

魚病ワクチンの実用化に関する研究

1 エドワジェラ症に対するFKCワクチンの有効性の検討

増養殖対策科 黒原健朗・渡辺 貢

(1) 投与方法の検討

1) 目的

ワクチンの投与方法には注射法、経口法および浸漬法があり、注射法および経口法は市販の海産魚用ワクチンでも用いられている方法である。そこで、試作したFKC（ホルマリン死菌）ワクチンの投与方法について、注射免疫法と経口免疫法で有効性を比較した。

2) 材料および方法

供試魚には約15gのマダイを用いた。供試尾数は各100尾としたが、いずれの試験区とも50尾ずつ2水槽に分けて飼育した。本試験ではマダイから分離した*Edwardsiella tarda* No.1株をワクチン株として用い、それを湿菌重量で5mg/100g体重/回になるように調製して供試ワクチンのストックとした。さらにそれを0.75ml/尾の割合になるように再調製したものを経口ワクチンとし、投与時に市販のドライペレットに吸着させた。注射ワクチンには経口ワクチンを滅菌PBSで13倍に希釈したものを用い、それを0.1ml/尾の割合で供試魚の腹腔内に投与して免疫した。給餌は毎日午前中の1回とし、経口免疫区では1日おきにワクチン吸着飼料を供試魚に投与した。免疫期間は2週間とし、水温は25±1℃に維持した。

免疫後、各水槽47～50尾の魚を用いて2段階の菌濃度で皮下注射法により攻撃した。攻撃試験にはワクチン株と同じマダイ由来株を用い、観察期間は37日間とした。期間中の死亡魚は取り上げて解剖するとともに、腎臓・脾臓の結節や頭部の膿瘍形成といったエドワジェラ症の典型症状を確認した。さらにSS寒天培地を用いた菌分離を腎臓より行った。なお、臓器における結節形成はスライドグラス2枚で圧ぺいすることで確認した。

3) 結果および考察

攻撃試験期間中の累積死亡率の推移を図1に示した。高濃度攻撃では、注射免疫区では開始直後には対照区および経口免疫区と比較して顕著に死

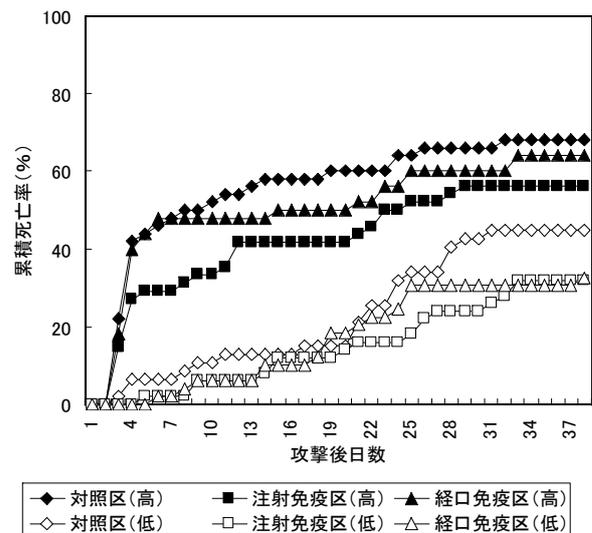


図1 攻撃試験期間中の累積死亡率の推移
(高：高濃度攻撃、低：低濃度攻撃)

亡率が低く、終了時における累積死亡率も56.3%と他区よりも低かったが、対照区の68.0%との差異は小さかった。経口免疫区における累積死亡率は64.0%となり、対照区と同等の結果になった。

また、低濃度攻撃における累積死亡率は注射免疫区で32.0%、経口免疫区で32.7%となり、いずれも対照区の44.7%よりも低かったが、高濃度攻撃同様に対照区との差異は小さかった。

各区における死亡率からワクチン有効率を算出した結果を図2に示した。有効率は経口免疫区よりも注射免疫区で高かったが、いずれのワクチン区でも実用化の目安とされる60%を大きく下回っており、有効性は低かった。

魚病ワクチンの実用化に関する研究

攻撃試験期間中にみられた死亡魚からの症状の再現性と菌分離結果を表1に示した。高濃度攻撃では、注射免疫区において死亡魚からの本疾病の典型的な症状が他区より高い割合でみられたが、菌分離率には注射免疫区と経口免疫区で顕著な差はなく、いずれも対照区より若干低かった。しかし、低濃度攻撃区では菌分離率、症状の再現性ともに経口免疫区で高い結果となった。

本試験では注射免疫での有効性が高かったもののその効果は低く、ワクチン株等から再度検討を実施する必要があると判断された。また、高濃度で攻撃した注射免疫区における死亡率は攻撃開始直後には対照区よりも著しく低い値がみられているもののその後は死亡率が上昇していることから、今後は本疾病で特徴的にみられる症状の慢性化や感染要因の解明も併せてワクチン試験を実施する

必要があると思われた。

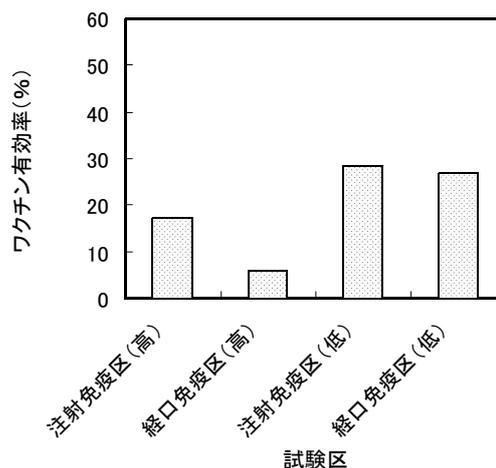


図2 各試験区におけるワクチン有効率

表1 死亡魚の剖検結果および菌分離結果

	死亡尾数	腎臓結節	脾臓結節	頭部膿瘍	菌分離
対照区(高)	34/50 (68.0)	10/34 (29.4)	9/34 (26.5)	1/34 (2.9)	19/34 (55.9)
注射免疫区(高)	27/48 (56.3)	12/27 (44.4)	11/27 (40.7)	4/27 (14.8)	11/27 (40.7)
経口免疫区(高)	31/50 (62.0)	7/31 (22.6)	4/31 (12.9)	3/31 (9.7)	13/31 (41.9)
対照区(低)	23/47 (48.9)	15/23 (65.2)	8/23 (34.8)	7/23 (30.4)	5/23 (21.7)
注射免疫区(低)	16/50 (32.0)	10/16 (62.5)	6/16 (37.5)	4/16 (25.0)	3/16 (18.8)
経口免疫区(低)	17/49 (34.7)	14/17 (82.4)	10/17 (58.8)	7/17 (41.2)	6/17 (35.3)

()は%

(2) 菌株由来別のワクチン効果の比較

1) 目的

マダイおよびウナギ由来のエドワジェラ症原因菌から調製したF K Cワクチンをマダイに投与し、有効性を比較することを目的とした。

2) 材料および方法

ワクチン株にはウナギから分離したEF-1株およびマダイから分離されたNo.1株を用い、それぞれから湿菌重量5mg/100g体重になるようにF K Cワクチンを調製した。

供試魚には約80gのマダイ稚魚を用い、対照区、EF-1区、No.1区ともに60尾ずつを供試した。免疫は注射法により行い、1尾あたり0.1ml(ワクチン量として湿菌重量4mg/尾に相当)を腹腔内に接種した。対照区の魚には滅菌PBSを投与し、飼育期間中の水温を25±1℃に維持した。

免疫後23日目に各区の魚を分割し、No.1株から調製した2段階の濃度の菌液を用いて皮下注射法により攻撃した。攻撃試験期間は34日間とし、期間中の死亡魚と終了時における生残魚の検査を(1)と同様にして行った。

3) 結果および考察

攻撃試験中の累積死亡率の推移を図3に示した。高濃度攻撃ではEF-1区で23.3%、No.1区で18.2%となり、対照区の10.3%を上回る死亡率がみられ、ワクチンの有効性は認められなかった。また、低濃度攻撃でも高濃度攻撃と同様にいずれのワクチン区でも死亡率は対照区よりも高かった。

死亡魚および生残魚における症状の再現性と菌分離結果を表2に示した。死亡魚の腎臓からの菌分離率は対照区が高かったが、腎臓および脾臓における結節形成の状況から、症状の再現性はウナ

ギ由来の EF-1 株よりもマダイ由来の No.1 株から調製したワクチン区で高いと判断された。一方の生残魚では、いずれの試験区でも腎臓や脾臓における結節形成は認められなかった。しかし、腎臓からの菌分離率は No.1 区で 28.6 % と高く、ワクチン区では 13.0 ~ 40.9 % の割合で頭部膿瘍個体が認められたことから、ワクチン投与魚における本疾病の慢性化がうかがわれた。

本試験では対照区における死亡率が菌濃度にかかわらず 10 % 程度と著しく低かった。前年度に実施した感染方法の検討では皮下注射法で症状の再現性が高かったことから、本試験でもその方法を用いたが、感染方法について再度検討する必要があると判断された。

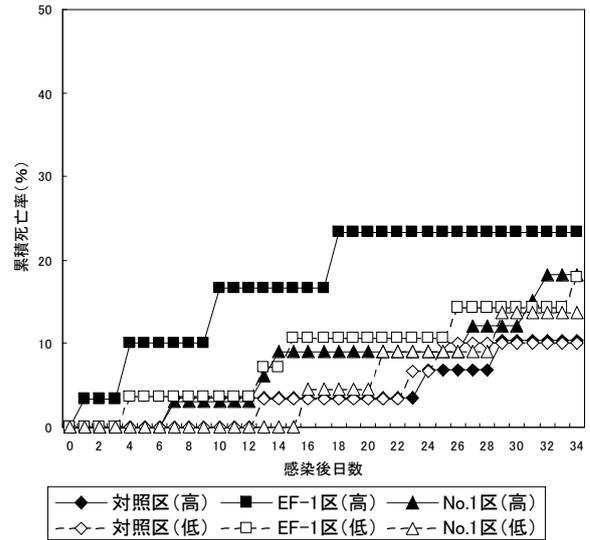


図3 攻撃試験期間中の累積死亡率の推移
(高：高濃度攻撃、低：低濃度攻撃)

表2 死亡魚および生残魚の解剖、菌分離結果

	腎臓結節	脾臓結節	頭部膿瘍	菌分離
死亡魚				
対照区高濃度攻撃	3/3 (100)	3/3 (100)	0/3 (0)	1/3 (33.3)
EF-1高濃度攻撃	3/8 (37.5)	4/8 (50.0)	2/8 (25.0)	2/8 (25.0)
No.1高濃度攻撃	5/5 (100)	4/5 (80.0)	1/5 (20.0)	2/5 (40.0)
対照区低濃度攻撃	2/3 (66.7)	3/3 (100)	0/3 (0)	3/3 (100)
EF-1低濃度攻撃	2/5 (40.0)	2/5 (40.0)	1/5 (20.0)	2/5 (40.0)
No.1低濃度攻撃	2/2 (100)	1/2 (50.0)	0/2 (0)	1/2 (50.0)
生残魚				
対照区高濃度攻撃	0/26 (0)	0/26 (0)	6/26 (23.1)	0/26 (0)
EF-1高濃度攻撃	0/22 (0)	0/22 (0)	9/22 (40.9)	1/22 (4.5)
No.1高濃度攻撃	0/28 (0)	0/28 (0)	0/28 (0)	8/28 (28.6)
対照区低濃度攻撃	0/27 (0)	0/27 (0)	5/27 (18.5)	0/27 (0)
EF-1低濃度攻撃	0/23 (0)	0/23 (0)	3/23 (13.0)	0/23 (0)
No.1低濃度攻撃	0/20 (0)	0/20 (0)	3/20 (15.0)	0/20 (0)

(3) 野外株の収集

1) 目的

先に実施したワクチン試験ではいずれも有効性が低かったため、ワクチン株としてより適当な菌株を入手することを目的とした。

2) 材料および方法

県中央部漁場より魚病診断で持ち込まれたマダイおよびヒラメの腎臓からHI寒天培地を用いて菌分離し、培養菌を日本ビオメリュー株式会社の細菌検査キットAPI20Eを用いて同定した。

3) 結果

ヒラメ1株およびマダイ3株について野外株を入手し、その結果を表3に示した。いずれの細菌

もプロファイルインデックス 4544000 に該当したことから、*Edwardsiella tarda* に同定された。

魚病ワクチンの実用化に関する研究

表3 収集株の性状試験結果

魚種	ヒラメ	マダイ	マダイ	マダイ
年齢	0才	1才	1才	1才
分離日	2004/9/17	2004/9/27	2004/10/12	2004/12/21
βガラクトシダーゼ*	-	-	-	-
アルギニンジヒドロラーゼ*	-	-	-	-
リジンテカルボキシラーゼ*	+	+	+	+
オルニチンテカルボキシラーゼ*	+	+	+	+
クエン酸利用性	-	-	-	-
H ₂ S産生	+	+	+	+
ウレアーゼ*	-	-	-	-
トリプトファンアミナーゼ*	-	-	-	-
インドール産生	+	+	+	+
アセチン産生	-	-	-	-
ゼラチナーゼ*	-	-	-	-
ブドウ糖	+	+	+	+
D-マンニトール	-	-	-	-
イノシット	-	-	-	-
D-ソルビトール	-	-	-	-
L-ラムノース	-	-	-	-
白糖	-	-	-	-
D-メリビオース	-	-	-	-
D-アミグダリン	-	-	-	-
L-アラビノース	-	-	-	-
オキシダーゼ試験	-	-	-	-
プロファイルインデックス	4544000	4544000	4544000	4544000
同定結果	<i>E.tarda</i>	<i>E.tarda</i>	<i>E.tarda</i>	<i>E.tarda</i>

2 *E. tarda* 37kDa 外膜タンパク質の血清型共通感染防御抗原性

川合研兒¹・Ying Liu¹・黒原健朗²・渡辺 貢²

(1) 目的

E. tarda は多くの血清型が知られており (Sakazaki, 1967; Tamura *et al.*, 1988)、ワクチンはそれぞれの血清型について対応しなければならないと考えられている。しかし、同菌において血清型に共通な抗原として、37kDa 外膜タンパク質 (OMP) の存在を報告しており (Kawai *et al.*, 2004)、これを元にした汎血清型ワクチンの可能性がある。そこで、本研究では1株の *E. tarda* から調製した37kDa OMPが、異なった血清型および由来の株の感染に対して防御性を示すか検討した。

(2) 材料および方法

供試菌には EF-1 株 (ウナギ由来・やや弱毒性)、HH-1 (ヒラメ由来・EF-1 と同一血清型・強毒性) および V-1 (ウナギ由来・EF-1 株と異なる血清型・強毒性) の3株の *E. tarda* を用いた。

37kDa OMP の調製は、*E. tarda* EF-1 株を用いて Suzuki *et al.* (1994) の SDS 抽出法により行った。

供試魚には体重約 18g のヒラメを用いた (n=208)。供試魚は免疫グループと非免疫グループの2グループに分け、免疫グループ (n=104) には *E. tarda* EF-1 株から調製し PBS に溶解した37kDa OMP を 30 μg/尾となるように 100 μl を腹腔内に注射して免疫した。非免疫グループ (n=104) のヒラメには、対象として 100 μl の PBS を腹腔内注射した。これらのヒラメはエアレーションを行い、流水海水で4週間飼育した。4週間後に各グループの魚から5尾を取り上げて採血し、血清を分離して抗体価の測定に用いた。また、残りの魚 (各グループ n=99) は攻撃試験に用いた。

抗体価の測定は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により次のとおり行った。96 穴 ELISA プレートに抗原 37kDa OMP (30 μg/ml) を加え

¹ 高知大学農学部栽培漁業学科水族病理学研究室、² 高知県水産試験場増養殖対策科

て4℃で12時間インキュベートしてコーティングした。各穴を0.1% Tween-20を含むPBS-Tweenで3回洗浄したのち、0.02% NaN₃を含む10%スキムミルクで4℃で12時間インキュベートしてブロッキングし、PBS-Tweenで3回洗浄を行った。免疫グループおよび非免疫グループのヒラメ血清をPBSで10～1,000倍に希釈し、1穴あたり50μl加えた。4℃で12時間インキュベート後PBS-Tweenで洗浄した。以下同様に、抗ヒラメIgGウサギ血清(2次抗体)、酵素標識抗ウサギIgGヤギ抗体の順に反応させた。発色液(0.25% o-フェニレンジアミン・クエン酸一水塩 1.02g・リン酸二ナトリウム 12水塩 3.69g/100ml)で発色後1規定-硫酸で反応停止し、492nmの吸光度を測定した。

免疫4週間後に血清採取に用いた残りの両グループの魚は、それぞれ3区に分けて攻撃試験に用いた。両グループ各3区(n=33)の魚に対し、それぞれ*E. tarda*の異なった株EF-1(ウナギ由来)、HH-1(ヒラメ由来・EF-1と同一血清型)およびV-1(ウナギ由来・EF-1株と異なる血清型)を用いて、腹腔内注射による攻撃試験を行った。各菌株の接種菌数は、BHI寒天培地を用いた平板塗抹法で測定したところ、EF-1株は 2.0×10^6 CFU/尾、HH-1株は 1.1×10^4 CFU/尾およびV-1株は 2.0×10^3 CFU/尾であった。感染後19日間にわたり、毎日2回死亡数を記録した。また、有意差検定はFisherの方法によって行った。

(3) 結果

ヒラメ血清の抗体価は、取り上げた各グループ5尾のうち血清の状態のよい各3尾について行ったところ、図4に示すように10倍希釈血清では免疫魚血清で非免疫魚血清よりも吸光度0.3以上の差が認められた。また、1,000倍希釈で両者の差が認められなくなった(吸光度約0.07)ことから、免疫魚での抗体価は非免疫魚の約1,000倍として示された。

生存率の推移は図5に示すように、各区とも攻撃2、3日後から死に始め、3～5日後から急激な生存率の低下が認められ、17日後まで死亡が続いた。最終的な生存率は、攻撃菌にHH-1株およ

びV-1株を用いた場合には、37kDa OMPで免疫した区でそれぞれ70および73%であったが、対照区ではそれぞれ12および9%となり、免疫区と対照区との間に有意差が認められた(B, $P < 0.0005$; C, $P < 0.0005$)。EF-1株で攻撃した両区ではいずれも比較的高い生存率を示した。すなわち、免疫区が91%、対照区が82%となって有意差は認められなかった(A, $P = 0.7$)が、免疫区のほうが高い生存率を示した。

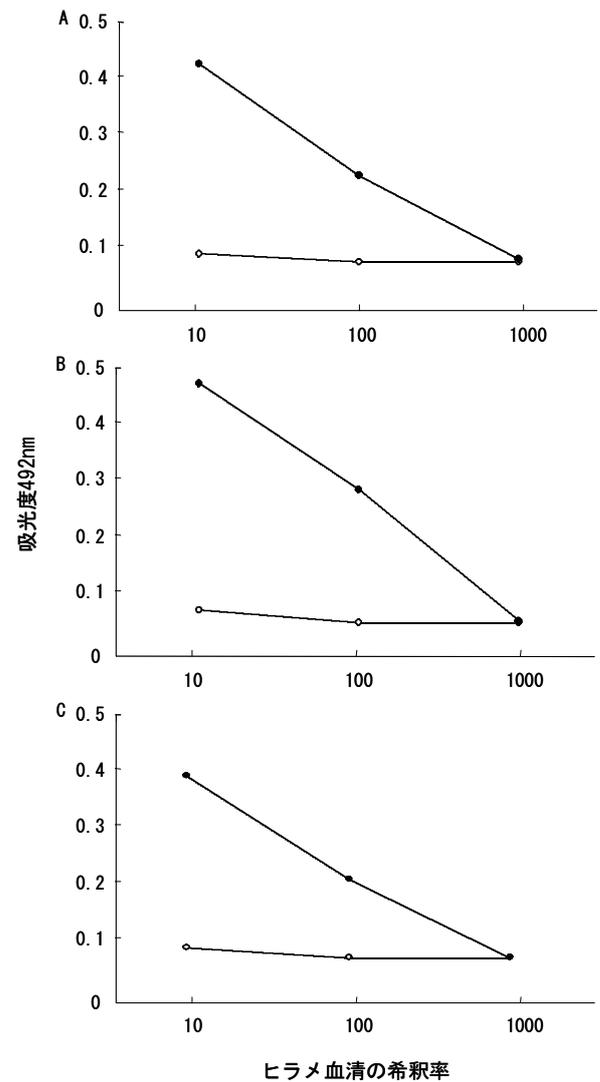


図4 免疫魚および非免疫ヒラメの血清におけるEF-1株37kDa OMP抗原に対する特異ELISA抗体価。A, B, C, は3組の免疫・非免疫魚の組み合わせを示す。各グラフの上段は免疫魚、下段は非免疫魚を示す。

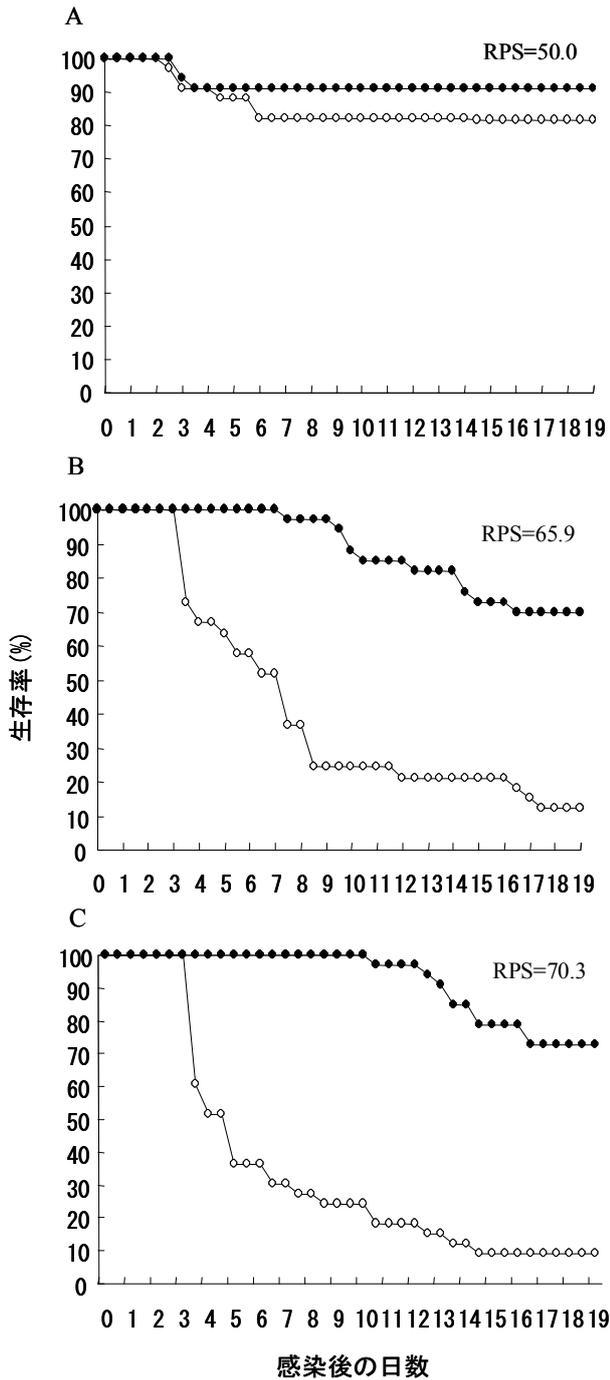


図5 異なる3株の *Edwardsiella tarda* による攻撃試験の結果. A, EF-1株 (2.0×10^6 CFU/尾); B, HH-1株 (1.1×10^4 CFU/尾); C, V-1株 (2.0×10^3 CFU/尾). ●, EF-1株 37kDa OMPで免疫; ○, 非免疫. 対照区との有意差 (有意水準): A, なし; B, $P < 0.0005$; C, $P < 0.0005$. RPS (有効率) = $\{1 - (\text{免疫区の死亡率} / \text{対照区の死亡率})\} \times 100$ (%).

(4) 考察

E. tarda は O 抗原による血清型が多くあることが報告されており (Sakazaki, 1967; Tamura *et al.*, 1988)、今回使用した3菌株は独自に作製したウサギ抗血清での O 抗原交差吸収凝集反応において、EF-1 株と HH-1 株とは同じ血清型であるが、この2株と V-1 株とは異なった血清型であることが確認されている (Kawai *et al.*, 2004)。

EF-1 株から調製した 37kDa OMP を用いて免疫したヒラメをこれら3株で攻撃したところ、いずれも免疫区のほうが高い生存率となり、とくに毒性が高い HH-1 株と V-1 株で攻撃した結果では、対照区と比較して有意な差が認められた。また、免疫したヒラメの血清中において、検査したいずれの魚においても 37kDa OMP に対する特異的な ELISA 抗体価の高い値が確認された。したがって、その後3区に分けたいずれの免疫魚においても、特異的免疫応答が行われており、その結果が防御性に結びついたと推定される。

EF-1 株と V-1 株とでは血清型が異なるので、この結果は異なった血清型の菌株に対しても免疫の効果が現れたことを示すものである。すべての異なった血清型の菌株に対する防御性は確認できないが、Kawai *et al.* (2004) は、多くの血清型菌株で 37kDa OMP が共通に存在することを確認しているため、今回の結果は広範な血清型に対応して感染防御する可能性を示すものと考えられる。

E. tarda EF-1 株の 37kDa OMP をワクチン抗原として多量を調製するには、抽出から精製にかけて多くの労力とコストが必要である。しかし、37kDa OMP は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) であることが確認されており (Liu *et al.*, 未発表)、遺伝子クローニング・大腸菌等組み込みを検討しているところであり、この抗原を大量かつ安価に生産する可能性は十分にある。

一般的に病原細菌に対する細菌のワクチンは、1種類の抗原のみによって感染防御が十分に発揮されることは少なく、他の抗原を含むことによって有効性は単一抗原によるよりも高くなると考えられる。したがって、エドワジェラ症に対する有効性の高いワクチンを実用化するためには、今後

は大量生産できる 37kDa OMP と本菌のその他菌体抗原との組み合わせについて検討する必要があると考えられる。

(5) 文献

- Kawai, K., Y. Liu, K. Ohnishi and S. Oshima: A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate. *Vaccine*, **22**, 3411-3418, 2004.
- Sakazaki, R.: Studies on the Asakusa group of *Enterobacteriaceae* (*Edwardsiella tarda*) . *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **20**, 205-212, 1967.
- Suzuki, S., K. Kuroe and R. Kusuda: Characteristics of porin-like major outer membrane proteins of *Listonella anguillara* serotypes J-O-1, -2 and -3. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **32**, 605-613, 1994.
- Tamura, K., R. Sakazaki and A. C. McWhorter: *Edwardsiella tarda* serotyping scheme for international use. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 2343-2346, 1988.

魚病ワクチンの実用化に関する研究

魚病ワクチンの実用化に関する研究