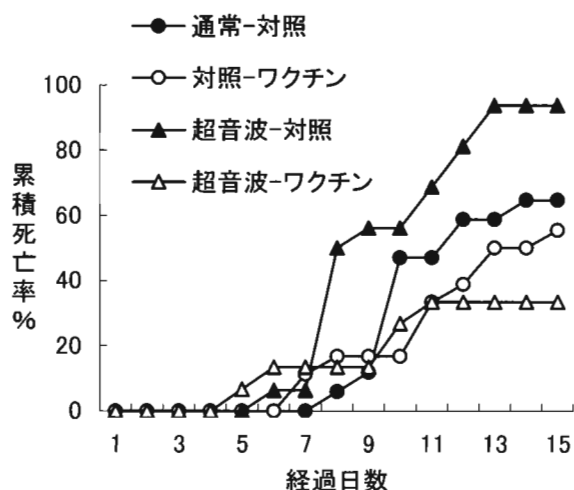
*対照区と有意な差 ($P < 0.01$)

図5 セっそう病浸漬ワクチンにおける超音波処理の有効性（実験2）

意に低くなった。

実験2の死亡率および有効率を表9に、感染実験における死亡状況を図5に示した。実験1と同様に通常区のワクチンによる死亡率は対照区よりもやや低かったものの、超音波区ではワクチン処理により死亡率が有意に低くなった。

考 察

超音波による処理法や強度については、Zhou *et al.*³⁾ がマダイで効果を明らかにしている出力と休止を繰り返す断続的な方法で行い、周波数や強度も同程度とした。最初に、超音波のアユおよびヤマメに対する安全性を検討した。600mW/cm² (20および50kHz) で10分間連続処理を行い平均体重41.6gのマダイが全て生残した結果³⁾と比較すると、600mW/cm² (28kHz)、6分間の断続処理により死亡が生じたアユやヤマメにおいては、超音波による影響は強いものと考えられた。このことから、酸素濃度を飽和量の約3倍に調整した高濃度酸素水を処理水として用い安全性を検討した。その結果、通常の酸素濃度の水と比較すると高濃度酸素水を用いることで、魚の死亡が減少することが明らかになった。予備実験の結果から高濃度酸素水と通常の酸素濃度の水で超音波の減衰に差のないことが明らかになっていることから、浸漬ワクチン実験においては高濃度酸素水を用いた。しかし、高濃度酸素水で超音波に対する安全性が高まる原因は明らかではなかった。

超音波処理のアユおよびヤマメに対する影響を検討するために、超音波処理直後および処理18時間後に冷水病およびせっそう病の感染実験を行った。超音波処理により体表が傷害を受け、何れの感染実験においても死亡率が高まることが予想されたが、アユの冷水病においては死亡率が高まる傾向が見られたものの、ヤマメのせっそう病においては死亡率が低下する結果となった。冷水病とせっそう病で異なる結果となったのは、両者の病原性や病原因子の違い、または供試魚の大きさの違いが考えられるものの、理由は明らかではなかった。

アユの冷水病ワクチンにおける実験では、50および100mW/cm²の超音波強度では有効性の向上は確認されなかった。また、超音波処理1時間および18時間後のワクチン処理でも有効性の向上は確認されなかった。しかし、ワクチン処理と同時にを行った280mW/cm²の超音波処理では有効性の向上が確認された。超音波強度がより強い500mW/cm²の処理で冷水病による死亡がさらに遅れ、有効性も高い傾向となった。このことから、アユ冷水病浸漬ワクチンにおいて超音波処理を行うことで有効性が向上し、また超音波強度が強くなるとその効果が高まる可能性が示唆された。しかし、超音波強度を強めるとアユに与える傷害がより大きくなることが予想され、安全性を詳細に検討する必要がある。

ヤマメのせっそう病ワクチンにおける実験では、最初に超音波処理に用いる高濃度酸素水のワクチン処理に与

える影響の検討を行った。その結果、高濃度酸素水による処理のみではワクチンの有効性は高まらなかったが、超音波処理を行うことでワクチンの有効性が高まることが明らかになった。同様の実験を再び行くと結果が再現され、せっそう病浸漬ワクチンにおいて超音波処理を併用するとワクチンの有効性が向上する可能性が示された。また、アユの冷水病ワクチンの実験結果と比較すると、ヤマメのせっそう病ワクチンにおいて効果がより高いものと考えられた。この理由として、前述したアユの冷水病とヤマメのせっそう病における病原性の違いや、アユとヤマメの超音波に対する感受性の違いが考えられる。一方、浸漬ワクチン実験ではワクチンの対照となるヤマメも超音波処理を行い、処理17および21日後に感染実験に供した。その結果、死亡率は超音波処理を行っていないヤマメと同程度であり、超音波処理直後の感染実験で明らかになったせっそう病に対する防御効果は長くても17日間持続しないことが明らかになった。

Zhou *et al.* は超音波処理で浸漬ワクチンの有効性が高まる原因として、超音波処理で体表における透過性が向上することを一因として挙げているが³⁾、本研究において、超音波処理後のヤマメのせっそう病による死亡率が低下したことから、超音波の刺激によって体表に炎症が生じ、生体防御能の活性化が引き起こされた可能性も考えられる。

本研究により、淡水魚であるアユやヤマメの浸漬ワクチン処理においても超音波処理が有効であることが示された。特にヤマメのせっそう病の浸漬ワクチンにおいては、その効果は大きいものと考えられる。今後は、超音波処理に対する安全性の範囲や最適な処理条件をさらに検討する必要があると考えられる。また、超音波処理でせっそう病による死亡率が低下することや、ワクチン効果が高まる原因についての検討も必要である。

謝 辞

本研究は受託研究「養殖魚（アユ、ヤマメ）の細菌感染症予防に関する研究」（豊国工業株式会社）により行われた。実験に多大な協力を頂いた豊国工業株式会社の藤河弘史氏、平賀智敬氏に深謝の意を表する。

引用文献

- 1) 水産庁増殖推進部栽培養殖課 (2003)：我が国の魚病被害の現状と魚病対策。養殖, **499**, 14-15.
- 2) Ototake, M., J. D. Moore and T. Nakanishi (1999)： Prolonged immersion improved the effectiveness of dilute vibrio vaccine for rainbow trout. *Fish Pathol.*, **34**, 151-154.
- 3) Zhou, Y-C., J. Wang, B. Zhang and Y-Q. Su (2002)： Ultrasonic immunization of sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel), with a mixed vaccine against *Vibrio alginolyticus* and *V. anguillarum*. *J. Fish Dis.*, **25**, 325-331.
- 4) Wakabayashi, H., T. Toyama and T. Iida (1994)： A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan. *Fish Pathol.*, **29**, 101-104.
- 5) Iida, Y. and A. Mizokami (1996)： Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. *Fish Pathol.*, **31**, 157-164.
- 6) 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 Pathol.*, **35**, 199-203.
- 7) 永井崇裕・飯田悦左・米司 隆 (2003)：アユ冷水病に対する水溶性アジュバント添加ワクチンの野外試験。魚病研究, **38**, 63-65.
- 8) Kondo, M., K. Kawai, M. Okabe, N. Nakano and S. Oshima (2003)： Efficacy of oral vaccine against bacterial coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 261-264.
- 9) 永井崇裕・坂本 崇 (2006)：異なるアユ系統間の冷水病感受性と免疫応答。魚病研究, **41**, 99-104.
- 10) 若林久嗣 (2004)：サケ科魚類のせっそう病。魚介類の感染症・寄生虫病, 恒星社厚生閣, pp. 141-146.
- 11) 本荘鉄夫・原 武史 (1973)：ヤマメ、アマゴの病気。養魚講座第8巻ヤマメ・アマゴ, 緑書房, pp. 128-140.
- 12) 森川 進 (2003)：サケ科魚類のせっそう病の防除に関する研究。岐阜県淡水魚研究所研究報告, **48**, 1-234.
- 13) Zhou, Y-C., H. Huang, J. Wang, B. Zhang and Y-Q. Su (2001)： Vaccination of the grouper, *Epinephelus awoara*, against vibriosis using the ultrasonic technique. *Aquaculture*, **203**, 229-238.
- 14) Wakabayashi, H. and S. Egusa (1974)： Characteristics of myxobacteria associated with some freshwater fish disease in Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **40**, 751-757.

- 15) Croy, T. R. and D. F. Amend (1977) : Immunization of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. *Aquaculture*, 12, 317-325.