

20. 魚病対策委託研究
(ワクチン実用化試験)

魚病対策委託研究 (ワクチン実用化試験)

増殖科 菊池達人

本試験は水産庁委託事業魚病対策技術開発研究（ブリの類結節症不活化ワクチン実用化に関する研究）として、昭和59年から平成元年まで実施したものである。研究報告の詳細は、各年度の魚病対策技術開発研究成果報告書に報告した。

研究は6ヶ年にわたったが、類結節症不活化ワクチンの実用化には至らなかった。その原因は
1) *Pasteurell piscicida* の感染門戸等の感染・発病機構が不明な点が多い、2) 魚類の免疫機構に不明な点が多い、3) 有効なワクチン抗原の未検出、4) *P. piscicida* が細胞内増殖細菌であること等が考えられた。

本年度は事業最終年度にあたるので、ここでは、昭和59年度から平成元年度までの報告を取りまとめて、要約を述べる。

研究の要約

目的

ブリの類結節症は養殖業に大きな被害を与えており、さらに近年、耐性菌の出現により、薬剤による治療対策が難しくなり、有効なワクチンの開発が望まれている。そこで本研究では、各種試作ワクチンの開発およびその有効性を検討するとともに、ブリ類結節症の発生実態の把握、感染・発病条件の解明およびまだ不明な点の多い魚類免疫機構の解明を目的とする。

- I 課題名 : 1. 類結節症発生状況 (62. 63. 元)
2. 実験感染させたワクチン処理魚の脾臓および血液中の *P. piscicida* の生菌数について (元)
3. 感染耐過魚の抗病性の検討 (62. 63)
4. 飼育条件
- 1) 飼育密度と類結節症の発生 (60. 61)
- 2) 類結節症原因菌に対する魚体重差による感受性の差異 (60)
- 3) ワクチン処理の方法および飼育条件が血液中の免疫成分に与える影響 (60)
5. 試作ワクチンの有効性
- 1) 実験感染による有効性の検討 (59. 60. 61. 62. 63. 元)

2) 自然感染による有効性の検討 (59. 60. 61. 62. 63. 元)

なお, () 内は実施年度を示す。

Ⅱ 委託費交付先 : 高知県

Ⅲ 研究担当者 : 主任研究者

山口光明 (現高知県土佐清水漁業指導所長)

長谷川好男 (高知県水産試験場増殖科長)

研究担当者

安藤裕章 (現高知県水産局漁業振興課技監)

菊池達人 (高知県水産試験場増殖科主任研究員)

研究協力者

楠田理一 (高知大学教授)

Ⅳ 研究場所 : 高知県水産試験場

Ⅴ 委託期間 : 昭和 59 年 - 平成元年

Ⅵ 研究目的

1. 高知県における発生状況 (62. 63. 元)

ブリ類結節症の発生実態を把握し, ワクチン実用化の基礎資料とする。

2. 実験感染させたワクチン処理魚の脾臓および血液中の *P. piscicida* の生菌数について (元)

実験感染させたワクチン処理魚と無処理魚の攻撃菌の除菌作用について検討する。

3. 感染耐過魚の抗病性の検討 (62. 63)

同一養殖場で類結節症が何回も流行することから実験的に感染耐過させたブリ稚魚の抗病性を検討する。

4. 飼育条件

1) 飼育密度と類結節症の発生 (60. 61)

ブリ稚魚の飼育において, 飼育密度の高いほど類結節症で斃死することが多いといわれており, このことを海面での自然感染状況から確認する。

2) 類結節症原因菌に対する魚体重差による感受性の差異 (60)

魚の大小が類結節症原因菌に対する感受性に関係があるのではないかと推察されるので, 実験感染で, 魚体重差による感受性の差異を検討する。

3) ワクチン処理方法および飼育条件が血液中の免疫成分に与える影響 (60)

ワクチン処理方法や飼育密度が血液中の凝集抗体価, 補体活性および食細胞活性に与える影響を検討する。

5. 試作ワクチンの有効性 (59. 60. 61. 62. 63. 元)

動生協（*P. piscicida* KB 7703, NGT 8202）およびアース製薬（*P. piscicida* OT 8447）で試作されたホルマリン不活化ワクチンの有効性を、実験感染および自然感染試験により検討する。

Ⅶ 研究方法

1. 高知県における発生状況（62. 63. 元）

高知県水産試験場および宿毛漁業指導所の魚病診断結果ならびに業者からの魚病情報を基にして取りまとめた。

2. 実験感染させたワクチン処理魚の脾臓および血液中の *P. piscicida* の生菌数について（元）

ワクチン処理魚と無処理魚を実験感染させた後、経時的に脾臓および血液中の生菌数を培養法で算定した。

3. 感染耐過魚の抗病性の検討（62. 63）

62年：供試魚は平均体重 1 g のブリ稚魚を用いた。感染耐過試験は供試魚を強毒株 10^2 CFU/ml および弱毒株 10^6 CFU/ml で浸漬攻撃をした。生残ったブリ稚魚を耐過 21 日目に再度浸漬攻撃をして斃死状況の差によって抗病性を検討した。また、再攻撃日にブリ稚魚をサンプリングし、血清中の *P. piscicida* LPS 特異抗体量、補体価および食食指数を高知大学で測定した。

63年：実験 1 は平均体重 12 g のブリ稚魚を強毒株 10^2 CFU/ml で感染耐過させた後、耐過 8 日目および 20 日目に再攻撃して斃死状況の差によって抗病性を検討した。実験 2 は平均体重 41 g のブリ稚魚を強毒株 10^2 CFU/ml、弱毒株 10^3 CFU/ml および無毒株 10^5 CFU/ml で感染耐過させた後、耐過 15 日目に再度浸漬攻撃して斃死状況の差によって抗病性を検討した。

4. 飼育条件

1) 飼育密度と類結節症の発生（60. 61）

平均体重 4.7 - 7 g のブリ稚魚を用いて、高密度区に 617 尾、中密度区に 320 尾、低密度区に 153 尾をそれぞれ約 3 m³ の海面小割に収容し、自然感染により類結節症の斃死状況を観察した。

2) 類結節症原因菌に対する魚体重差による感受性の差異（60）

供試魚を大型魚（BW=104 g）、中型魚（BW=61 g）、小型魚（BW=8 g）にわけて浸漬攻撃を行い、斃死状況を観察した。

3) ワクチン処理方法および飼育条件が血液中の免疫成分に与える影響（61）

海面で飼育中のワクチン 1 回処理区、同 2 回処理区、高密度区、中密度区、および低密度区のブリ稚魚をサンプリングし、血中の凝集抗体価、第二経路の補体活性、食細胞活性を高知大学で測定した。

5. 試作ワクチンの有効性（59. 60. 61. 62. 63. 元）

1) 実験感染によるワクチンの有効性

59年：平均体重 4.2 g のブリ稚魚を動生協が KB 7703 株で製造したホルマリン不活化ワクチン

を用いて 10^7 個/ml, 10^8 個/ml および 10^9 個/ml で 5 分間浸漬処理後, 2 週間目, 4 週間目に KB 7703 株で, 8 週間目に新鮮分離株で浸漬攻撃をして斃死状況を観察した。

60年: 平均体重 6 g のブリ稚魚を動生協およびアース製薬が, それぞれ NGT 8202 株 および OT-8447 株 で製造した 2 種のホルマリン不活化ワクチンを用いて, 10^8 個/ml で 10 分間浸漬処理後, 21 日目に各々のワクチン種株で浸漬攻撃をして斃死状況を観察した。

61年: 1 回目は平均体重 4.5 g の天然ブリ稚魚を動生協が OT 8447 株で製造したホルマリン不活化ワクチンを用いて 10^8 個/ml で 5 分間浸漬処理後, 6 日目と 29 日目に徳島水試から分与された HT 8437 株で浸漬攻撃をして斃死状況を観察した。2 回目は平均体重 4.8 g の種苗生産したブリ稚魚を 1 回目と同じワクチン処理をして, 処理後 3 日目と 21 日目に 1 回目と同様に浸漬攻撃をして斃死状況を観察した。

62年: 平均体重 41 g のブリ稚魚をアース製薬が OT 8447 株で製造したホルマリン不活化ワクチン (以下アース OT ワクチンと呼ぶ) を用いて 10^8 個/ml で 5 分間浸漬, 同濃度のワクチン液を 0.1 ml/魚の割合で腹腔内注射および *Vibrio anguillarum* 加熱死菌ワクチンと混合して 5 分間浸漬後, 3 日目と 11 日目に OT 8447 株で浸漬攻撃をして斃死状況を観察するとともに, 3 日目および 15 日目に供試魚の血清中の *P. piscicida* LPS 特異抗体量, 補体価および血液中の食食指数を高知大学で測定した。

63年: 平均体重 12 g のブリ稚魚をアース OT ワクチンを用いて 10^7 個/ml で 5 分間浸漬処理および 10^8 個/ml のワクチン液を 0.1 ml/尾の割合で腹腔内注射後, 8 日目と 20 日目に OT 8447 株で浸漬攻撃をして斃死状況を観察した。

元年: 平均体重 15 g のブリ稚魚にアース OT ワクチンを用いて 10^7 個/ml で 5 分間浸漬 1 回処理および同 2 回処理を行った。ワクチン浸漬液は海水, 1/2 海水および淡水を用いた。1 回処理後 6 日目, 2 回処理後 8 日目に OT 8447 株で浸漬攻撃をして斃死状況を観察した。

2) 自然感染によるワクチンの有効性

59年: 平均体重 2.4 g のブリ稚魚に実験感染と同じワクチン処理を行って, 自然感染による斃死状況を観察した。

60年: 平均体重 7 g のブリ稚魚に実験感染と同じワクチン処理を 1-2 回行って, 自然感染による斃死状況を観察した。

61年: 平均体重 4.7 g のブリ稚魚にアース製薬製ワクチンを浸漬 1 回処理, 同 4 回処理および動生協製ワクチンを浸漬 1 回処理を行って, 自然感染による斃死状況を観察した。

62年: 平均体重 6 g のブリ稚魚に実験感染と同じワクチン処理を行って, 自然感染による斃死状況を観察した。

63年: 平均体重 8 g のブリ稚魚に投薬および実験感染と同様のワクチンで浸漬 1 回処理, 同 2

回処理, 注射 1 回処理, 注射・浸漬各 1 回処理を行って, 自然感染による斃死状況を観察した。

元年: 平均体重 3 g のブリ稚魚に実験感染と同様のワクチン処理を 1-4 回行って, 自然感染による斃死を観察した。

Ⅶ 研究結果

1. 高知県における発生状況 (62. 63. 元)

類結節症は早い年は 5 月下旬, 遅い年は 6 月上旬から発生し, 10 月中旬に終息する。毎年, 宿毛湾の柏島, 一切および藻津が他地区より早く発生する傾向を示した。また, *P. piscicida* に対するアンピシリンとオキシリン酸の感受性動向は年により大きな変動がみられた。

2. 実験感染させたワクチン処理魚の脾臓および血液中の *P. piscicida* の生菌数について (元)

$10^{3.5}$ CFU/ml 濃度で攻撃したときは脾臓および血液中の *P. piscicida* はワクチン区・対照区ともに検出限界以下であった。 10^6 CFU/ml の菌液を 0.1 ml / 尾の割合で腹腔内注射したときは最初の実験では攻撃 36 時間後から, 対照区は脾臓および血液中の生菌数は上昇したが, ワクチン区は上昇しなかった。2 回目の実験では両区とも生菌数はほぼ同じような上昇傾向を示した。

3. 感染耐過魚の抗病性の検討 (62. 63)

62 年: 感染耐過試験で類結節症による斃死は弱毒区の 1 尾だけであった。再攻撃試験の生残率は攻撃濃度によりばらつきがみられたが, 感染耐過区と対照区には大きな差はなかった。血液中免疫成分は 3 項目とも, 対照区より感染耐過区が高い値を示し, 強毒区と弱毒区には大きな差はみられなかった。

63 年: 実験 1 では再攻撃試験における感染耐過区と対照区の生残率には大差がなかった。実験 2 では再攻撃試験における生残率および LD_{50} は弱毒株感染耐過区が対照区や他試験区より高く, 有効率は 10^5 CFU/ml 攻撃で弱毒株感染耐過区が 42%, 他試験区では認められなかった。

4. 飼育条件

1) 飼育密度と類結節症の発生 (60. 61)

類結節症発生時に放置すると, 累積斃死率は最終的に各区 50% 前後で飼育密度による差は認められなかった。しかし, 斃死パターンは年により差がみられた。60 年は高密度区では急激に斃死のピークに達し, 中・低密度区ではピークに達するまでの時間が長く, ピークは持続しなかった。61 年は短期間に大量斃死する急性型で, どの密度区にも斃死パターンの差異はみられなかった。

2) 類結節症原因菌に対する魚体重差による感受性の差異 (60)

LD_{50} は大型魚が $3.4 \times 10^{3.6}$, 中型魚が $3.4 \times 10^{3.1}$, 小型魚が $3.4 \times 10^{2.9}$ で, 大型魚は中・小型魚に比べ LD_{50} がやや高く, 中型魚と小型魚の間にはほとんど差が認められなかった。

3) ワクチン処理方法および飼育条件が血液中の免疫成分に与える影響 (61)

ワクチン多回処理によって凝集抗体価と食細胞活性が上昇するが補体活性は低下した。飼育密

度は凝集抗体価と食細胞活性に影響しないが、高密度飼育では補体活性は低下し、低密度飼育では補体活性が上昇した。

5. 試作ワクチンの有効性 (59. 60. 61. 62. 63. 元)

(1) 実験感染によるワクチンの有効性

有効率の分布状況およびワクチン区と対照区のLD₅₀比の分布はそれぞれ表1, 2に示した。

表1 昭和59年～平成元年に実施したワクチン有効性試験の有効率の分布

区分	対照区のへい死率(%)	ワクチン区の有効率(%)											計
		マイナス	0～	10～	20～	30～	40～	50～	60～	70～	80～	90～	
実験 感染 試験	～30未満	20	12						2	1	1	3	39
	30以上～40〃	3			2		1		1				7
	40〃～50〃						2						2
	50〃～60〃	1											1
	60〃～70〃		1		1	1	1						4
	70〃～	4	9	4	4	1							22
計		28	22	4	7	2	4		3	1	1	3	75
自然 感染 試験	～30未満	1											1
	30以上～40〃												0
	40〃～50〃	3	1	1									5
	50〃～60〃		1	1	2		1		1				6
	60〃～70〃												0
	70〃～	2	1	3	3								9
計		6	3	5	5		1		1				21
合計		34	25	9	12	2	5		4	1	1	3	96

有効率 = (1 - ワクチン区のへい死率 / 対照区のへい死率) × 100 (%)

表2 昭和59年～平成元年に実施した実験感染によるワクチン有効性試験のワクチン区と対照区のLD₅₀比の分布

LD ₅₀ 比*	59	60	61	62	63	元	計
0未満	3				1	3	7
0以上0.1未満			1			1	2
0.1〃0.2〃							
0.2〃0.3〃			2			1	3
0.3〃0.4〃	1	1			1	1	4
0.4〃0.5〃							
0.5〃0.6〃	1	1					2
0.6〃0.7〃							
0.7〃0.8〃							
0.8〃0.9〃			1				1
1.0〃							
計	5	2	4		2	6	19

* Log number

59年：ワクチン処理時に、 10^9 個/mlの濃度では浸漬開始2分頃から狂奔状態を示し、一部は横転した。2週間目の攻撃で対照区はワクチン区よりも生残率およびLD₅₀が高かったが、ワクチン区間ではワクチン濃度が高いほど生残率は高くなった。4週間目、8週間目の攻撃でワクチン区と対照区の斃死状況およびLD₅₀はほとんど差異がなく、対照区の斃死率が50%以上の有効率は各ワクチン区で4%前後であった。

60年：動生協ワクチン区と対照区のLD₅₀はそれぞれ $3.9 \times 10^{3.95}$ 、 $3.9 \times 10^{3.65}$ CFU/mlで、アースワクチン区と対照区はそれぞれ $3.3 \times 10^{3.0}$ 、 $3.3 \times 10^{2.45}$ CFU/mlであった。対照区の斃死率が50%以上の有効率は動生協ワクチン区が19%、アースワクチン区が30%であった。

61年：1回目の攻撃試験のLD₅₀は処理後6日目攻撃区が $5.5 \times 10^{3.6}$ CFU/ml，同29日目攻撃区が $5.5 \times 10^{2.98}$ CFU/ml，対照区が $5.5 \times 10^{2.75}$ CFU/mlで6日目攻撃区が抗病性を示した。また、対照区の斃死率が50%以上の有効率は6日目攻撃区が49%、29日目攻撃区が13%であった。2回目の攻撃試験のLD₅₀は処理後3日目攻撃区が $3.8 \times 10^{3.55}$ CFU/ml，同21日目攻撃区が $3.8 \times 10^{3.4}$ CDF/ml，対照区が $5.5 \times 10^{3.35}$ CFU/mlでほとんど差がなかった。同有効率は3日目攻撃区が13%，21日目攻撃区が24%であった。

62年：処理後3日目攻撃では各区の生残率は80%以上で大差なく、11日目攻撃では斃死魚が1尾だけでワクチンの有効性は検討できなかった。処理後3日目の測定では特異抗体量と食食指数はワクチン区が対照区より大きい値を示したが、補体価はワクチン区が対照区より小さい値を示した。15日目の測定では特異抗体量と補体価はワクチン区が3日目より上昇したが、対照区が横ばいで、食食指数は注射区が3日目より低下したが、他区が上昇した。

63年：処理後8日目攻撃のLD₅₀は浸漬区が $10^{4.33}$ CFU/ml，注射区が $10^{3.84}$ CFU/ml，対照区が $10^{4.01}$ CFU/mlであった。また、対照区の斃死率が48%である有効率は浸漬・注射区ともに42%であったが、斃死率が88%になると有効率は認められなかった。同20日目の 10^4 CFU/mlの攻撃では、生残率は浸漬区が80%、注射区が75%であった。

元年：1回処理後6日目攻撃のLD₅₀は海水区が $10^{3.58}$ CFU/ml，1/2海水区が $10^{3.17}$ CFU/ml，淡水区が $10^{3.46}$ CFU/mlであった。また、対照区の斃死率が32%と92%の有効率は海水区が46%と13%，1/2海水区が認められず、淡水区が25%と17%であった。2回処理後8日目攻撃のLD₅₀は海水区が $10^{3.70}$ CFU/ml，1/2海水区が $10^{3.33}$ CFU/ml，淡水区が $10^{3.49}$ CFU/mlであった。LD₅₀は1回・2回処理も海水区が高い傾向を示した。また、対照区の斃死率が88%の有効率は海水区が33%であったが、1/2海水・淡水区には認められなかった。

(2) 自然感染によるワクチンの有効性

有効率の分布状況および自然感染による有効性試験結果取りまとめは表2，3に示した。

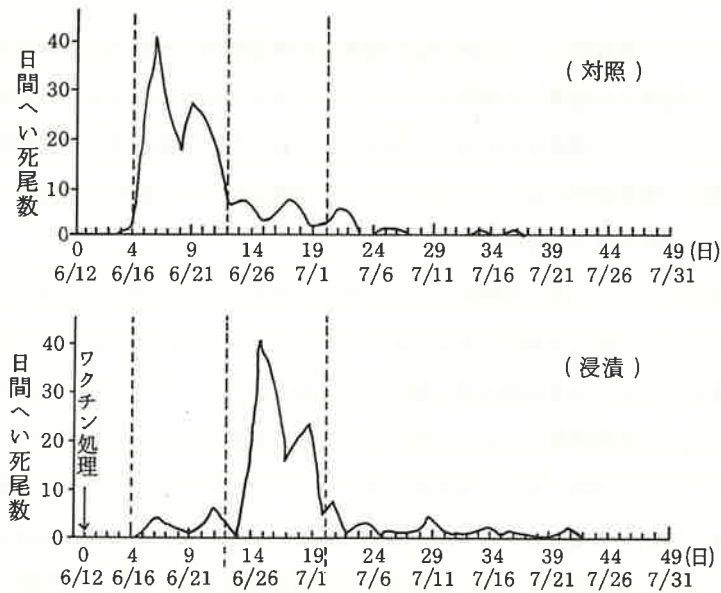


図1 斃死パターンの相違例（昭和62年の例）

59年：試験期間中（7/10-8/6）の生残率はワクチン区が82.5%，対照区が84.8%で，両区の間には成長，摂餌状況および斃死パターンに差異はなく，有効率は認められなかった。

60年：試験期間中（6/7-7/20）の生残率は各区とも50%前後で差がみられなかったが，ワクチン区と対照区では斃死パターンには差異がみられた。有効率は動生協ワクチン1回区が16%であったが，同2回区およびアースワクチン1，2回区では認められなかった。

61年：試験期間中（7/1-7/31）の生残率は各区とも50%前後で，ワクチン区と対照区では斃死パターンに差異はなく，有効率は認められなかった。

62年：試験期間中（6/12-7/31）の生残率は浸漬1回区が39.4-40.0%，注射1回区が43.9-45.2%，混合浸漬1回区が43.0%および対照区が29.1%で，ワクチン区と対照区では斃死パターンに差異がみられた。有効率は注射区が22%，浸漬区が15%，混合浸漬区が20%であった。

63年：試験期間中（6/13-7/14）の生残率は浸漬1回区が29.2%，2回区が11.6%，注射1回区が24.8%，注射・浸漬各1回区が10.9%，投薬区が65.3%および対照区が21.0%で，ワクチン区と対照区では斃死パターンに差異はなく，各ワクチン区の有効率は10%以下であった。

元年：試験期間中（5/31-7/20）の生残率は海水1回区が82.9%，同多回区が74.2%，1/2海水1回区が60.4%，同多回区が58.8%，淡水1回区が60.5%，同多回区が52.0%，投薬区が94.3%および対照区が50.0%で，ワクチン区と対照区では斃死パターンには差異がみられた。有効率は海水1回区が66%，同2回区が48%であったが，他区はほぼ20%以下であった。

K 考 察

1. 高知県における発生状況（62. 63. 元）

毎年、類結節症は同じような発生状況を示すが、各養殖漁場の地理的位置と発生確認日には規則性は認められなかった。また、今後、耐性菌は毎年出現が予想されるので、類結節症の治療を投薬に頼っている以上は、徹底した漁場管理が必要と思われる。

2. 実験感染させたワクチン処理魚の脾臓および血液中の *P. piscicida* の生菌数について（元）

脾臓および血液中の生菌数が対照区で上昇したが、ワクチン区で上昇しないことからワクチン処理することにより何らかの感染防御能が増したものと考えられた。

3. 感染耐過魚の抗病性の検討（62. 63）

62年：感染耐過試験で生き残ったブリ稚魚が真に感染耐過魚であるかどうか判断することは難しく、再攻撃試験の結果から抗病性は検討できなかった。感染耐過魚の血中免疫成分が上昇することから、ブリ稚魚は生菌に対して免疫応答があると考えられる。

63年：再攻撃時の生残率およびLD₅₀の差から強毒株・無毒株による感染耐過では抗病性は向上しないが、弱毒株による感染耐過では抗病性が向上するものと考えられた。

4. 飼育条件

1) 飼育密度と類結節症の発生（60. 61）

急性型の類結節症のときはこの程度の飼育密度では斃死状況に影響を与えないものと思われた。

2) 類結節症原因菌に対する魚体重差による感受性の差異（60）

LD₅₀の結果から体重100g程度の魚より、8-60gの魚の方が類結節症原因菌に対する感受性がやや高いと考えられた。

3) ワクチン処理方法および飼育条件が血液中の免疫成分に与える影響（61）

ハンドリングや高密度飼育などのストレスにより補体活性は低下する。このことが類結節症に感染しやすくなったり、斃死率が高くなる一因と考えられる。ワクチン多回処理で抗体価が上昇するにもかかわらず抗病性が認められないことも補体価の低下に原因があると考えられる。

5. 試作ワクチンの有効性（59. 60. 61. 62. 63. 元）

ワクチン濃度、ワクチン種株、投与方法、ワクチン処理から攻撃までの日数、ワクチンの投与回数およびワクチンの希釈液等の差異によって、ホルマリン不活化ワクチンの有効性を検討したが、海産魚ワクチン開発研究検討会でワクチンの有効性の目安として示された対照区の斃死率が60%以上で有効率が60%以上となる試験結果は得ることができなかった。（表1） また、LD₅₀は実験感染試験の19のワクチン区のうち12区が対照区より上回った。（表2）

攻撃変量法（Habel試験）において¹⁾、ワクチン効果を判定するのに、ワクチン区と対照区のLD₅₀比が1,000倍以上が合格とされているが、実験感染試験のLD₅₀比はすべて10倍以下であった。

これらの原因としてはホルマリン不活化ワクチンでは生体内に侵入した *P. piscicida* を完全に除去できるほどの感染防御能が得られないのではないか、また、攻撃試験に採用した 10^4 と 10^5 C FU/ml では感染の度合いが強すぎるのではないかと考えられた。

今後は、生体内に侵入した *P. piscicida* の除菌過程の免疫学的検討、ワクチン取り込みについての検討等が必要と思われる。また、自然感染試験において、図 1 に示すように斃死パターンは対照区とワクチン区では差異があり、対照区の斃死のピークが終了するまでは有効性を示すワクチン区がみられるのでワクチン単独投与だけでなく薬剤との併用効果も考える必要があろう。

文 献

医科学研究所学会編：改訂 5 版細菌学実習提要，丸善，1976，PP 310-311