

魚病ワクチンの実用化に関する研究

増養殖環境部 黒原 健朗

1 エドワジェラ症に対するホルマリン死菌（FKC）ワクチンの有効性の検討

マダイは本県の重要な海面養殖魚種であるが、エドワジェラ症によって毎年大きな被害がもたらされており、それはイリドウィルス症と並んで本魚種における重要な疾病として位置づけられている。エドワジェラ症には現在のところ効果的な対策がなく、養殖現場では対応に苦慮していることから、本疾病に有効なワクチン開発を目的とした試験を平成 14 年度から実施している。

(1) 野外株の病原性比較試験

1) 目的

ワクチン作製の候補とする野外株を平成 16 年度に収集したが、本年度はマダイを用いた感染実験によりそれらの病原性を比較した。

2) 方法

試験にはマダイから分離された MR04、KR04、040927、041012 及び 041221 の計 5 株を用い、ハートインフュージョン寒天培地で 25°C、48 時間培養したものを供試した。感染実験に際し、滅菌 PBS(-)を用いた 10 倍段階希釈法によって表 1 に示したように D1~D4 (菌濃度 $10^6 \sim 10^9$ CFU/ml) の 4 段階の菌液を調製し、約 25 g のマダイに 1 尾あたり 0.1ml ずつ腹腔内注射法により接種した。

なお、供試尾数は各区 15 尾ずつとし、200L ポリエチレン角形水槽に収容して砂ろ過及び紫外線殺菌

海水を用いて 2 週間経過観察した。水温は 25°C に設定し、試験期間中の累積死亡率を比較するとともに、死魚は取り上げて剖検と SS 寒天培地を用いた脾臓からの菌分離を行い、エドワジェラ症による死亡であることを確認した。

3) 結果及び考察

各株ごとの累積死亡率の推移を図 1~図 5 に、試験終了時における累積死亡率を表 2 に示した。いずれの菌株でも最も高濃度の菌液では開始 1 日目から死亡がみられ始め、低濃度の菌液でも試験経過に伴って徐々に死亡がみられ始めた。最も濃度の低い D1 における死亡は MR04 株、KR04 株及び 041221 株でみられた。試験中にみられたいずれの死亡魚からも SS 寒天培地を用いて菌が再分離され、エドワジェラ症による死亡であることが確認された。次に、各株間で菌数が異なったことから、毒性を比較するために図 6 に菌数の対数と累積死亡率との関係を示した。死亡率と攻撃菌数との関係を見ると、低濃度の 10^6 付近あるいは高濃度の $10^8 \sim 10^9$ 付近では株間で累積死亡率に顕著な差が認められなかったが、 10^7 付近

表 1 感染試験で設定した菌濃度

菌株名	由来	菌濃度 (CFU/ml)			
		D1	D2	D3	D4
MR04	マダイ	7.7×10^5	7.7×10^6	7.7×10^7	7.7×10^8
KR04	マダイ	6.6×10^5	6.6×10^6	6.6×10^7	6.6×10^8
040927	マダイ	4.7×10^5	4.7×10^6	4.7×10^7	4.7×10^8
041012	マダイ	1.1×10^6	1.1×10^7	1.1×10^8	1.1×10^9
041221	マダイ	1.1×10^6	1.1×10^7	1.1×10^8	1.1×10^9

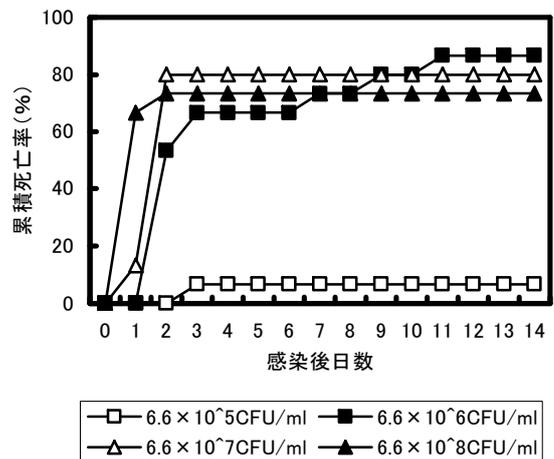


図 1 累積死亡率の推移 (供試菌株: MR04)

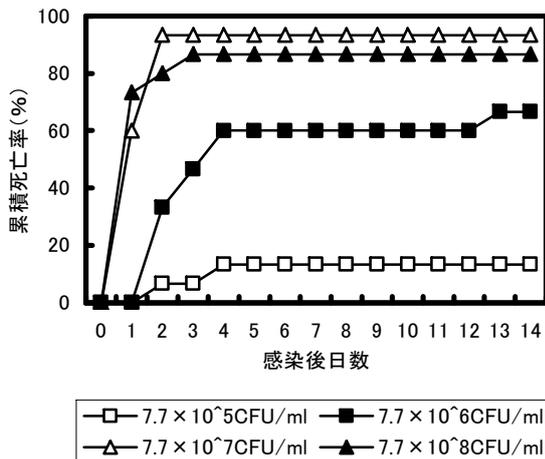


図2 累積死亡率の推移 (供試菌株: KR04)

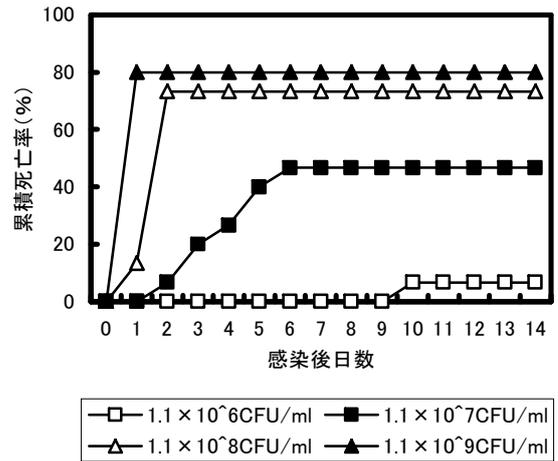


図5 累積死亡率の推移 (供試菌株: 041221)

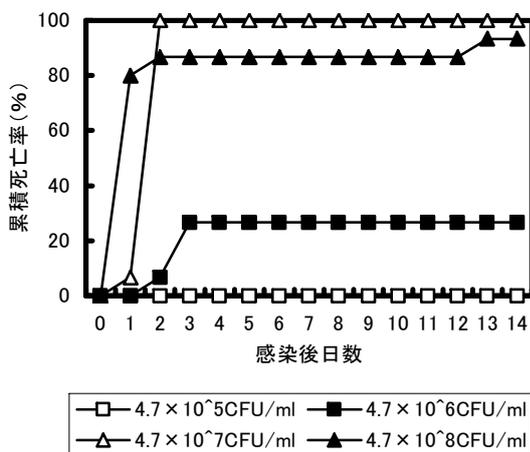


図3 累積死亡率の推移 (供試菌株: 040927)

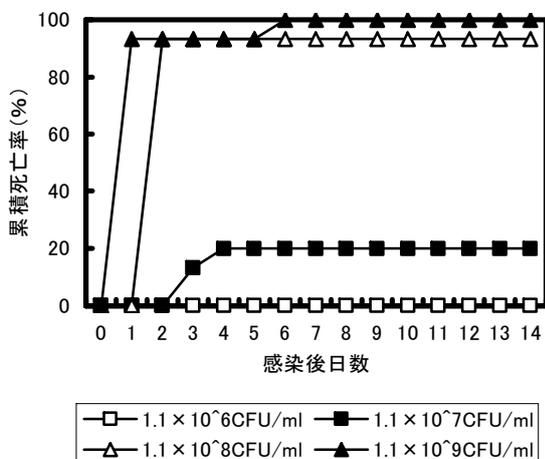


図4 累積死亡率の推移 (供試菌株: 041012)

表2 試験終了時における累積死亡率

菌株名	由来	D1	D2	D3	D4
MR04	マダイ	6.7	86.7	80.0	73.3
KR04	マダイ	13.3	66.7	93.3	86.7
040927	マダイ	0	26.7	100	93.3
041012	マダイ	0	20.0	93.3	100
041221	マダイ	6.7	46.7	73.3	80.0

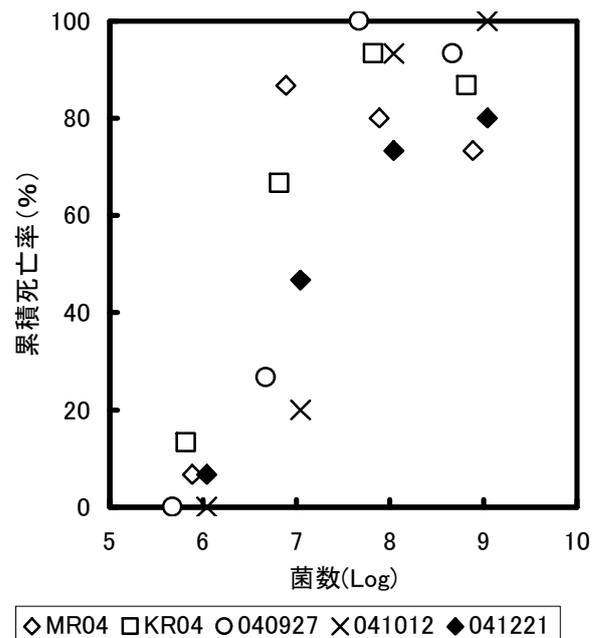


図6 菌数と累積死亡率との関係

ではMR04株及びKR04株で他の3株よりも高かった。

以上より、本試験で用いた5株の中ではMR04株及びKR04株で病原性が強いと判断された。また、試作ワクチンの有効性を判定する場合には 10^7 CFU/ml付

魚病ワクチンの実用化に関する研究

近を目安に菌濃度を設定しており、両株はワクチン試験における攻撃供試株としても適していると判断された。

(2) 野外株の免疫原性試験

1) 目的

ワクチン株に適した菌株を選定するため、野外収集株から調製したFKCワクチンのマダイにおける有効性を比較することを目的とした。なお、本試験は再現性も調べるため、由来の異なる2種類の種苗を用いて飼育試験を実施した。

2) 試験1 (A種苗)

①方法

試験にはマダイ由来5株 (MR04、KR04、040927、041012、041221) とヒラメ由来2株 (040917、M-1) の計7株を用いた。また、M-1株では免疫賦活物質の併用による有効性の向上を図るため、ヒラメで有効性の認められた添加物Xを添加した試験区も設けた。各ワクチンの抗原量は表3に示したように1尾あたり $10^8 \sim 10^9$ CFU に設定し、TPB 液体培地で培養した後に0.1%ホルマリンを添加し、48時間静置して不活化した。供試魚には平均体重29.1gのマダイA種苗を用い、1尾あたり0.1mlの割合で腹腔内注射法により各区40尾ずつワクチンを投与した。また、対照区の魚には滅菌PBS(-)を0.1mlずつ投与した。水温は25°Cに設定し、免疫期間は3週間とした。

表3 供試ワクチンの抗原量

菌株名	由来	抗原量(CFU/尾)
MR04	マダイ	1.3×10^9
KR04	マダイ	1.1×10^9
040917	ヒラメ	2.1×10^9
040927	マダイ	1.1×10^9
041012	マダイ	1.0×10^9
041221	マダイ	1.5×10^9
M-1	ヒラメ	5.0×10^8

攻撃試験にはマダイ由来の高知大学 No.1 株を用いた。攻撃菌濃度は 4.0×10^8 及び 1.0×10^9 CFU/ml の2段階で実施し、免疫魚を各区2分割してそのう

ちの15尾ずつを供試した。攻撃方法は腹腔内注射法とし、1尾あたり0.1mlを投与した。攻撃試験期間は21日間とし、水温は免疫時と同じ25°Cに設定した。そして、生残率を基に各区のワクチン有効率を算出した。死魚は直ちに持ち上げて解剖し、症状を確認した。また、SS寒天培地を用いて腎臓から菌分離を行い、エドワジェラ症による死亡であることを確認した。

②結果

攻撃試験期間中の生残率の推移を図7及び8に示した。図7に示した 10^9 での攻撃試験では、いずれのワクチン区でも開始直後に急激かつ大量の死亡が認められ、終了時における生残率の差は各ワクチン区と対照区で小さかった。一方、図8に示したように 10^8 オーダーでの攻撃ではいずれのワクチン区に

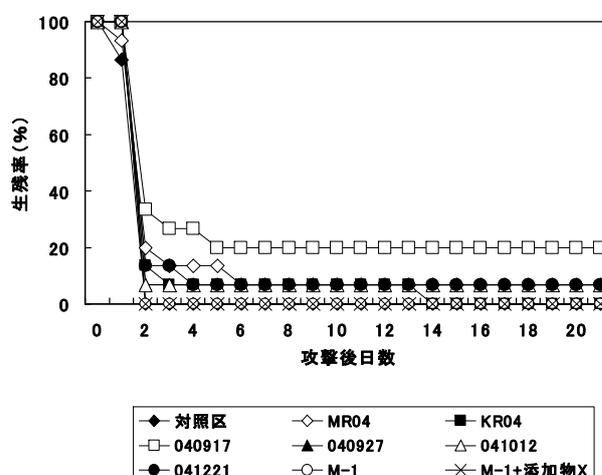


図7 攻撃試験期間中の生残率の推移
(菌濃度: 1.0×10^9 CFU/ml)

においても対照区より高い生残率が認められ、041221株及びM-1株では対照区と有意差がみられた。 10^8 オーダーでの攻撃試験の結果を基に算出したワクチン有効率を図9に示した。ワクチン有効率はM-1区で71.4%と最も高く、他のワクチン区ではいずれも実用化の目安とされる60%を下回った。しかし、M-1株由来のFKCワクチンと添加物Xとの併用による防御効果の向上はマダイでは認められなかった。

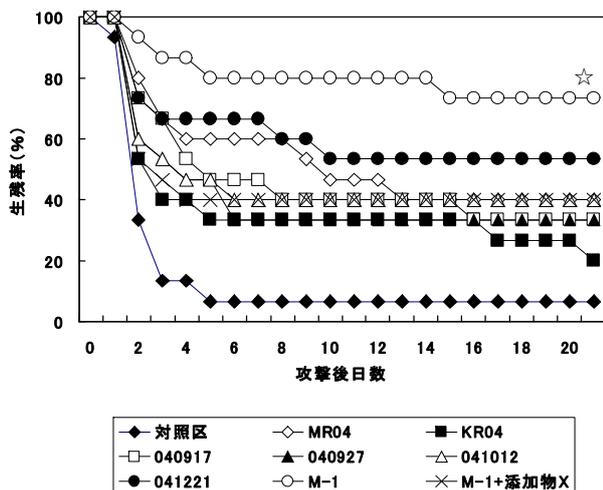


図8 攻撃試験期間中の生残率の推移
(菌濃度: 4.0×10^8 CFU/ml、☆: $p < 0.05$)

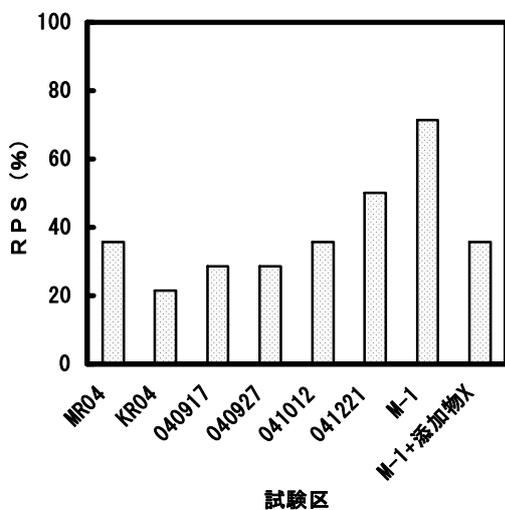


図9 ワクチン有効率
(攻撃菌濃度: 4.0×10^8 CFU/ml)

3) 試験2 (B種苗)

①方法

試験1と同一のワクチンを用い、試験1とは由来の異なる平均体重18.5gのマダイB種苗を用いて再度試験を実施した。ワクチンの投与量、投与方法も試験1と同様としたが、攻撃試験は菌数を 1.1×10^7 及び 4.0×10^7 CFU/ml の2段階に設定して実施した。攻撃期間、測定項目及び水温は試験1と同様とした。

②結果及び考察

累積死亡率の推移を図10及び11に示した。040917株を除いた各ワクチン区では対照区よりも生残率は

高かった。また、 1.1×10^7 CFU/ml では041221株、 4.0×10^7 CFU/ml では041012株でそれぞれ対照区と比較して有意に高い生残率が認められた。

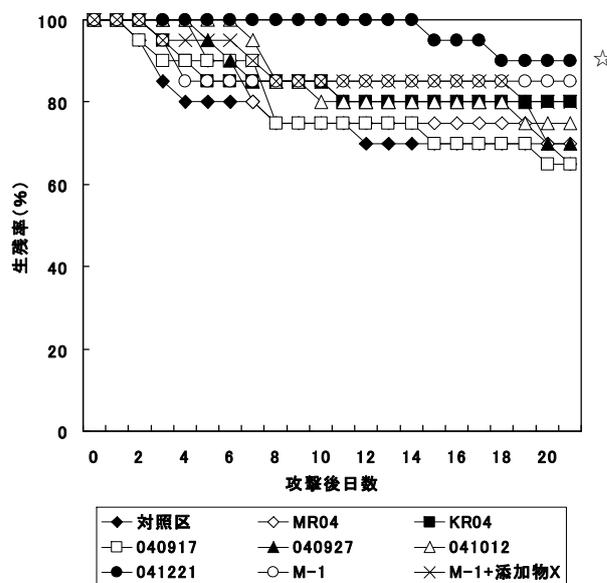


図10 生残率の推移
(攻撃菌数: 1.1×10^7 CFU/ml、☆: $p < 0.05$)

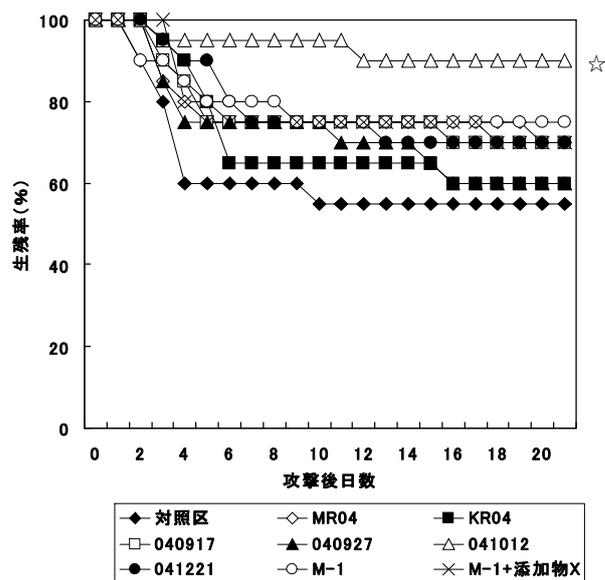


図11 生残率の推移
(攻撃菌数: 4.0×10^7 CFU/ml、☆: $p < 0.05$)

試験1と同様にしてワクチン有効率を算出した結果を図12に示した、生残率の高かった041221株及び041012株でそれぞれ66.7及び77.8%の高い値がみられたが、両菌濃度で比較すると両株とも結果が大きく異なり、不安定な結果となった。一方、M-1

魚病ワクチンの実用化に関する研究

株では両菌濃度で 44.4 及び 50.0% と他のワクチンと比較して高い値がみられた。試験 1 同様に M-1 株と添加物 X との併用による有効性の向上はみられなかったが、両菌濃度で差は小さかった。M-1 株は試験 1 で最も高い有効性が認められた株であり、本株は今回供試した野外株の中でワクチン株として最も適していると判断された。

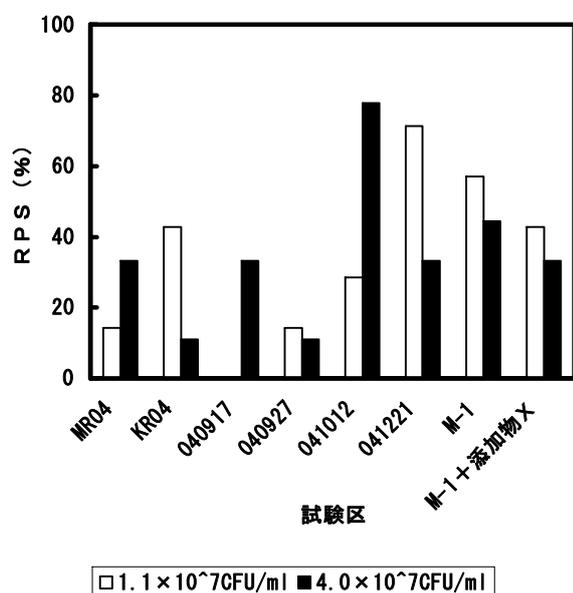


図 12 ワクチン有効率

今後は有効性の高い株を用いてワクチンの調製法や投与方法を改良して有効性の向上を図るとともに、追加免疫や免疫持続性の向上について検討する必要がある。また、本試験では攻撃菌株として高知大No. 1 株を用いたが、(1)で強毒株と判断されたMR04やKR04 株を用いた有効性の判定も実施する必要がある。