

魚病ワクチンの実用化に関する研究

川合研兒¹・細川秀毅²・大島俊一郎¹・安藤裕章³・渡辺 貢³・黒原健朗³・
青山雅人¹・イン リュウ¹・ガリンド ビジェガス ホルヘ²・橋本正則²・三木屋 統¹・新元 一¹

(¹高知大学農学部栽培漁業学科水族病理学研究室・²同水族栄養学研究室・

³高知県水産試験場)

Studies on the Development of Aquaculture Management Techniques to Maintain Fish Health

Kenji KAWAI¹, Hidetsuyo HOSOKAWA², Shunichiro OSHIMA¹, Hiroaki ANDO³, Mitsugu WATANABE³,
Kenro KUROHARA³, Masato AOYAMA¹, Ying LIU¹, Gorge GALINDO-VILLEGAS², Masanori HASHIMOTO²,
Hajime MIKIYA¹ and Hajime SHINMOTO¹

¹ Laboratory of Fish Diseases, Department of Aquaculture, Faculty of Agriculture;

² Laboratory of Fish Nutrition, Department of Aquaculture, Faculty of Agriculture;

³ Kochi Prefectural Experimental Station

Abstract: Development of a vaccine against *Edwardsiella tarda*, importance of farming conditions of fish to expect vaccine effect and prediction system for the outbreak of infectious disease were investigated. As one of the difficulties to develop *E. tarda* vaccine is the multiple serotypes of this bacterium, a newly found common antigen 37 kDa outer membrane protein of this bacterium was examined on its common efficacy against infection with different serotype bacteria. The Japanese flounder immunized with a strain of *E. tarda* by oral administration protected against infection with different 4 serotype strains. The result shows that a vaccine made of one serotype strain can protect against infection with any serotypes of *E. tarda*. Additional immunization at the time that the efficacy by one series of oral immunization was lost increased its efficacy again. In the second experiment, the concentration of general and fish pathogenic bacteria in the sea water around yellowtail, red sea bream and amberjack farms was monitored. To establish the monitoring systems of representative pathogenic bacteria, *Vibrio anguillarum*, *Lactococcus garvieae*, *E. tarda* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, in the sea water around fish-culture area, plate culture method, membrane filtration-agar plate culture-immunoblot system (immunoblot method), polymerase chain reaction (PCR) and competitive PCR were executed on cultured bacteria and experimental infection model using red sea bream and *E. tarda*. The immunoblot method and PCR performed on the representative pathogenic bacterial species showed species specificity. The competitive PCR resulted one order higher value in log. The results showed combination of immunoblot, PCR and competitive PCR can be utilize for qualitative and quantitative analysis for the monitoring of pathogenic bacteria in the sea.

キーワード: ヒラメ, ブリ, エドワジェラ症, 連鎖球菌症, 免疫, ワクチン, 病気発生予知

緒 言

水産養殖業を健全かつ安定的に発展させるために、これからはワクチンの使用が不可欠であるが、まだ実用化された魚類ワクチンは数少ない。また、魚病対策の第一歩は魚病の発生を未然に知ることであるが、その技術

は全く進んでいない。本研究はこれらの問題点を解決する研究の一環として行うものであり、魚病対策技術の発展に貢献するとともに、大学—地方自治体の協力による研究の推進に関わるものである。本研究は、高知大学と高知県水産試験場の共同研究で、平成 14 年度から4年間の計画で行うものである。本年度はその初年度であり、いずれの項目の研究も比較的基礎的あるいは次年度以降の研究の進展につながる研究となることを目的として行った。本年の研究計画は (1) 魚病ワクチンの実用化に関する研究、(2) 免疫応答を活性化させる飼育法の検討、および(3) 病気発症時期の予測とワクチン接種時期の決定の3当項目から成っている。これらのうち (1) および (3) については単年度としてもまとまりのある成果を得ることができたが、(2) については今後3年間の研究を通じて始めてまとめられる成果が期待できるものである。そこで、本年度は (1) および (3) についての成果をまとめて報告する。

研究(1) エドワジェラ症ワクチンの開発 — 複数血清型の菌の感染に対する効果 および効果持続性のための追加免疫効果の確認 —

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* のエドワジェラ症は *Edwardsiella tarda* を原因菌とする疾病で、1980 年から 1981 年にかけて長崎県内の養殖場から初めて分離され、翌年には京都府のほか全国的に発生するようになった(中津川, 1983)。エドワジェラ症は高水温期に発生する事が多く、また魚の发育段階にかかわらず発生して、発生頻度・累積死亡率ともに高いことから、養殖現場では非常に深刻な細菌性疾病である。感染魚は白濁した腹水の貯留による腹部の膨満とこれに伴う脱腸症状を主な特徴とするほか、眼球の白濁・突出・濃瘍形成、鰓ぐされ、鰭や口腔内の発赤などがみられる事がある(Miyazaki and Kaige, 1985; Kusuda and Salati, 1993)。

本症の原因菌 *E. tarda* はグラム陰性の周毛性の鞭毛を持つ短桿菌で、腸内細菌科に属する。本菌による感染症はヒラメのほか、ウナギ、コイ、キンギョ、ティラピア、アメリカナマズ、マスノスケ、ラージマウスバス、ボラ、チダイ、マダイおよびブリなど淡水・海水を問わず国内外で報告されている(Austin and Austin, 1999)。本症の予防法として、飼育密度の適正化、飼育環境の保全、栄養剤添加などによる栄養条件の改善などがあげられるが、いったん発病すれば化学療法剤による治療に依存しなければならないのが現状であり、病勢が強まったのちでは投薬効果が期待できない。また、不顕性感染が起こることも多く、このような場合には病魚の発見が遅れて投薬の時期を逸することもある。さらに、感染魚は食欲が低下するために、経口投与による治療が難しい。以上のことから、本症の対策として予防技術の確立が重要とされる(川合, 2000)。

ところで、本菌には分離場所や宿主の由来により、多くの血清型あるいは変異株のあることが報告されており、このことがワクチン開発における大きな障害と考えられてきたために、これまでに本症ワクチンの実用化研究が遅れていた。しかし、近年になり病原菌 *E. tarda* の外膜タンパク質のうち 37 kDa の分子量のものがウナギにおいて感染防御抗原性を示し、さらに血清型が異なる多くの株で共通に存在することが明らかになった(Tu and Kawai)。また、ヒラメにおいてもこのタンパク質で注射免疫すると、異なった二つの血清型の菌の間で交差感染防御することが示されている(Tu and Kawai, 1998; 杉浦, 2001)。さらに、1菌株のみでの研究であるが、ホルマリン死菌ワクチンは注射法と経口投与法のいずれでも有効である結果も得られている(川合・青山, 2000)。

以上のような研究の流れを受け、本研究ではエドワジェラ症ワクチンの実用化を目指した研究として、*E. tarda* の 1 種類の血清型の株で作製したホルマリン不活化菌体(FKC)のワクチンを、投与方法としては最も簡便な経口投与方法を用いてヒラメに投与し、複数血清型の菌の感染に対し防御することを調べるとともに、効果が短いとされる経口ワクチンの追加投与による効果の延長についても検討した。

材料および方法

供試魚 供試魚には高知県海洋深層水研究所でふ化後、高知県栽培漁業センターで種苗生産し、高知県水産試験場で養成された、ふ化 70 日齢(平均体重 34.8 ± 23.1 g, 体長約 40 mm)のヒラメを用いた。魚は高知県水産試験場の屋内水槽で、紫外線照射滅菌流水海水を飼育水として用い、夏期は水温を $26 \pm 1^\circ\text{C}$ に保ちながら配合飼料(ドライペレット)を与えて飼育した。

供試菌株 供試菌株には表1に示す *E. tarda* 4株を用いた。これらの株は、すでに交差凝集反応によって血清型が異なることが明らかになっているものである(Tu and Kawai, 1999)。

表 1 供試 *Edwardsiella tarda* 菌株の由来等

菌株	分離場所	分離魚
EF-1	静岡県	ニホンウナギ <i>Anguilla japonica</i>
V-1	日本国内	ニホンウナギ
F-1	台湾	ニホンウナギ
M-1	三重県	チダイ <i>Erynnis japonica</i>

ワクチンの作製 ワクチン作製用菌株には EF-1 株を用いた。5 ml のブレインハートインフュージョン(BHI, Difco)に接種して 30°C で 18 時間前培養を行った。この全量を 1,000 ml の同培地に接種して 30°C で 10 時間振とう培養したのち、ホルマリンを 0.5 % の濃度になるように添加して室温で 48 時間不活化した。その後、 $5,500 \times g$ で 15 分間遠心分離によりホルマリン不活化菌体(FKC)を集めてリン酸緩衝食塩水(PBS)に懸濁し、防腐のためホルマリンを 0.3% の濃度となるように添加したものをワクチン(FKC ワクチン)原液とした。なお、同液は使用するまで 4°C で保存した。

免疫方法 供試魚は2群に分け、一方を免疫区、他方を非免疫対照区とした。免疫方法はすべてワクチンの経口投与法により行った。汎血清型有効性(複数血清型菌に対する有効性)を調べる実験では、供試魚の体重をもとに必要なワクチン原液量を計算し、FKC(湿重量)として 0.1 g/kg 体重となるようにドライペレットに均一に散布・吸収させたのち、 4°C で1日間乾燥させてワクチン添加飼料とした。ワクチン添加飼料は毎日朝と夕方に分けて、それぞれ食べ残しが無いように給餌した。ワクチン投与期間は2週間とした。

追加免疫効果を調べる実験では、汎血清型有効性の実験で免疫したヒラメの一部について、追加免疫区を設定し、初回免疫開始から8週間後に2週間の追加免疫を行った。

免疫後は両区とも通常どおり餌料を投与して、1 t 水槽で流水飼育した。

攻撃菌株の調整 EF-1, V-1, F-1 および M-1 の各保存菌株を5 ml のトリプトースフォスフェートブロス(TPB, Difco)で 25°C ・18 時間前培養を行ったのち、新鮮な同培地 200 ml に接種して 25°C ・10 時間静置培養したものを用いて、ヒラメに腹腔内注射および腎臓からの菌分離という過程で魚体通過を3回行い、強毒化したのち使用した。

攻撃試験 汎血清型有効性の実験では、初回免疫4週間後すなわち免疫終了2週間後に、TPB にて、 25°C ・18 時間静置培養した EF-1, V-1, F-1 および M-1 株の培養液を PBS で適宜 10 倍階段希釈して、免疫区と非免疫対

照区それぞれ 25 尾ずつに腹腔内注射法により 0.1 ml 接種した。培養液原液の寒天平板塗抹法による生菌数測定の結果、ヒラメに接種した菌数は EF-1 株が 2.5×10^2 CFU / 尾、V-1 株が 9.5×10^2 CFU / 尾、F-1 株が 7.8×10^2 CFU / 尾、M-1 株が 7.1×10^5 CFU / 尾であった。接種後 20 日間飼育観察を行い、死亡した魚については *E. tarda* の感染による死亡であることを確認するために、腎臓から菌分離して SS 寒天平板培地上で黒色コロニー形成の有無を調べた。さらに、平板上のコロニーについて抗 EF-1 ウサギ血清を用いたスライド凝集を行い、凝集の有無を確認した。

追加免疫効果の実験では、初回免疫から 12 週間後すなわち追加免疫終了 2 週間後に、攻撃菌株として EF-1 および V-1 株を用いて、汎血清型有効性試験における同じ培養方法で菌液を調整し、初回免疫 12 週間の魚（1 回免疫区）、初回から 8 週間後に 2 週間の追加免疫を行った魚（追加免疫区）および非免疫対照魚それぞれ 20 尾ずつの実験区を設定し、腹腔内注射法により菌液を接種した。接種菌数は、EF-1 株が 4.8×10^5 CFU / 尾、V-1 株が 9.8×10^2 CFU / 尾であった。これらの魚は、菌接種後 20 日間飼育観察を行った。

感染率の測定 汎血清型有効性・追加免疫のいずれの実験においても、20 日間の攻撃試験観察終了後にすべての生残魚の腎臓から菌の分離を行い、分離された場合には抗 EF-1 ウサギ血清を用いた凝集反応で凝集が確認された菌が分離された魚を保菌魚とし、死亡魚数と保菌魚数の合計を供試魚数で除した値を感染率として求めた。

$$\text{感染率} = (\text{死亡魚} + \text{保菌魚}) \div \text{供試魚} \times 100$$

血清抗体価の測定 免疫して 4 および 12 週間後に、免疫区と対照区からそれぞれ 5 尾ずつ取り上げて供試した。尾部静脈から血液を採取したのち血餅が凝集するまで静置し、 $1,500 \times g$ で 10 分間遠心分離して得た血清を用いた。なお採取した血清は使用するまでの間、 -70°C で凍結保存した。*E. tarda* 各株を BHI にて 30°C ・18 時間振盪培養し、ホルマリンを 0.3% の割合で添加して 30°C で 24 時間不活化後、PBS で 3 回遠心分離・洗浄した FKC の菌液を抗原液とした。凝集価の測定はマイクロタイター法を用い、ヒラメ血清を PBS で $25 \mu\text{l}$ ずつ階段希釈したものに抗原液を $25 \mu\text{l}$ 加え、室温で 1 時間・ 4°C で 1 晩インキュベート後に測定した。

結 果

攻撃試験 攻撃試験によりエドワジェラ症を発症したヒラメは、図 1 A および B に示すような本病特有の症状である腹水貯留による腹部膨満および脱腸を示した。

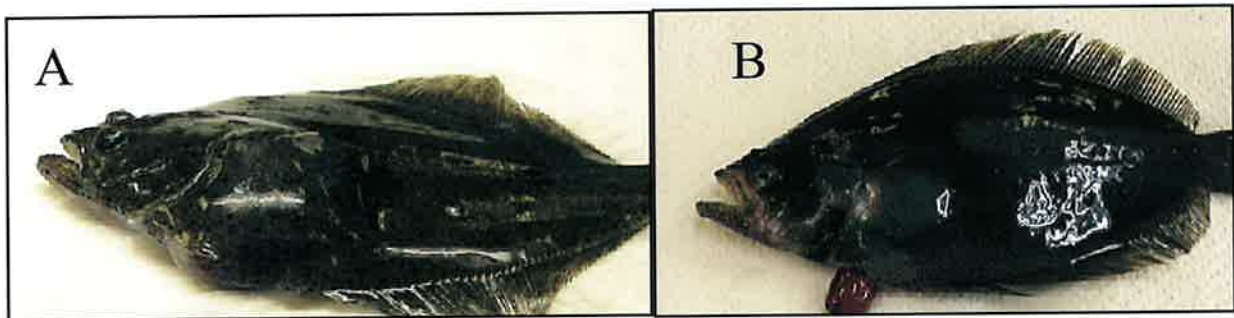


図 1 攻撃試験により発症したヒラメの症状

A : 腹水の貯留による腹部膨隆 B : 脱腸

E.tarda 各株における攻撃試験の生残率は図2-5に示すとおりである。いずれの血清型の菌株で感染を行った場合にも、対照区では約1週間後から死亡が始まった。V-1株で感染を行ったものでは、免疫区では7日後から17日後にかけて死亡し、対照区では6日後から20日後にかけて死亡した(図2)。最終的な生残率は免疫区が68%、対照区が32%となり、5%の有意水準で有意差が認められた。F-1株で感染させたものでは、免疫区では15日後から17日後にかけて死亡し、対照区では7日後から18日後まで死亡がみられた(図3)。最終的な生残率は、免疫区が88%、対照区が44%となり、1%の有意水準で有意差が認められた。

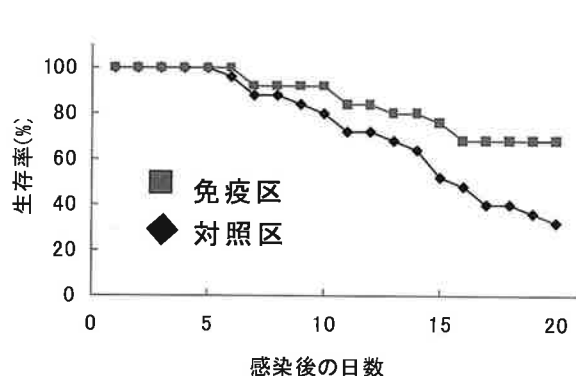


図2 *Edwardsiella tarda* V-1株を 9.5×10^2 CFU /尾の接種量で腹腔内注射による攻撃試験を行ったヒラメの生存率の推移

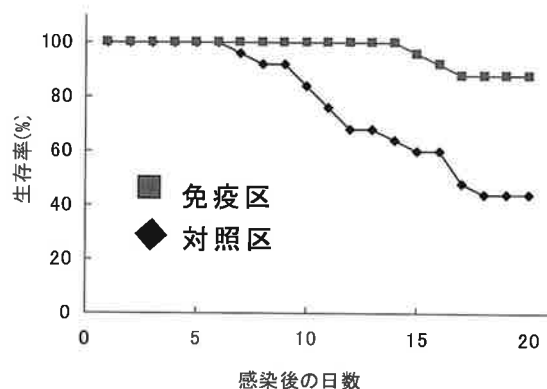


図3 *Edwardsiella tarda* F-1株を 7.8×10^2 CFU /尾の接種量で腹腔内注射による攻撃試験を行ったヒラメの生存率の推移

EF-1株で感染をさせたものでは、免疫区では9日後から11日後にかけて死亡し、その後は死亡が終息した(図4)。対照区では8日後から11日後にかけて死亡し、その後は死亡が終息した。最終的な生残率は免疫区が92%、対照区が88%となり有意差は認められなかったが、免疫区の方がやや高い値となった。M-1株で感染させたものでは、免疫区では14日後でのみ死亡がみられ、対照区では2日後から5日後にかけて死亡した(図5)。最終的な生残率は免疫区が96%、対照区が88%となり、有意差は認められなかった。

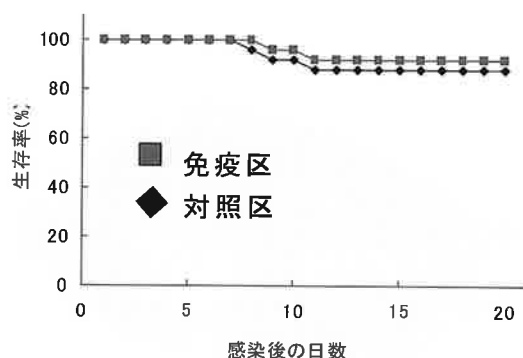


図4 *Edwardsiella tarda* EF-1株を 2.5×10^2 CFU /尾の接種量で腹腔内注射による攻撃試験を行ったヒラメの生存率の推移

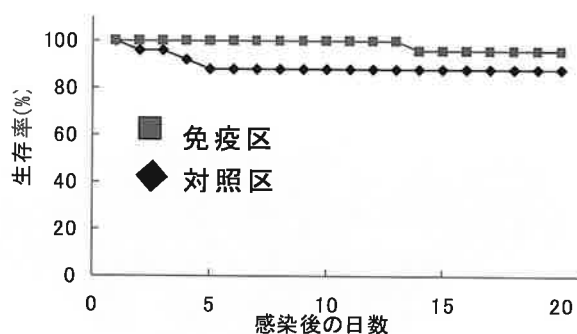


図5 *Edwardsiella tarda* M-1株を 7.1×10^5 CFU /尾の接種量で腹腔内注射による攻撃試験を行ったヒラメの生存率の推移

感染後の保菌検査における感染率は、V-1株およびF-1株で感染させた場合には明らかに免疫区のほうが低い感染率であったが、EF-1株およびM-1株で感染させた場合にはいずれも低い感染率で、免疫区・対照区の間ではほとんど差が認められなかった(図6)。

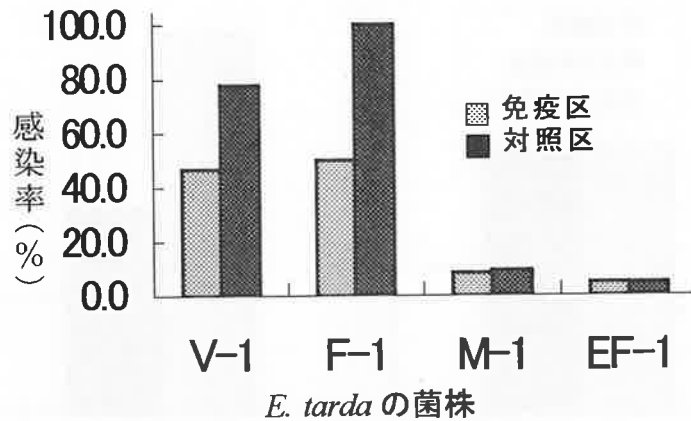


図6 *Edwardsiella tarda* の各菌株で腹腔内注射による攻撃試験を行ったヒラメの腎臓における菌の分離率

追加免疫を行った場合、EF-1株で感染させたものでは3日後から6日後にかけて各区で死亡がみられ、最終的な生残率は追加免疫区が80%、1回免疫区および非免疫対照区が55%となり、対照区と比較すると1回免疫区では差がなかったが、追加免疫区では有意差が認められた(図7)。V-1株で感染させたものでは、9日後以後に死亡魚がみられ、最終的な死亡率は追加免疫区および1回免疫区が90%、非免疫対照区が80%と有意差は認められなかったが、両免疫区の法がやや高い値を示した。

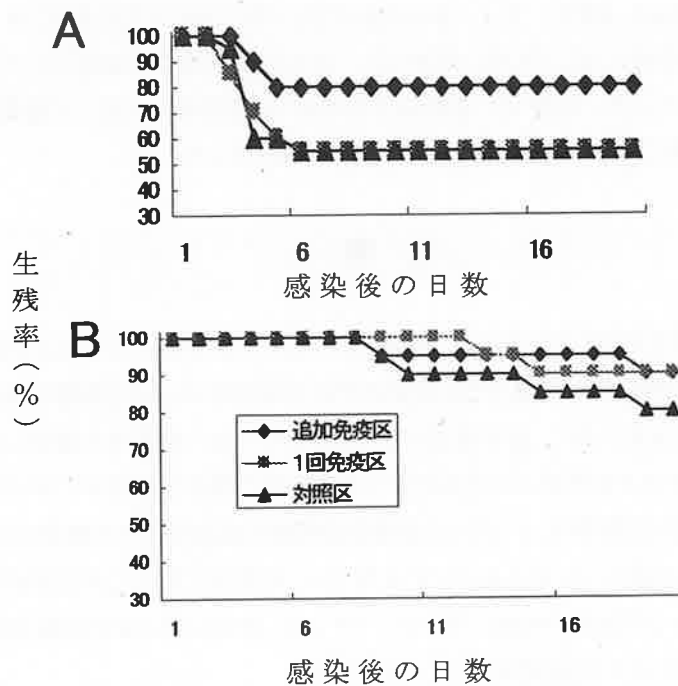


図7 1回免疫、追加免疫および非免疫対照の各区における攻撃試験後の生残率

A: 4.8×10^5 CFU / 尾の *Edwardsiella tarda* EF-1 株で腹腔内注射感染 B: 9.8×10^2 CFU / 尾の *E. tarda* V-1 株で感染

また、感染後の保菌検査における感染率は、EF-1 株で感染させた場合には追加免疫区が 25 %、1回免疫区が 45 %、および非免疫対照区が 45 %であった(図8)。V-1 株で感染させた場合には、追加免疫区が 20 %、1回免疫区が 35 %、および非免疫対照区が 65 %であった。

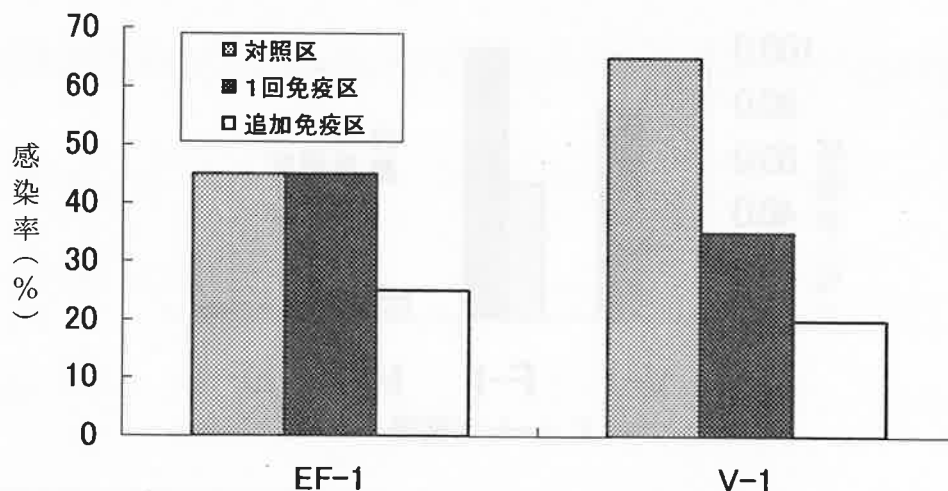


図8 *Edwardsiella tarda* EF-1 株および V-1 株で腹腔内注射による攻撃試験を行ったヒラメの腎臓における菌の分離率

■ 对照区：非免疫 ■ 1回免疫区：2週間のワクチン投与 □ 追加免疫区：1回目ワクチン投与後8週間からワクチン追加投与

血清抗体価 免疫4週間後のヒラメ血清において、マイクロタイター法によるヒラメ血清のFKC抗原に対する凝集抗体価(陽性を示す血清希釈倍数)は、EF-1、V-1、F-1 および M-1 株に対してそれぞれ 16、64、64 および 32 となり、血清型の異なるいずれの菌株に対しても高い値を示し、交差免疫の効果が確認された。対照区ではどの個体においても凝集性は認められなかった。免疫12週間後では免疫4週間後と比較して凝集価の低下が確認され、EF-1、V-1、F-1 および M-1 株に対してそれぞれ 16、8、8 および 4 となった。

考 察

攻撃試験によりエドワジエラ症を発症したヒラメは、本病特有の症状である腹水貯留による腹部膨満および脱腸を示し、実験的感染はおおむね自然感染を再現する症状を示すように行われたものと判断できる。ただし、EF-1 株と M-1 株とは分離してからの保存年数が長く、魚体通過を行ったのちも完全に病原性を復活したとはいえなかった。しかし、実験的感染としては、免疫区と対照区との差が認められる程度の強さで感染が行われたものと思われる。*E. tarda* の各株における攻撃試験の生存率は、いずれの血清型の菌株で感染を行った場合にも、免疫区のほうが高い生存率を示した。とくに、病原性が強かった V-1 および F-1 株では、対照区に対して有意差が認められる差となった。これらの結果から、EF-1 株のみで作製して免疫に用いたワクチンは、使用したいずれの血清型の菌株の感染に対しても抵抗性を付与し、血清型によらない免疫効果を示したといえる。

感染後の保菌検査における感染率は、EF-1株および M-1株で感染させた場合にはいずれも低い感染率で、免疫区・対照区の間でほとんど差が認められなかったことから明らかではなかったが、V-1株および F-1株で感染させた場合には明らかに免疫区のほうが低い感染率となり、攻撃試験の生存率と合わせて、本ワクチンの効果を裏付けることができた。さらに、攻撃試験後のヒラメでは、EF-1 株のワクチンで免疫したヒラメは、いずれの株に対しても血清中に

凝集抗体価を上昇させていた。このことから、単一の株のワクチンが複数の血清型菌に対して有効であることが示唆される。

追加免疫の有効性については、EF-1 株で攻撃試験を行ったのちの最終的な生存率は、1回(シリーズ)のみ免疫を行った場合には、免疫後 12 週間たってその効果がほとんど認められなくなったのに対して、追加免疫を行った魚では、1回免疫区および非免疫対照区よりも有意に高い生存率を示したことから、その効果が確認された。本研究では免疫をワクチンの経口投与法で行ったが、通常経口投与法は注射法や浸漬法よりも効果が低く、また効果の持続期間が短いと言われている。川合(1998)はその理由として、経口投与されたワクチンの抗原が消化管中で変性あるいは消化分解するためと考えられ、これに対処する方法としてマイクロカプセル化などが考えられるとしている。しかし、本研究では経口投与であっても十分な効果を現すことを示した。効果の持続期間については、確かに 10 週間後に消失するという一般に考えられているとおりの結果となったが、追加投与を行うことによって効果の復帰ないし上昇が認められた。経口投与法は、先に述べた欠点を除けば、魚にストレスをかけず、また魚に触れて体表等を傷つけることがない優れた方法である。また、投与に際して作業が簡単であることから、追加投与にも問題がない。したがって、効果の持続性を追加投与によって補うことができることが明らかとなったので、本ワクチンの実用化は一層進む可能性が出てきたものと思われる。

以上のように、本ワクチンの実用化に向けて最も障害になると思われる問題点である血清型および効果の持続性は、解決できる見通しがついたものと判断される。今後は、ワクチンの生産上で問題となると考えられる、より少量での効果および大量生産のシステムを検討する必要があると思われる。

研究(2) 免疫応答を活性化させる飼育法の検討

(本年度報告省略)

研究(3) 病気発症時期の予測とワクチン接種時期の決定 — 養魚環境海水中の魚病細菌定量法に関する研究 —

本格的な海産養殖産業は 1950 年代中期から始まり、この後飛躍的に発展してきたが、漁場の富栄養化や種苗魚の移動などにより、多くの感染症が発生するようになった。1960 年代後半にはノカルジア症、ビブリオ病および細菌性類結節症が、1970 年代にはレンサ球菌症、1970 年代中期からはエドワジエラ症による被害が相次ぎ、近年ではイリドウイルスに代表されるウイルス性疾病が被害を拡大し問題となっている。これに対応し、治療薬として多種類の抗菌剤が開発され、また、予防薬として近年ではワクチンの開発も盛んになりつつある。これらの抗菌剤やワクチンは、各種疾病に対して、それぞれ効果を示してきたが、多剤耐性菌の出現や食品衛生上の問題から、抗菌剤を頻用することは望ましくない。また、ワクチンは有効な病気の種類に限られ、すべての感染症について開発・商品化されているわけではない。このような状況から、現在最も必要とされ、かつ基本的な対策は、疾病の発生と流行を未然に防除することである。しかし、このような観点から行われた研究は、飼育水の比重などの環境面および宿主条件等について調べた研究(谷口, 1984)、魚病発症に関わる溶存酸素に着目した研究(福田ら, 1997a; 1997b)などわずかしかない。養殖環境水域の水質の観点から、環境水中における病原細菌の経時的および地理的変動をもとにした、魚病発症予知のシステムを確立することは、病気の発症・蔓延を未然に防ぐために必要不可欠である。このようなシステムを確立するためには、まず海水中における病原体各種の検出・定量を行う技術を確認させる必要がある。そこで、まず代表的な魚病細菌について各検出・定量法の確立をめざ

し、その有効性を調べ、実験的モデル感染系におけるこれらの方法の実用性についても検討した。すなわち、これまでに水中からの各種細菌の検出・同定および定量法としては、寒天平板培地上に生じたコロニーを計数したうえで、各コロニーの菌を分離して性状検査を行うか、抗血清を用いたスライド凝集反応により、同定を行う方法が一般的である。しかし、この手法では多数出現するコロニーを形状などの不正確な基準で選別したのち同定するため、得られる結果も不正確なものになる。また、出現したすべてのコロニーについて種の同定を行うには多大な労力を要する。そのため、上記の手法では多数のサンプルを扱うには不向きであるといえる。そこで、より簡便かつ迅速な検出・定量法の確立を試みるために各種魚病細菌の至的塩分濃度の差異に着目し、選択性の高い分離を可能にする増殖培地を一般海洋細菌や選択培地も併せて検討した。検出法としてウェスタンブロット法およびコロニーブロット法を応用した colony immunoblot 法を確立し、その実用性について検討した。また、検出系において最も迅速、かつ精度が高いと思われる polymerase chain reaction (PCR)法について感度と実用性を検討したのち、competitive PCR 法を用いて PCR 産物のコピー数からの菌数の定量化を試みた。

つぎに、検討した定量方法の応用として次の観点から実験を行った。これまでに *E. tarda* を病原菌とするエドワジェラ症は、感染流行期に病魚や死魚からの排泄により、一時的に環境水中に存在することが知られている(金井ら,1988)。また、飼育水中の溶存酸素濃度の変化は、魚病の発症および進行に大きく影響するという報告がある(福田ら,1997a,1997b)。そこで、先に検討した定量法についてその応用について検討するために、*E. tarda* を用いた感染試験を行った。また、感染試験と並び飼育水の溶存酸素濃度を低下させる区を設定した。各種条件下における *E. tarda* の検出、定量をするとともに、海洋一般細菌および *Vibrio* 属細菌の菌数の変動を調べ、定量法の応用について検討した。

材料および方法

使用菌株 実験には、エドワジェラ症の原因菌である *E. tarda* , α 溶血型レンサ球菌症の原因菌である *L. garvieae* , ビブリオ病の原因菌である *V. anguillarum* および細菌性類結節症の原因菌である *P. damsela* subsp. *piscicida* の4種を用いた。これらの菌株の由来を表2に示す。

表2 供試菌株の由来等

菌種	株名	分離由来
<i>Edwardsiella tarda</i>	1141	<i>Eyynniss japonica</i> (チダイ)
	2046	<i>E. japonica</i>
	3745	<i>Pagrus major</i> (マダイ)
	3794	<i>P. major</i>
	EF-1	<i>Anguilla japonica</i> (ニホンウナギ)
<i>Vibrio anguillarum</i>	V-1212	<i>Plecoglossus altivelis</i> (アユ)
	V-1037	<i>P. altivelis</i>
	V-1155	<i>Seriola quinqueradiata</i> (ブリ)
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	3529	<i>S. quinqueradiata</i>
<i>Lactococcus gandeae</i>	SS91-014N	<i>S. quinqueradiata</i>
	YT-3	<i>S. quinqueradiata</i>

平板培地による菌数測定 一般海洋細菌数の測定には FeTY 培地[0.005 % Trypticase pepton (BBL), 0.0005 % 酵母エキス (Sigma), 0.0001 % クエン酸第二鉄および 1.5 % 寒天の濃度になるように 80 % ろ過海水に溶解]を用い, 魚病細菌数測定には 2.5 % の NaCl および 1.5 % の寒天を加えた Bacto tryptose phosphate broth (Difco) および NaCl を含まない普通寒天培地[10 % Bacto pepton (Difco), 5 % 肉エキス(ミクニ) および 1.5 % 寒天, pH 7.0]を用いた. *E. tarda* の測定には選択培地である SS 寒天培地(日水)を, *Vibrio* の菌数測定には選択培地である TCBS 寒天培地(日水)を用いた.

ろ過法による集菌と発育培地の選択性 各種魚病細菌の培養には Brain heart infusion (BHI, Difco)を用い 25 °C の条件で 24 時間培養した. 培養後, $2,000 \times g$ の遠心により集菌し, あらかじめオートクレーブで滅菌しておいた人工海水(マリンアート SF1, 千寿製薬)を用いて洗菌した. 1 ml の滅菌人工海水に再懸濁したのち, この菌液を 10 倍階段希釈した. 10^{-3} から 10^{-7} の各希釈菌液を 1 l 滅菌人工海水に再懸濁した. このように調製した菌液を, 5A サイズのろ紙(Aavantec)を用いてろ過後, 孔径 $0.2 \mu m$ の Omnipore membrane filter (Millipore) で, アスピレーターを用いて吸引ろ過した. フィルター上に捕捉した菌を, ろ過滅菌済みの同じ試水 1 ml でピペッティングにより洗浄・回収した. このように回収した濃縮菌液について, ろ過滅菌した試水を用いて 10 倍階段希釈を行い, 各希釈液 $100 \mu l$ を各培地に塗抹したのち, 25 °C で 24 時間および 48 時間培養後, 出現したコロニー数を計数した.

colony immunoblottingによる病原菌の検出 対象菌の 4 種を NaCl 2% 添加 BHI 平板寒天培地に接種し, 一定時間培養した後, 平板上に増殖したコロニーをメンブレンフィルターに転写した. 10 % スキムミルクで 45 分間ブロッキングした. その後, 1 次抗体としてウサギ血清を, 2 次抗体として 2,000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ IgG (ワコー)を用いた. それらは, それぞれ室温で 45 分間反応させた. 発色にはイムノステイン HRP 1000 (コニカ)を用いた. なお, 各ウサギ血清はその抗体価に応じて希釈したものをを用いた.

病原細菌からの核酸の抽出 BHI により 24 時間培養した各菌液について, 1 ml を 1.5 ml チューブに取り $2,000 \times g$ で 10 分間遠心後, 培地成分を除いた. その後, PBS を用いて洗菌した. この菌液に, BL 緩衝液 $45 \mu l$ およびプロテイナーゼ K $5 \mu l$ を加え, 55 °C 2 時間反応させて溶菌した. 反応後フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール[25 : 24 : 1 (v : v : v)]分画して除タンパクを行った. その後, エタノール沈殿によって核酸をペレット化し, 濃縮遠心機で 10 分間乾燥後, $100 \mu l$ の純水に再懸濁し, 核酸抽出液とした.

***E. tarda*における16S rDNA塩基配列の決定** *E. tarda* 3745 株の核酸を上記の方法を用いて抽出したのち, Weisburg らの方法(1991)に従い M1F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), M2F (5'-CGGAATTACTGGGCGTAAAG-3') および MIR (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') をプライマーとして用い, 16S rDNA 領域を標的とした PCR 反応を行った. 得られた PCR 産物は EASYRAP™ Ver2 (タカラ)を用いて精製した. 塩基配列の決定は Bigdye terminator cycle sequencing FS ready reaction kit (Applied Biosystems) を用いて, サイクルシーケンサー反応を利用したダイデオキシ法(Sanger *et al.*, 1977)により行った. 精製した PCR 産物に Big dye プレミックスを $4 \mu l$, 4 pmol/ml のセンスプライマーを M1F-MIR および M2F-MIR での各 PCR 産物精製物に, アンチセンスプライマーを M1F-MIR での PCR 産物精製物に添加し, 純水で $20 \mu l$ にメスアップした. 96 °C, 1 分 30 秒間の前処理後, 96 °C 30 秒, 50 °C 15 秒, 60 °C 4 分の反応条件で PCR を行い, 反応サイクルは 25 サイクルとした. PCR 産物は, 別の 1.5 ml チューブに移したのち, エタノール沈殿を行い, 核酸をペレット化した. そのペレットを Template suppression reagent (TSR, Applied Biosystems) $15 \mu l$ に溶かし, 94 °C 4 分間加熱後, 急冷した. 塩基配列の解析には, ABI PRIm 301 システムを使用した.

*E. tarda*のPCRプライマーの設計 本実験において *E. tarda* の PCR 反応に用いたプライマーは NCBI に登録されている *E. tarda* ATCC 15947 株の 16S rRNA の塩基配列を参考にして設計した(表3).

表3 細菌検出に供試した PCR プライマー

菌種	プライマー	ターゲット遺伝子	Sequence (5'-3')
<i>Edwardsiella tarda</i>	ETF ETR	16S rRNA	CGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGTAGGG AAGGCACTCCCGTATCTCTACAGG
<i>Lactococcus garvieae</i>	SA1B10-1F ^{1*} SA1B10-1-R	Dihydropteroate synthase gene	CATTTTACGATGGCGCAG CGTCGTGTTGCTGCAACA
<i>Vibrio anguillarum</i>	VAH1-P1 ^{2*} VAH1-P2	Hemolysin gene	ACCGATGCCATCGCTCAAGA GGATATTGACCGAAGAGTCA

^{1*} designed by I. Hirono et al. (2000)

^{2*} designed by T. Aoki et al. (1996)

PCR PCR 反応に用いたプライマーは表3に示すとおりである. PCR 反応液の組成は 10 × Taq polymerase buffer 5 μ l, dNTP mix 4 μ l, DMSO 1 μ l, Template DNA 100 ng, 各プライマー (100 pmol/μ l) 0.5 μ l, 1.25 u Taq polymerase をそれぞれ添加し, 純水で全量 50 μ l とした. PCR 反応には Thermal Cycler (P-808ASTEC) を用い, PCR 反応の各温度設定は表4に示すとおりとした. PCR 産物の解析は TBE 緩衝液 (50 mM Tris, 25 mM ホウ酸および 1 mM EDTA) を用いた 1.5 % アガロースゲルで電気泳動を行ったのち, エチジウムブロマイドにより染色し, トランスイルミネーターにより検出, 判定した.

表4 PCR の温度条件

菌種	変性	アニーリング	伸長
<i>Edwardsiella tarda</i>	94 °C-30s	68 °C-30s	72 °C-30s
<i>Lactococcus garvieae</i>	94 °C-30s	58 °C-30s	72 °C-1 min
<i>Vibrio anguillarum</i>	94 °C-30s	57 °C-30s	72 °C-1 min

PCRの検出限界 BHI にて培養した各病原菌を生理食塩水を用いて洗菌したのち, 同溶液を用いて 10 培階段希釈をした. これらを各 100 μ l 用いて BHI 寒天培地に塗抹し, 24 時間培養後に生細菌数 (CFU) を測定した. また, 同様の菌液 100 μ l を用いて常法に従って核酸抽出後, PCR 反応に供したのち判定を行い, 検出限界を求めた.

PCRの特異性 BHI にて培養した各病原菌を上記の方法で核酸抽出を行ったのち, 分光光度計を用いてその核酸量を測定した. その値をもとに各菌の核酸量が等量になるように純水を用いて補正した. これらサンプルを

用いて PCR 反応を実施し、各プライマーの特異性について検討した。

competitive PCRによる定量法の確立 目的遺伝子増幅用プライマーで増幅できる DNA competitor を Competitive DNA construction kit (タカラ)を用いて合成した。94 °C 1分 30 秒間の前処理後、94 °C 30 秒、60 °C 30 秒、72 °C 1分を1サイクルとして 30 サイクルの PCR 反応を行った。得られた PCR 産物中のプライマー等を Suprec-02 (タカラ)を用いて精製し、OD260nm の吸光値を測定することで核酸量を決定した。精製した PCR 反応後の溶液について純水を用いて 10 倍階段希釈列を作成したのち、各希釈液について2倍階段希釈列を作成し DNA competitor とした。各濃度の DNA competitor 5 μ l を PCR 反応溶液に加え PCR 反応を行った。なお、反応温度の設定は表4に示すとおりである。この時の Template DNA は PCR の検出限界を調べた時のものを用いた。PCR 産物の確認は常法に従って行い、目的の核酸のコピー数は同濃度のバンドとして観察される DNA competitor のコピー数とした。

供試魚 供試魚には日本水産(株)から入手した平均体重 28.43 ± 0.90 g のマダイ当歳魚を用いた。

実験区の設定 20l 水槽及び 100l 水槽を用いて図9に示す実験区を設定した。溶存酸素(DO)濃度の測定には DO メーターを用いた。DO 濃度の変化は、換水率を 5 ml/秒に合わせるとともにエアレーションの有無によって、高 DO 区は 6.39 ± 0.45 mg/l、低 DO 区は 3.24 ± 0.80 mg/l に設定した。また、水温はヒーターを用いて 22.8 ± 1.13 °Cとした。供試魚の馴致はヒーターを 20 °C に設定し換水率を 10ml/秒で1日馴致した後、ヒーターを 25 °C に設定し、換水率を 5ml/秒にした。

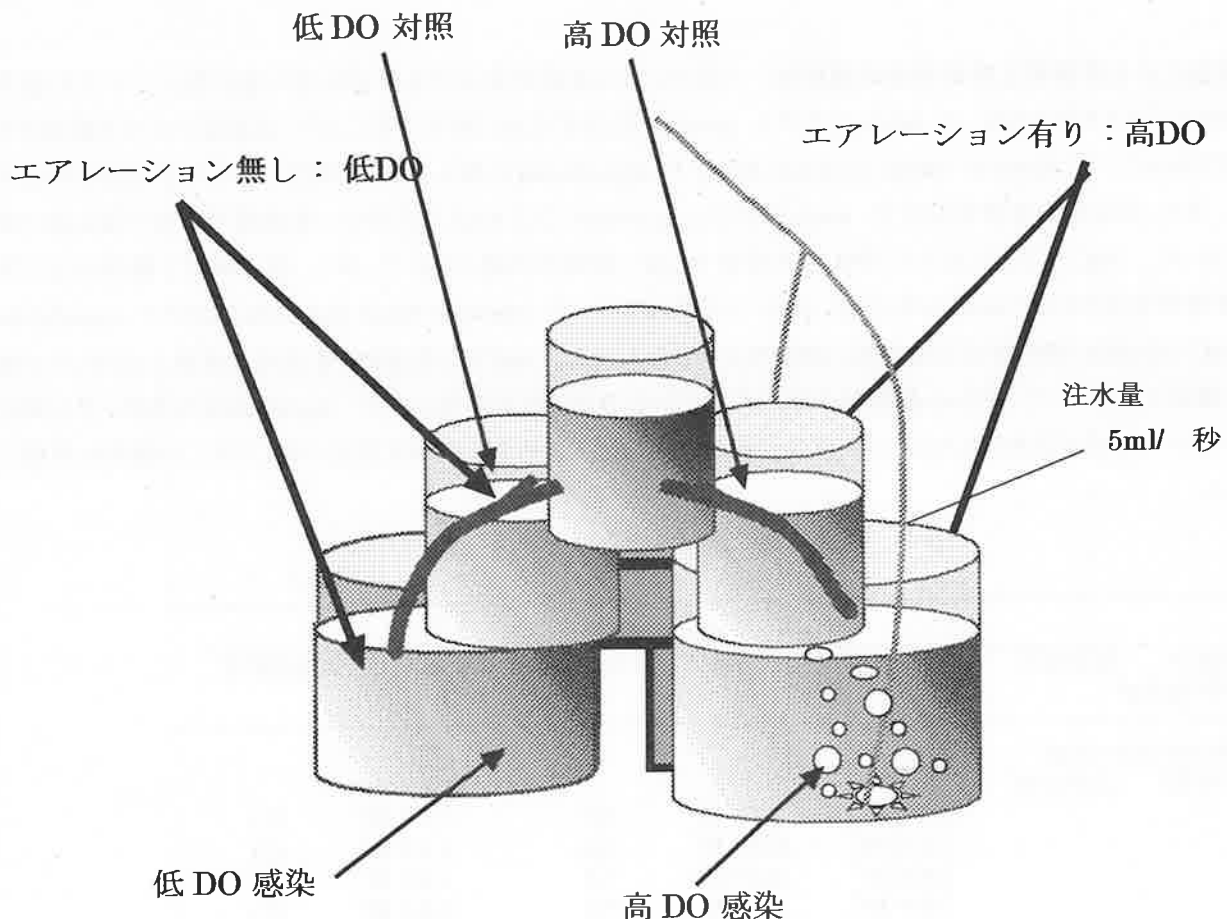


図9 *Edwardsiella tarda* 水平感染用飼育水槽の概略

魚病ワクチンの実用化に関する研究

感染方法 *E. tarda* 3794 株の凍結保存菌を実験に供試した。BHI 培地を用い 25℃・14 時間培養した生菌を各試験区 20 尾ずつ腹腔内注射法で 0.1 ml 接種した。接種菌数は 4.8×10^6 CFU/尾であった。また、非接種対象区として同量の PBS を 20 尾ずつ腹腔内注射した実験区を設けた。なお、生残率の有意差検定には Sig Test を用いた。

死亡魚の確認 死亡した魚について、腎臓から分離した菌が SS 寒天培地で黒色のコロニーを形成することを調べ、*E. tarda* の感染による死亡であるのかどうかを調べた。

採水および集菌 採水は、1 l 容ポリプロピレン製広口ビンを用いて、実験開始日から3日おきに行った。集菌は常法に従って実施し、1.5 ml チューブに移して以下の実験に供した。

飼育水中の生菌数測定 集菌したサンプルを常法に従って 10 倍階段希釈を行ったのち、FeTY 培地、TCBS 寒天培地および SS 寒天培地にそれぞれ 100 μ l ずつ塗抹した。25℃で培養し、24 および 48 時間後に計数を行った。

PCRおよびcompetitive PCRによる検出と定量 集菌したサンプル 100 μ l を用い、常法に従って PCR 反応を行った。また、competitive PCR についても同様に実施した結果をもとに、DNA コピー数から菌数を求めた。

結 果

ろ過法による集菌率と発育培地の選択性 ろ過法による集菌率および各発育培地の選択性についての結果は表5に示すとおりである。*E. tarda* および *L. garvieae* はほぼ完全に回収できており、各濃度における集菌率も一定であった。*P. damsela* subsp. *piscicida* および *V. anguillarum* に関しては、高濃度になるほど回収率が低下した。また、各培地の発育状況は *E. tarda* および *L. garvieae* では NaCl を含まない普通寒天培地で最も高い増殖性を示し、NaCl 2.5 % 加えた TPB 寒天培地でも高い増殖性が認められた。また、腸内細菌分離用培地である SS 寒天培地には *E. tarda* のみが黒いコロニーを形成した。*P. damsela* subsp. *piscicida* および *V. anguillarum* は NaCl 3% 添加 TPB 寒天培地で高い増殖性を示した。しかし、NaCl を含まない普通寒天培地ではほとんど増殖が確認されなかった。*Vibrio* 属細菌分離用培地である TCBS 寒天培地には *V. anguillarum* を含め、どの菌からもコロニー形成が認められなかった。海洋細菌分離用培地である FeTY 寒天培地に関してもこの傾向は同様であった。

表5 各種培地による4種類の魚病細菌の生菌数測定
(CFU/L)

菌液の 希釈度(log)	培地の種類					
	BHI寒天	普通寒天	TPB寒天	FeTY寒天	SS寒天	TCBS寒天
<i>Edwardsiella tarda</i>						
1(原液)	2.98×10^8				3.4×10^8	
3		3.8×10^5	3.8×10^4	<1	2.7×10^4	<1
4		2.2×10^4	6.0×10^2	<1	1.1×10^3	<1
5		2.4×10^3	1.1×10^2	<1	1.4×10^2	<1
6		3.5×10^2	2.0×10^1	<1	2.0×10^1	<1
7		1.1×10^1	1.5×10^1	<1	4.0×10^0	<1

表5 続き

菌液の 希釈度(log)	培地の種類					
	BHI寒天	普通寒天	TPB寒天	FeTY寒天	SS寒天	TCBS寒天
<i>Lactococcus garvieae</i>						
1(原液)	6.8×10^9					
3		1.1×10^6	1.1×10^6	<1	<1	<1
4		1.3×10^5	7.1×10^4	<1	<1	<1
5		1.6×10^4	7.3×10^3	<1	<1	<1
6		1.6×10^3	6.1×10^2	<1	<1	<1
7		1.3×10^2	7.4×10^1	<1	<1	<1
<i>Vibrio anguillarum</i>						
1	1.16×10^9					
3		6.5×10^0	6.8×10^6	<1	<1	<1
4		2.0×10^0	5.8×10^5	<1	<1	<1
5		<1	1.1×10^4	<1	<1	<1
6		<1	2.0×10^3	<1	<1	<1
7		<1	6.5×10^2	<1	<1	<1
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>						
1	9.60×10^9					
3		<1	2.9×10^5	<1	<1	<1
4		<1	1.2×10^5	<1	<1	<1
5		<1	2.0×10^4	<1	<1	<1
6		<1	1.4×10^3	<1	<1	<1
7		<1	2.2×10^2	<1	<1	<1

colony immunoblottingによる検出 4種の菌のコロニーが平板上に出現したものについて、各菌の抗血清を用いて colony immunoblottingを行った結果を図10に示す。抗体による染色の強弱は菌によって差があるものの、出現したコロニー通りに発色が認められた。

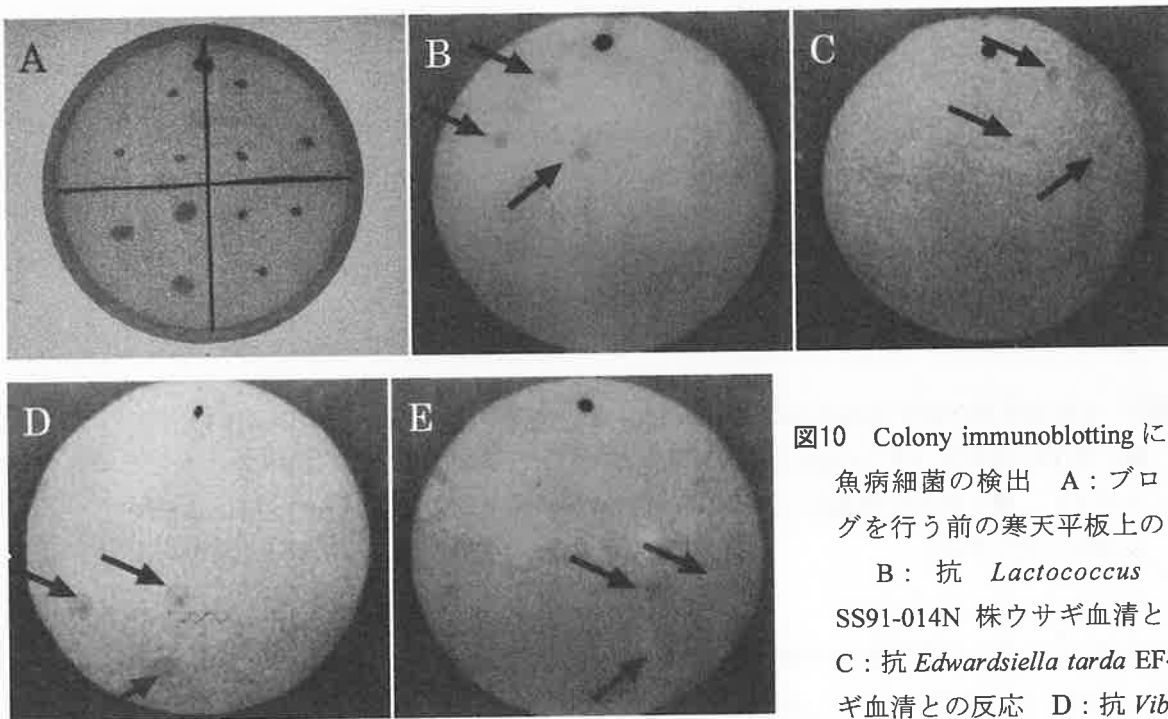


図10 Colony immunoblotting による各種
魚病細菌の検出 A: プロッティング
を行う前の寒天平板上のコロニー
B: 抗 *Lactococcus garvieae*
SS91-014N 株ウサギ血清との反応
C: 抗 *Edwardsiella tarda* EF-1 株ウサ
ギ血清との反応 D: 抗 *Vibrio an-*
guillarum V-1155 株 (J-O-3 型)ウサギ血清との反応 E: 抗 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*
P-3529 株ウサギ血清との反応

guillarum V-1155 株 (J-O-3 型)ウサギ血清との反応 E: 抗 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*
P-3529 株ウサギ血清との反応

DNAシーケンスによる*E. tarda* E-3745株の塩基配列分析結果 *E. tarda* 16S rRNA の塩基配列はNCBI のデータベースに登録されているマダイ由来 *E. tarda* NB8031 株の同遺伝領域と相同性 99%であった。プライマー設計部位については ATCC 15947 株, NB8031 株および他の *E. tarda* の菌株と同配列であった。

PCRによる検出 PCR における検出は *E. tarda*, *L. garviaeae* および *V. anguillarum* のいずれについても、それぞれ予測された PCR 産物の塩基量 605bp, 709bp および 487bp の位置にシングルバンドが確認できた。交差反応についてはそれぞれ対象外の菌株からバンドが確認されなかった。なお、検出限界は、*E. tarda* が 1.2×10^3 CFU/ml, *L. garviaeae* が 4.5×10^0 CFU/ml および *V. anguillarum* が 1.1×10^5 CFU/ml であった。

competitive PCRによる定量 competitive PCR における competitor DNA のコピー数と各 CFU 既知の希釈菌液から抽出した核酸量との相関関係は直線性を示し、検出範囲は 10^3 CFU から 10^6 CFU であった。最小限界は PCR における検出限界と同様であり、最大限界は 10^6 CFU と見なされた。

生存率 実験感染後の生存率の変化は図 11 に示すとおりである。高 DO 区では攻撃試験開始日から2日後、低 DO 区では3日後から死亡魚が認められた。低 DO 区の生存率の低下は高 DO 区と比較して顕著であった。また、高 DO 区の死亡が実験感染6日後以降認められなかったのに対して、低 DO 区では実験感染9日後についても認められた。最終的な生存率は高 DO 区が 60 %, 低 DO 区が 35 %であり、有意差は認められなかったものの低 DO 区の方が低かった。なお、攻撃試験期間中の全死亡魚について腎臓から菌分離を実施した結果、すべての個体から *E. tarda* が検出された。低 DO および高 DO 対照区についても同様に検討した結果、*E. tarda* は検出されなかった。

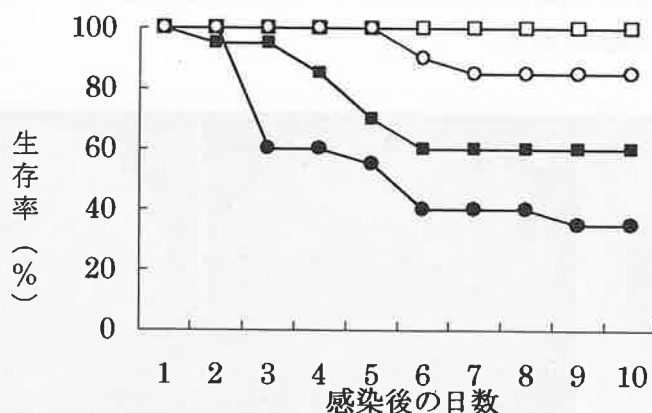


図11 4.8×10^6 CFU/尾の *Edwardsiella tarda* 3794 株で感染させたマダイの生存率の推移

■ : 高 DO 感染区 (*E. tarda* を注射したマダイ) □ 高 DO 対照区 (PBS を注射したマダイ) ● : 低 DO 感染区 (*E. tarda* を注射したマダイ) ○ 低 DO 対照区 (PBS を注射したマダイ)

生菌数 各増殖培地を用いた飼育水中の菌数測定の結果を図 12 に示す。SS 寒天培地を用いて *E. tarda* の菌数を測定した結果、実験感染4日後から高 DO 区では $2.5 \log$ CFU/l, 低 DO 区では $3.2 \log$ CFU/l の菌数が確認された。低 DO 区からは高 DO 区よりも $0.6 \log$ CFU/l 近く高い菌数を確認した。また、死亡が認められなくなった実験感染6日後以降、高 DO 区の飼育水からは、10 日後の測定で *E. tarda* を検出できなかったのに対し

て、死亡が続いていた低 DO 区からは最終日まで *E. tarda* を検出した。また、対照区からは *E. tarda* が全く検出されなかった。

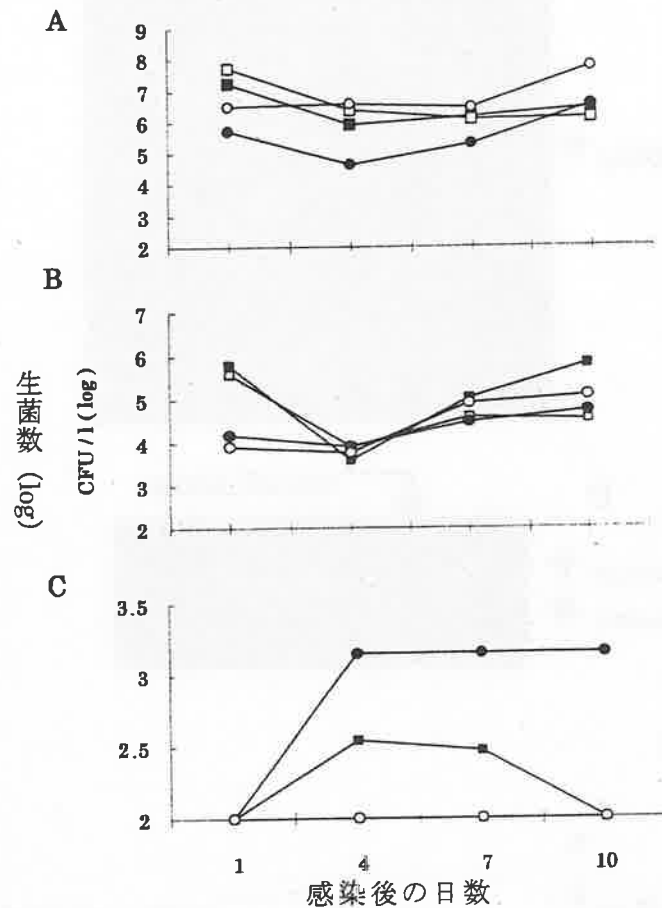


図12 マダイ飼育水中の生菌数の推移

A : FeTY 寒天培地 B : TCBS 寒天培地 (主として *Vibrio* 属細菌) C : SS 寒天培地 (主として *Edwardsiella tarda*) ■ : 高 DO 感染区 (*E. tarda* を注射したマダイ) □ 高 DO 対照区 (PBS を注射したマダイ) ● : 低 DO 感染区 (*E. tarda* を注射したマダイ) ○ 低 DO 対照区 (PBS を注射したマダイ)

FeTY 寒天培地で測定した海洋一般細菌数は、低 DO 対照区を除く各区で実験感染4日後に減少した。その後、高 DO 区ではほぼ同数で菌数が推移し、低 DO 区は増加傾向を示した。TCBS 寒天培地による *Vibrio* 属細菌の菌数の変動は、実験感染4日後にすべての実験区において著しく減退した。その後7日後、10 日後と日を経るにしたがい増加した。なお、一般海洋細菌、*Vibrio* 属細菌の両者とも *E. tarda* での感染の有無による顕著な差は見られなかった。

PCRおよびcompetitive PCR competitive PCR による定量の結果(図 13)では、図 12 に示した SS 寒天培地による計数とはほぼ同様の推移であった。しかし、その値は SS 寒天培地による計数値と比較して 0.5 から 1 桁高かった。

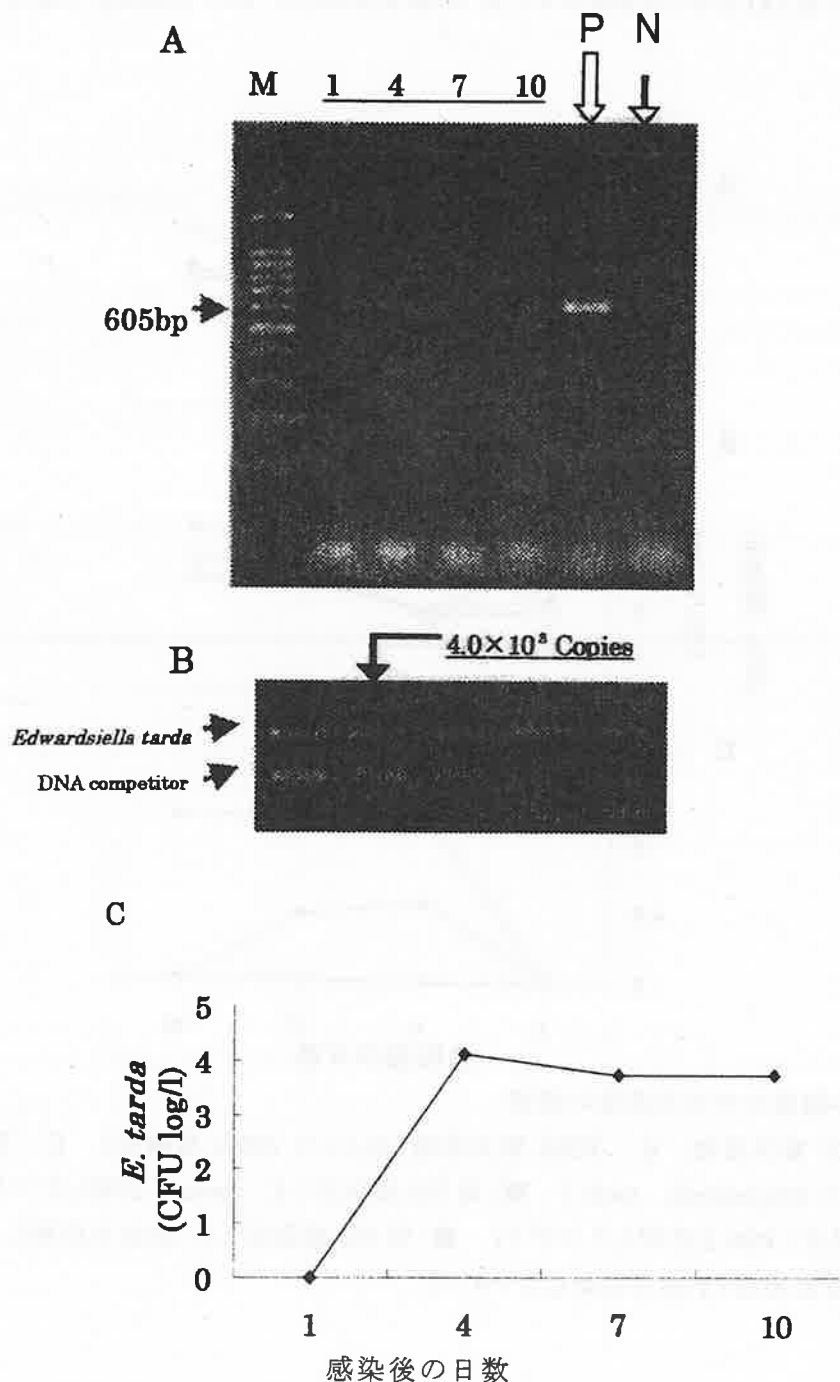


図13 PCR および competitive PCR を用いた低 DO 飼育水中の *E. tarda* 検出と定量分析の結果 A : 16S rRNA 遺伝子の PCR による検出 B : competitive PCR 分析の結果 C : competitive PCR の定量分析結果

考 察

ろ過法による菌の回収は各菌ともほぼ一定の回収率を示し、実用が可能であることを示唆した。しかし、*P. damsela* subsp. *piscicida* の回収率に濃度ごとの差異が認められた。これまでに *P. damsela* subsp. *piscicida* は環境中に増殖性を保ったまま存在しにくいという報告(金井,1996)があることから、一部の菌が増殖性を失ったため

ではないかと考えられた。今後、生存性の検討を行う必要がある。増殖培地の種類ごとの増殖性を調べた結果、NaCl を含まない普通寒天培地では *E. tarda* と *L. garvieae* に高い増殖性が認められ、*P. damsela* subsp. *piscicida* と *V. anguillarum* ではほとんど増殖しなかった。このことは、B. Austin *et al.* (1999), Baxa *et al.* (1985) および江草(1983)で述べられている各病原細菌の至的塩分濃度および増殖可能塩分濃度と一致しており、塩分濃度による菌種の選択性の可能性を示すものである。選択培地に関しては SS 寒天培地には *E. tarda* のみがコロニーを形成したが、その菌数は NaCl を含まない普通寒天培地での菌数と比べて、1桁近く下回った。また *Vibrio* 属細菌分離用培地である TCBS 寒天培地について、*V. anguillarum* の増殖が確認されなかった。この原因は選択培地がその菌の至適な増殖条件ではないためであると考えられる。これまでに *V. anguillarum* は TCBS 寒天培地での増殖が報告されており(若林,1996)、本実験の結果と矛盾した。しかし、本実験に供試した菌株はスライド凝集反応および PCR 判定の結果、*V. anguillarum* であることが明らかであった。菌自体の増殖力が減退していたために、TCBS 寒天培地での増殖が認められなかったと考えられる。これらのことから今後、魚体通過等で菌力を回復した後、改めて確認する必要があるものと考えられる。

colony immunoblotting は各病原細菌の検出が可能であることを明らかにした。発色の程度に差異が認められるが、これには使用する抗血清の抗体価が関与しているものと思われる。この方法は応用により目的細菌を定量することも可能であると考えられ、今後検討を進める必要がある。

PCR 法による検出は *P. damsela* subsp. *piscicida* を除く 3 種の菌で行い、各病原細菌の検出が可能であることを確認した。検出限界は *L. garvieae* が 10^0 CFU/ml レベルまでの検出が可能であったが、*E. tarda* では 10^3 CFU/ml、*V. anguillarum* では 10^5 CFU/ml となり、後者 2 種の細菌に関しては環境中の細菌検出感度が問題が残った。検出感度を左右する大きな要因は PCR 反応時のアニーリング温度が大きく関わっており、本研究では特異性を高めるためにアニーリング温度を高く設定しているためだと考えられる。検出感度を上げるための条件を今後検討する必要がある。迅速かつ正確な定量法であると考えられた competitive PCR 法を用いた細菌数の定量化については、PCR による DNA コピー数と菌数が各濃度ごとで高い相関性を示し、定量法としての実用性があるものと考えられる。しかし、その検出感度は 10^3 CFU から 10^6 CFU であり、さらに検出感度を上げるためには条件設定の改善が必要である。

以上のように、本研究ではろ過法を用いた集菌の実用性の高さ、各魚病細菌を選択発育させる培地、colony immunoblotting 法による高精度の検出・同定の可能性を明らかにした。PCR については各魚病細菌間の交差反応は認められず、検出限界は *E. tarda* で 1.2×10^3 CFU/ml、*L. garvieae* で 4.5×10^0 CFU/ml および *V. anguillarum* で 1.1×10^5 CFU/ml であった。菌数の定量法として実用性を示した competitive PCR 法を含めた一連の PCR 操作による迅速な細菌の検出・定量の可能性を示唆した。

マダイに対する *E. tarda* の結果、最終的な生残率は高 DO 区が 60 %、低 DO 区が 35 % であった。低 DO 区では、実験感染 3 日後に全体の 40 % が死亡し、6 日後まで死亡が続いた。その後、一度終息したのち 9 日後、さらに死魚が確認された。高 DO 区では実験感染 2 日後に最初の死亡を確認し 6 日後まで死亡が続いたのち終息した。これらの区での死亡魚はいずれも *E. tarda* による死亡であった。なお、低 DO 対照区の死魚はその状態から酸素欠乏および共食いによるものであると推察した。本実験での DO 濃度の差異による死亡尾数の変化は、ブリを用いて同様の実験を行った福田ら (1997a) の報告と一致する。細菌数の変動は SS 寒天培地を用いた *E. tarda* の菌数測定のみで生残率との相関性が認められた。攻撃 4 日後の各感染区からコロニーの出現が見られ、両者の菌数およびその変動には相違が認められた。実験感染 4 日後の測定で *E. tarda* を検出し、低 DO 区からは高 DO 区よりも 0.6 log CFU/l 近く高い菌数を確認した。この差異は累積死亡尾数の違いに由来するものと考えられ、6 日後以降死亡が止まった高 DO 区からは 10 日後の測定で *E. tarda* は検出されなかった。*E. tarda* による死魚が確認されなかった両対照区においても同様であった。Rashid *et al.* (1994) の報告によると *E. tarda* の海水における生存性は 3 から 7 日であり、また換水を行っていることから、SS 寒天培地で測定した *E. tarda* は死

魚から流出したものと考えられた。また、安永ら(1982)の報告ではマダイに対する *E. tarda* の実験的感染を行った場合、4~7日でその流行は収束するとされており、実験感染9日後での死亡魚を確認した本研究の結果と矛盾した。これは飼育水中から *E. tarda* を検出したことに加え、低 DO 状態が水平感染を助長すると述べた福田ら(1997b)の報告から、低 DO 区の実験感染9日後の死亡魚は水平感染によるものであると推察された。しかし、本研究の解析範囲ではそのことを明らかにすることができなかった。

FeTY 寒天培地の菌数測定では両低 DO 区で若干の増加、両高 DO 区で若干の減少が見られたものの、飼育魚の *E. tarda* 感染の影響は認められなかった。また、TCBS 寒天培地による菌数測定では、両高 DO 区で攻撃後、著しい減退が見られた。*Vibrio* 属細菌種の酸素濃度による分布の相違、飼育魚への物理的刺激等などがこのような結果を導いたのかは不明であり、また、そのような報告もない。TCBS 寒天培地で増殖が見られたコロニーについて性状検査を行う必要性が示唆された。

PCR 法を用いた *E. tarda* の検出の結果、SS 寒天培地でコロニーが出現した各飼育水について PCR 産物である 605bp のバンドが得られた。低 DO 区において実施した competitive PCR を用いての *E. tarda* の菌数測定では、SS 寒天培地で測定した菌数より 0.5~1 log 高い値で、ほぼ同様の推移を示した。先に示したとおり、SS 寒天培地は *E. tarda* の発育に至適なものではない。competitive PCR での結果は、SS 寒天培地では増殖できない菌、あるいは死菌についても検出したためであると思われる。ただし、得られた値に差異があるものの、プレート法による菌数測定と competitive PCR による DNA コピー数から求めた菌数の間で、高い相関性が認められた。このことから、本研究で示した定量法について実用性の高さが証明された。

要 約

まず、*Edwardsiella tarda* を原因細菌とするヒラメエドワジェラ症のワクチンを実用化するための研究を行った。本菌は多くの血清型を示すが、著者がこれまでに報告している「免疫原性のある分子量 37 kDa の外膜タンパクが複数の血清型の菌に共通に認められること」を基礎とし、一つの血清型の菌で作製したホルマリン死菌ワクチンが複数の血清型の菌の感染に対して有効性を示すかを検討した。*E. tarda* EF-1 株のホルマリン死菌ワクチンを作製し、2週間の経口投与法によりヒラメを免疫した。免疫終了2週間後に血清型が異なる4株の *E. tarda* で腹腔内注射による攻撃試験を行ったところ、いずれの株の攻撃試験においても免疫区で高い生存率を示した。このことから、1種類の血清型の *E. tarda* で作製したワクチンでヒラメを免疫すると、複数の血清型の菌による感染を防御するという血清型によらない効果が期待できることが明らかとなった。つぎに、経口投与による免疫は効果の持続性が短いといわれる問題点を解決する方法として、効果が低くなった時期にワクチンを追加投与することの有効性について調べた。EF-1 株で作製したホルマリン死菌ワクチンを上記と同様に2週間投与し、その8週間後に追加投与して攻撃試験を行ったところ、最初の2週間のみ投与した区では対照区と変わらない生存率まで低下していたが、追加投与した区では、これらより有意に高い生存率を示した。これらのことから、持続性が短いといわれる経口投与ワクチンであるが、追加投与することによりその効果を回復あるいはさらに高めることが明らかとなった。

次に、海産魚の細菌性疾病を予察するために基本となる魚病細菌の海水中における検出・定量方法を確立し、その応用について検討した。海水魚の代表的な魚病細菌として *E. tarda* , *Lactococcus garvieae* , *Vibrio anguillarum* および *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* を用いて海水懸濁液を調整し、メンブレンフィルターろ過による集菌率、および数種の寒天平板培地でのコロニーの出現率を求めた。さらに、これら魚病細菌について colony immunoblotting を行い検出を試みた。また、polymerase chain reaction (PCR) 法における各魚病細菌間での交差反応の有無および検出限界を明らかにしたのち、competitive PCR による細菌数の定量法確立の

可能性についても検討した。つぎに、定量法の応用については *E. tarda* を用いたマダイの実験的感染を行い、飼育水中の細菌数を測定して検討した。フィルターろ過による集菌率はいずれの魚病細菌についてもほぼ一定であった。各菌で最も多くのコロニーを形成した培地は *E. tarda* および *L. garvieae* では NaCl が 0% の普通寒天培地、*V. anguillarum* および *P. damsela* subsp. *piscicida* では NaCl が 3% の TPB 寒天培地であった。colony immunoblotting 法は精度の高い検出・同定が可能であった。PCR では各魚病細菌間の交差反応は認められず、検出限界は *E. tarda* で 1.2×10^3 CFU/ml, *L. garvieae* で 4.5×10^0 CFU/ml および *V. anguillarum* で 1.1×10^5 CFU/ml であった。*E. tarda* の実験的感染モデルで、プレート法による本菌の菌数測定および competitive PCR による本菌 DNA の定量を行った結果、検出感度は異なるものの両者に相関性が認められた。

文 献

- Aoki, T., Park, C.-I., Yamashita, H., and Hirono, I.: Species-specific polymerase chain reaction primer for *Lactococcus garvieae*. *J. Fish Dis.*, 23, 1-6 (2000).
- Austin, B. and Austin, D. A.: *Bacterial Fish Pathogens* (third edition), Springer Praxis Publishing, New York, 457p (1999).
- Baxa, D. V., Kawai, K., Ando, H. and Kusuda, R.: *Edwardsiella tarda* and *Staphylococcus aureus* isolated from cultured red sea bream. *Rep. Usa mar. biol. Inst.*, 7, 1-8 (1985).
- 江草周三: 細菌症・魚の感染症, 恒星杜厚生閣, 東京, 97-272 (1984).
- 福田 稔・舞田正志・佐藤公一・山本 浩・岡本信明・池田彌生: ブリの腸球菌症実験感染における *Enterococcus seriolicida* 水平感染に及ぼす溶存酸素の影響. 魚病研究, 32, 43-49 (1997a).
- 福田 稔・舞田正志・佐藤公一・岡本信明: 飼育水の溶存酸素量がブリの実験的腸球菌症における死亡率に及ぼす影響. 魚病研究, 32(2), 129-130 (1997b).
- Hirono, I., Masuda, T., and Aoki T.: Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum*. *Microbiol.*, 21, 173-182 (1996).
- 金井欣也・田脇誠一・内田洋祐: ヒラメ養殖場における *Edwardsiella tarda* の分布. 魚病研究, 23, 41-47 (1988).
- 金井欣也: 海産魚の細菌病, 魚病学概論(室賀清邦・江草周三編), 恒星杜厚生閣, 東京, 58-63 (1996).
- 川合研児: 魚類ワクチンの現状. 月間海洋, 号外, No. 14, 145-148 (1998).
- 川合研児・青山雅人: ヒラメのエドワジエラ症に対するワクチンの効果. 高知大学海洋生物教育研究センター研究報告, No. 20, 35-43 (2000).
- 川合研児: 魚類病原細菌. 月間海洋, 号外, No. 23, 227-230 (2000).
- Kusuda, R. and Salati, F.: Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 4, 69-85 (1993).
- Miyazaki, T. and Kaige, N.: Comparative histopathology of edwardsiellosis in fishes. *Fish Pathol.*, 20, 219-227 (1985).
- 中津川俊雄: ヒラメ幼魚から分離された *Edwardsiella tarda*. 魚病研究, 30, 251-256 (1983).
- Rashid, M. M., Honda, K., Nakai, T., and Muroga, K.: An ecological study on *Edwardsiella tarda* in flounder farms. *Fish Pathol.*, 29, 221-227 (1994).
- Sanger, F. S. Nicken and Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467 (1977).
- 杉浦秀博: ヒラメのエドワジエラ症に対する *Edwardsiella tarda* 37 kDa 外膜タンパク質の免疫効果. 高知大学農学

魚病ワクチンの実用化に関する研究

- 部栽培漁業学科卒業論文, 21pp (2001).
- 谷口道子: 養殖ハマチの主要魚病の発症要因と予防に関する研究. 高知県水産試験場研究報告第 5 号別冊, 150p, (1984).
- Tu, X. and Kawai, K.: Isolation and characterization of major outer membrane proteins of *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol.*, 33, 481-487 (1998).
- Tu, X. and Kawai, K.: Antigenic profile and protective role of a 37 kDa major outer membrane protein of *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol.*, 34, 59-64 (1999).
- 若林久嗣: サケ科魚類および淡水魚の細菌病. 魚病学概論(室賀清邦・江草周三編), 恒星杜厚生閣, 東京, 51-58 (1996).
- Weisburg, W., G., Bams, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J.: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173, 697-703 (1991).
- 安永統男・小川七郎・畑井喜司雄: 数種の海産養殖魚から分離された病原性 *Edwardsiella* の性状について. 長崎県水産試験場研究報告, 8, 57-65 (1982).