

マダイのエドワジェラ症に有効なワクチン開発

増養殖環境課 黒原 健朗

本県の重要な海面養殖魚種であるマダイは、腸内細菌科に属するグラム陰性細菌 *Edwardsiella tarda* の感染によって引き起こされる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いる。本疾病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が、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状況が長く続いている。また本疾病に感染すると、生残しても外観が醜悪となり商品価値が大きく損なわれることも問題である。

エドワジェラ症に有効なワクチン開発に関する研究はヒラメやマダイでこれまでに報告されてはいるが、現状では実用化には至っていない。そこで、本県では大学、ワクチンメーカーと連携し、マダイのエドワジェラ症に有効なワクチンを開発することを目的とした研究を実施している。なお、平成 14～17 年の 4 年間でワクチン候補株や攻撃菌株に関するスクリーニングを実施しており、複数の有効株を選定する段階まで検討した。平成 18 年度以降の次のステップでは、これら有効株を用いた詳細な検討を目的とし、初年度に当たる平成 18 年度はワクチンの投与方法や調製法ならびにワクチンの有効性判定のための感染方法について検討した。

平成 19 年度はワクチン株の最終選定、追加免疫効果の確認を行うとともに、ワクチン有効性判定法の確立に向けた浸漬感染法の条件を検討した。

1 ワクチン株の最終選定

これまで実施した研究で、ワクチン株としてマダイ由来 041221 株とヒラメ由来の M-1 株で有効性が高いことが明らかとなっている。本試験では、両株におけるワクチン効果の再現性を確認するとともに、今後の検討に向けて菌株の最終選定を行った。

(1) 材料及び方法

試験には、水産試験場内の屋内水槽で紫外線殺菌、砂ろ過及び精密ろ過した海水を用いて約 2 ヶ月間予備飼育したエドワジェラ症の発生歴のない平均体重 13.5 g のマダイ稚魚を用いた。供試ワクチンは 041221 株及び M-1 株から調製し、ホルマリンによる不活化の後、通常の PBS 添加や遠心・洗浄過程を経ずに培養液を含む形でそれをそのまま供試ワクチンとして用いた。なお、供試ワクチンの抗原量は 041221 株で 1.3×10^9 CFU/ml、M-1 株で 1.6×10^9 CFU/ml であった。免疫は 24 時間絶食させた予備飼育魚に対して実施し、1ml ツベルクリンシリンジ (25G) を用いて腹腔内注射法 (0.1ml/尾) によりワクチンをそれぞれ 70 尾に投与した。また対照区の魚にはそれと同量の滅菌 PBS を腹腔内接種した。免疫後は 500l 角形ダイライト水槽 3 基 (水量 425l) に供試魚を収容し、免疫翌日を除いて 1 日 1 回、午前 8:00 を目安として市販のドライペレット (DP) を飽食量投与しながらエアレーション下で通常の流水飼育を行った。なお、飼育期間中は加温冷却装置の使用により、水温を 25 ± 1 °C で維持した。

免疫から 21 日後に攻撃試験を開始した。攻撃試験にはマダイ由来 *E. tarda* 強毒株 MR-04 株を用い、スキムミルクを加えてセラムチューブに 1ml ずつ分注して -80°C で凍結保存しておいたストックを解凍して、それをそのまま培養に供した。そして、解凍菌の 100 倍量のハートインヒ

ュージョン (HI) 液体培地にそれを添加して 25°C・24 時間前培養した後に、その全量を別の HI 液体培地に前培養と同倍率で添加して 25°C・18 時間本培養したものを菌原液とした。次にその菌原液を滅菌 PBS で 10 倍段階希釈して 6.5×10^7 (D1)、 6.5×10^6 (D2) 及び 6.5×10^5 (D3) CFU/ml の 3 段階の菌液を調製するとともに、免疫魚 70 尾のうちの 60 尾を 20 尾ずつ 3 グループに分けて、1 尾あたり 0.1ml の割合で 1ml ツベルクリンシリンジを用いてそれぞれの菌液をマダイ腹腔内に接種した。菌液を接種した後は計 9 基の 200l ポリエチレン水槽 (水量 180l) に魚を収容し、免疫期間中と同様に 1 日 1 回の給餌を行った。

攻撃試験期間中にみられた死魚は直ちにに取り上げた。また、生残魚については腎臓及び脾臓については約 5mm 四方に切り出し、それをスライドガラス 2 枚で圧ぺいしてエドワジェラ症の特徴的な症状の一つである結節様白点を目視により確認するとともに、頭部膿瘍症状の出現の有無も目視により判定した。そして SS 寒天培地を用いて腎臓から菌分離し、25°C・48 時間培養してエドワジェラ症原因菌のコロニーの有無を確認した。さらに、各区の累積死亡率を基に、ワクチン有効率: RPS (%) を $\{1 - (\text{ワクチン区の累積死亡率} / \text{対照区の累積死亡率})\} \times 100$ の式から算出した。

(2) 結果及び考察

攻撃試験期間中の生残率の推移を図 1 に示した。死亡は攻撃開始 1 日後からみられ始め、最も菌濃度の高い D1 では 3 日後までに急激な生残率の低下が認められた。また、D2 では攻撃 3 日後までに対照区で顕著な生残率の低下がみられたのに対し、D2 のワクチン区及び D3 のいずれの試験区でも試験期間中緩やかに生残率が低下した。試験終了時における生残率ならびに生残魚でみられた発症状況を表 1 に示した。最も菌濃度の高かった D1 では 041221 株でのみ生残魚が認められ、終了時には 15.0%を示した。D2 では、041221 株で 85.0%、M-1 株で 80.0%の値を示し、両ワクチン区とも対照区よりも有意に高い生残率を示した (F 検定、 $P < 0.05$)。D3 では 041221 株で 90.0%、M-1 株で 80.0%を示したが、対照区でも 70.0%の高い生残率が認め

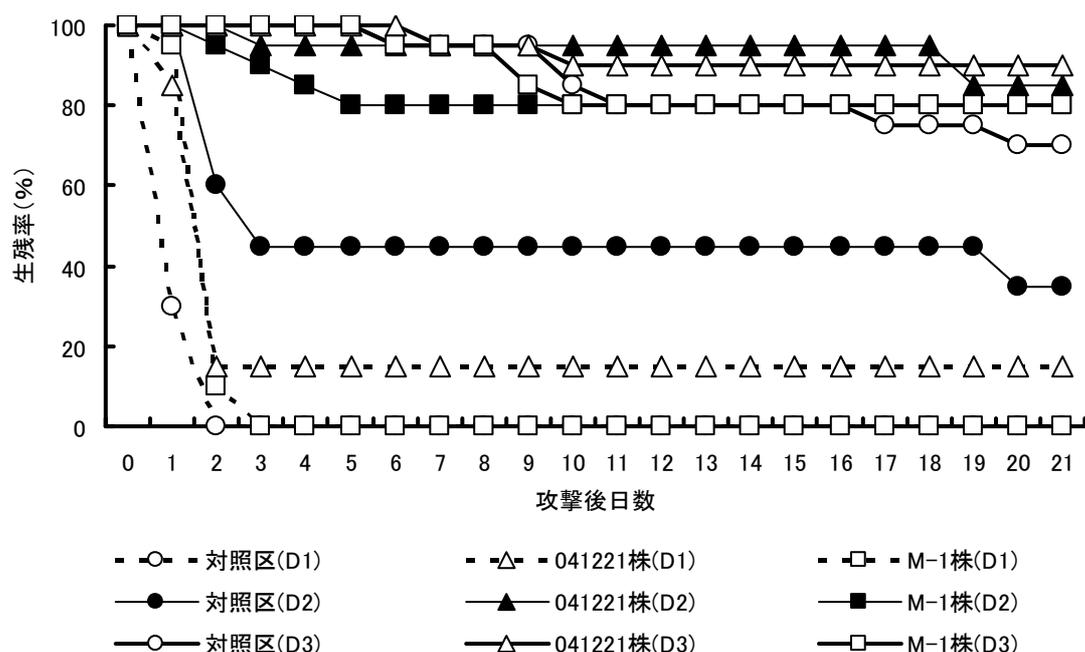


図 1 攻撃試験期間中にみられた生残率の推移

マダイのエドワジェラ症に有効なワクチン開発

られ、D3 では 041221 株でのみ対照区と比較して有意に高い生残率が認められた (F 検定、 $P < 0.05$)。生残魚では腎臓や脾臓における結節様白点は認められなかった。腎臓からの菌分離率もこれまでの試験と比較すると割合としては低かったが、ワクチン区でも 1～2 尾認められた。また、頭部膿瘍症状はワクチン区でも 1～3 尾確認され、今後の課題として残された。

表 1 攻撃試験終了時における生残率及び生残魚でみられた発症状況

菌濃度	試験区	尾数		生残率 (%)	生残魚			
		開始時	終了時		結節様白点 (腎臓)	結節様白点 (脾臓)	頭部膿瘍	菌分離
D1: 6.5×10^7 CFU/ml	対照区	20	0	0	-	-	-	-
	041221株	20	3	15.0	0/3	0/3	1/3	0/3
	M-1株	20	0	0	-	-	-	-
D2: 6.5×10^6 CFU/ml	対照区	20	7	35.0	0/7	0/7	1/7	1/7
	041221株	20	17	85.0 *	0/17	0/17	1/17	0/17
	M-1株	20	16	80.0 *	0/16	0/16	3/16	2/16
D3: 6.5×10^5 CFU/ml	対照区	20	14	70.0	0/14	0/14	3/14	0/14
	041221株	20	18	90.0 *	0/18	0/18	1/18	1/18
	M-1株	20	16	80.0	0/16	0/16	0/16	0/16

* $P < 0.05$

次に対照区の累積死亡率を基に算出したワクチン有効率を図 2 に示した。M-1 株では 69.2 及び 33.3% を示した一方で、041221 株では D2 で 76.9%、D3 で 66.7% の値がそれぞれ認められた。このことから、筆者がこれまでの試験からワクチンとしての有効性が高いと判断した両ワクチン株を比較すると、マダイ由来の 041221 株でより高いワクチン効果がみられることが本試験から示唆された。また、対照区とワクチン区でみられる累積死亡率の差を考慮すると、本試

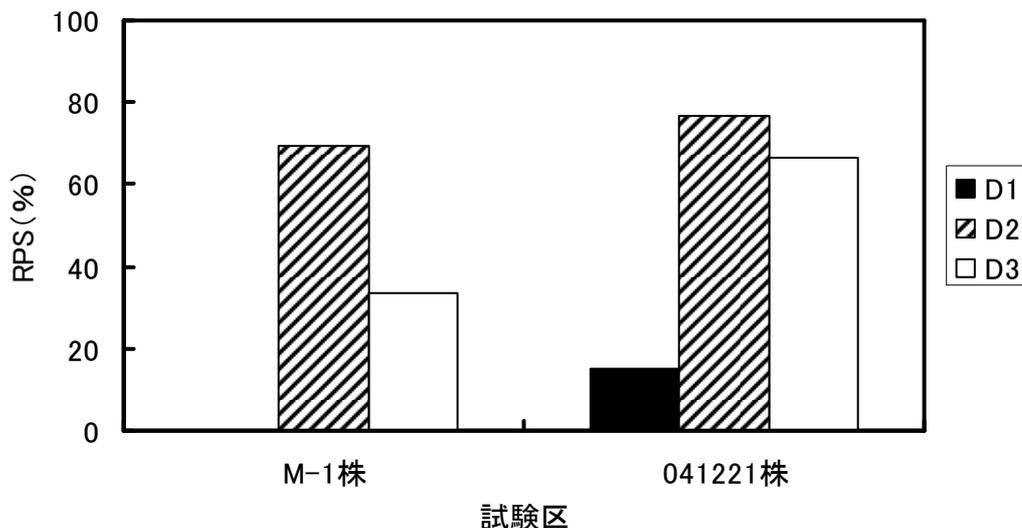


図 2 ワクチン有効率

験で設定した魚体重や免疫期間では、腹腔内注射法を用いたワクチンの有効性判定は1尾あたり 10^5 CFU程度の接種量で実施することが適当であると考えられた。

2 有効株の追加免疫効果の確認

本試験では、041221株及びM-1株の追加免疫効果を確認することを目的とした飼育試験を実施した。

(1) 材料及び方法

試験には室内水槽で予備飼育した平均体重23.5gのマダイを用い、ワクチンは041221株及びM-1株より調製した1と同様のものを用いた。免疫は腹腔内注射法により行い、1尾あたり0.1mlずつ1mlツベルクリンシリンジ(25G)を用いて各ワクチンを接種した。接種尾数は各90尾とし、それぞれ45尾ずつ5001ダイライト角形水槽(水量4251)に収容した。そして、1日1回、午前8:00を目安に市販のDPを投与しながら4週間通常飼育したが、片方の水槽の魚についてのみ、初回免疫から2週間後に1回目と同様の方法で再度ワクチンを接種して追加免疫することとした。なお、対照区は45尾の魚に滅菌PBSを1回接種した1水槽のみとした。

初回免疫から4週間後に攻撃試験を実施した。攻撃試験にはマダイ由来強毒株*E. tarda* MR-04株を用い、試験1と同様に分注して凍結保存しておいたストックを解凍してそのまま培養に用いた。培養方法は解凍菌液をその100倍量のTryptose phosphate broth (TPB)に添加して25°C・24時間前培養した後に、その全量を別のTPBに前培養と同倍率で添加して25°C・18時間本培養することとし、得られた菌液を原液とした。なお、この菌原液についてSS寒天培地を用いて25°C・48時間静置培養した後に平板塗抹法で生菌数を測定した結果、 1.1×10^9 CFU/mlとなった。攻撃方法には腹腔内注射法と浸漬法を用い、菌原液を滅菌PBSで希釈して 5.6×10^6 CFU/mlとしたものを腹腔内注射感染用の菌液とし、それを1mlツベルクリンシリンジ(25G)を用いて1尾あたり0.1mlずつ接種した。いっぽう、浸漬感染には301パンライト水槽を用い、飼育海水を加えて全量が25lで、終濃度が 1.1×10^8 及び 5.6×10^7 CFU/mlとしたものを供試菌液とし、それぞれ浸漬感染-1及び浸漬感染-2とした。浸漬感染は30分間実施し、その間エアレーションで感染水槽内の通気と菌液の拡散を促した。なお、攻撃試験それぞれの供試尾数は免疫魚のうちの各10尾ずつとし、浸漬感染中に魚の異常はみられなかった。菌液投与後は2001ポリエチレン製角形水槽(水量1801)15基に収容して3週間通常飼育しながら経過観察した。なお、給餌は1 ワクチン株の最終選定と同様に行った。

攻撃試験期間中の水温は加温冷却装置により 25 ± 1 °Cに維持し、攻撃試験期間中も免疫期間中と同様に市販のDPを1日1回投与した。そして、死魚がみられた際には直ちに持ち上げるとともに、生残魚については1と同様の方法で発症状況とSS寒天培地を用いたエドワジェラ症原因菌の再分離の状況を調べた。

(2) 結果及び考察

試験期間中の生残率の推移を図3に示した。いずれの感染方法でも死亡は感染2日後からみられ始め、浸漬感染-1では対照区・ワクチン区ともに感染4日後まで生残率が急激に低下したが、その後は緩やかな減少へと変化した。浸漬感染-2では試験開始直後から生残率の低下は緩やかであったが、試験終盤の17日後前後からいずれも生残率が低下する傾向がみられ、特に対照区ではそれが顕著であった。いっぽう、腹腔内注射感染では試験開始4日後までにいずれの試験区でも生残率が急激に低下したが、その後はワクチン区・対照区ともに死亡が終息する傾

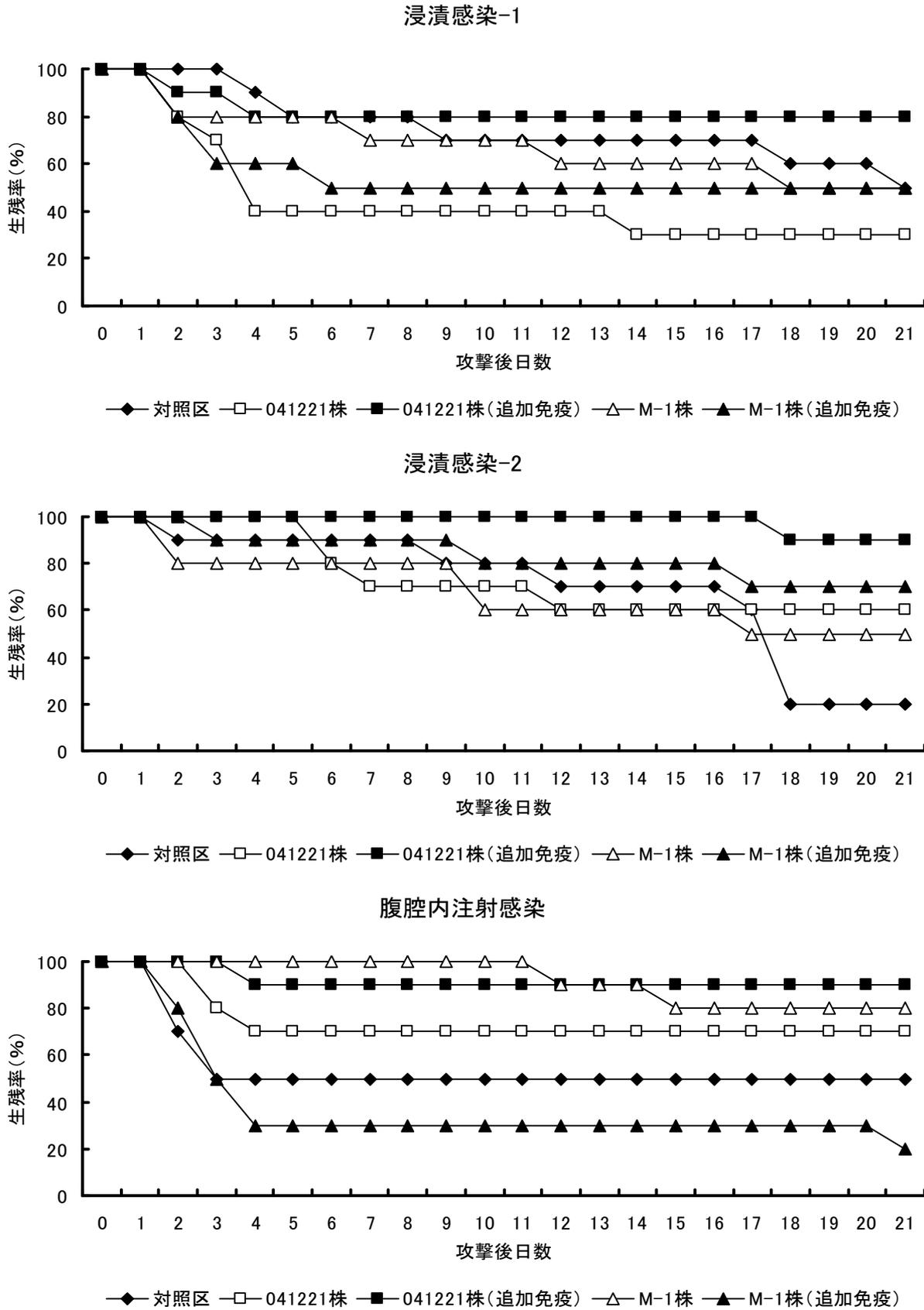


図3 試験期間中の生残率の推移

向がみられた。

試験終了時における生残率と生残魚でみられた発症状況を表2に示した。追加免疫区における試験終了時の生残率をみると、浸漬感染-1では041221株で80.0%、浸漬感染-2では041221株で90.0%、M-1株で70.0%を示し、それぞれ1回免疫区よりも高い生残率が認められ、追加免疫効果が確認された。しかし、腹腔内注射感染区では、M-1株において追加免疫区で20.0%と対照区よりも低い生残率を示した。このM-1株では1回免疫区で80.0%の高い生残率を示し

表2 試験終了時における生残率及び生残魚でみられた発症状況

感染方法:菌濃度	試験区	尾数		生残率 (%)	生残魚			
		開始時	終了時		結節様白点(腎臓)	結節様白点(脾臓)	頭部膿瘍	菌分離
浸漬感染-1: 1.1 × 10 ⁸ CFU/ml	対照区	10	5	50.0	0/5	1/5	0/5	1/5
	041221株	10	3	30.0	1/3	1/3	0/3	1/3
	041221株(追加免疫)	10	8	80.0	1/8	1/8	1/8	1/8
	M-1株	10	5	50.0	1/5	1/5	2/5	0/5
	M-1株(追加免疫)	10	5	50.0	1/5	2/5	0/5	1/5
浸漬感染-2: 5.6 × 10 ⁷ CFU/ml	対照区	10	2	20.0	0/2	0/2	0/2	0/2
	041221株	10	6	60.0	4/6	2/6	3/6	0/6
	041221株(追加免疫)	10	9	90.0	2/9	2/9	0/9	1/9
	M-1株	10	5	50.0	1/5	0/5	1/5	0/5
	M-1株(追加免疫)	10	7	70.0	1/7	0/7	2/7	1/7
腹腔内注射感染: 5.6 × 10 ⁵ CFU/尾	対照区	10	5	50.0	1/5	1/5	0/5	0/5
	041221株	10	7	70.0	1/7	1/7	2/7	1/7
	041221株(追加免疫)	10	9	90.0	0/9	0/9	0/9	0/9
	M-1株	10	8	80.0	2/8	1/8	2/8	0/8
	M-1株(追加免疫)	10	2	20.0	0/2	2/2	1/2	1/2

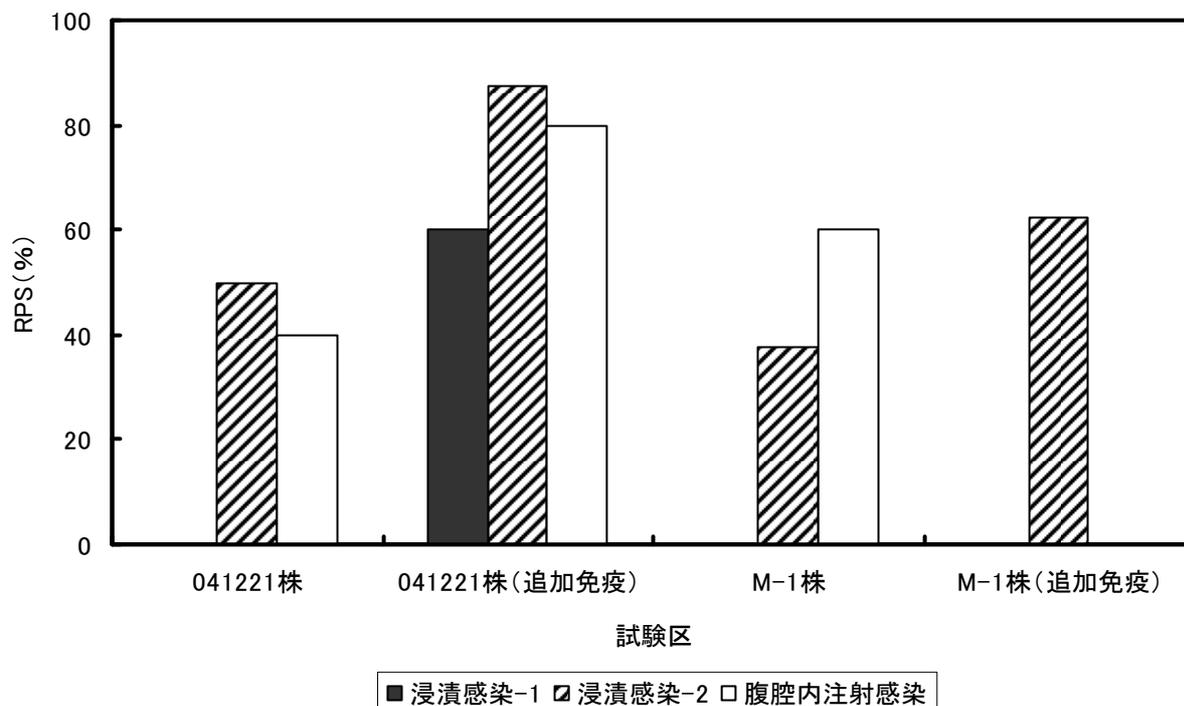


図4 ワクチン有効率

たのに対し、追加免疫区では攻撃4日後には生残率が著しく低下していることから、腹腔内注射法を用いた免疫もしくは攻撃試験時の菌投与における作業上の何らかのミスも否定できないと考えられる。また、本試験では攻撃試験時の魚体重が大きく、収容密度上の問題で各感染実験の供試尾数が10尾ずつと少なかったが、このことがその影響をさらに増加させた可能性もある。そのため、今後は免疫時の供試魚体重を低く抑える、あるいは感染水槽の大型化によって供試尾数を増やした検討も必要であると思われる。

3 浸漬感染時間の検討

これまでのワクチン試験では浸漬時間を60分に設定してマダイを感染させて有効性を判定してきた。しかし、この浸漬時間はヒラメで実施された過去の報告と比較しても長く、止水条件下での感染が及ぼす魚への影響も懸念されることから、本試験では浸漬感染水槽内の温度を調整することにより、浸漬感染時間の短縮を図った。

(1) 材料及び方法

本試験には試験1と同様の方法で予備飼育した平均体重24.1gのマダイを用いた。菌株にはマダイ由来 *E. tarda* 強毒株 MR-04 株を用い、TPB を用いて試験2と同様に前培養・本培養したものを菌原液とした。感染には301パンライト水槽を用い、菌原液に飼育海水を加えて水量を20lに統一して菌液の終濃度を 1.3×10^7 及び 3.3×10^7 CFU/ml の2段階とした。そして石英ヒーターとサーモスタットを感染水槽に投入することで供試菌液の温度を24及び28℃の2段階に設定するとともに、さらにそれぞれの浸漬時間を30及び60分間とした計8区を設けた。そして、各20尾ずつの予備飼育魚をそこに収容して感染させた。感染中はエアレーションで通気し、感染後は供試魚を速やかに200lポリエチレン製の飼育水槽(水量180l)に移動させて14日間通常飼育しながら経過観察した。なお、給餌は「1 ワクチン株の選定」と同様に行った。

試験期間中の水温は24.0~24.4℃に設定し、1日1回、午前8:00前後に市販のDPを飽食量給餌した。また、死魚がみられた場合には直ちに上げるとともに、生残魚については試験1および2と同様に発症状況やSS寒天培地を用いた腎臓からの原因菌の回収率を調べた。

(2) 結果及び考察

試験期間中の累積死亡率の推移を図5に示した。いずれの菌濃度でも、死亡は感染1~2日後からみられ始めた。まず、菌濃度 3.3×10^7 CFU/ml をみると、感染2日後までに急激な累積死亡率の上昇が認められ、28℃で30分間浸漬した試験区では特にその傾向が顕著であった。しかし、それ以降は累積死亡率の上昇はほとんど認められず、感染12日後までは一定の値で推移した。いっぽう、他の試験区では感染2日後以降も緩やかな累積死亡率の上昇が認められた。また、 1.3×10^7 CFU/ml でも 3.3×10^7 CFU/ml と同様に、感染2~3日後までに急激に累積死亡率が増加したが、 3.3×10^7 CFU/ml での感染とは異なり、その後も試験終了時まで継続的に累積死亡率が増加した。累積死亡率の上昇は浸漬時間60分で顕著であったが、本研究では、同一の浸漬時間で比較すると感染時の水温は累積死亡率に影響を及ぼさなかった。

試験終了時における累積死亡率と生残魚の発症状況を調べた結果を表3に示した。 1.3×10^7 CFU/ml をみると、同一感染水温では60分間の浸漬時間で30分よりもやや高い累積死亡率が認められ、24℃では100%、28℃では90.0%となった。生残魚の腎臓における結節様白点が認められた個体数はやや多かったが、脾臓における結節様白点、頭部膿瘍症状の出現率はいずれの試験区でも低く、原因菌の回収率もそれと同様であった。菌濃度 3.3×10^7 CFU/ml では、試験

終了時における累積死亡率がいずれの試験区でも 80.0~95.0%の範囲であり、浸漬時間や浸漬時の水温が累積死亡率に及ぼす有意な影響はみられなかった。また、生残魚のうちの発症個体数も少なく、累積死亡率の上昇も非常に緩やかとなった。この原因として、 3.3×10^7 CFU/ml では菌濃度が高かったために短期間のうちに発病、死亡へとつながったと考えられ、それが本研究で設定した水温と浸漬時間の条件以上に影響を及ぼしたことが考えられる。

筆者はワクチンの有効性判定で浸漬法を用いる場合、 10^7 CFU/ml 前後に供試菌液の濃度を調整して用いている。本試験で設定した 10^7 CFU/ml の菌濃度下においては、浸漬感染時間を 60 分から 30 分に短縮しても累積死亡率やマダイの発症に及ぼす影響は小さく、本結果をワクチンの有効性判定時に活用できるものと考えられる。

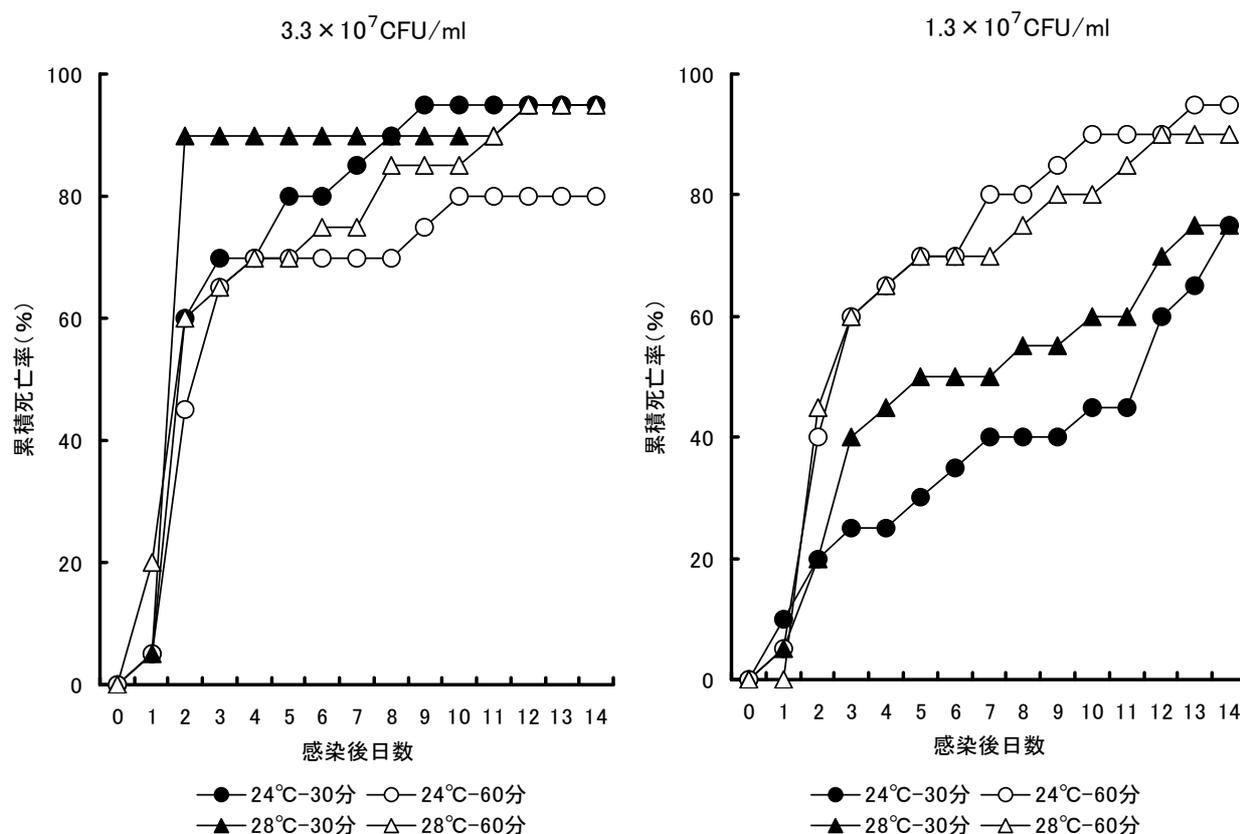


図5 試験期間中の累積死亡率の推移

表3 試験終了時における累積死亡率及び生残魚の発症状況

菌濃度	感染時の 水温-時間	尾数		累積死亡 率(%)	生残魚			
		開始時	終了時		結節様白 点(腎臓)	結節様白 点(脾臓)	頭部膿瘍	菌分離
1.3×10^7 CFU/ml	24-30	20	5	75.0	3/5	1/5	0/5	2/5
	24-60	20	0	100	1/1	0/1	0/1	0/1
	28-30	20	5	75.0	4/5	0/5	0/5	0/5
	28-60	20	2	90.0	2/2	0/2	0/2	0/2
3.3×10^7 CFU/ml	24-30	20	1	95.0	0/1	1/1	0/1	0/1
	24-60	20	4	80.0	2/4	1/4	1/4	0/4
	28-30	20	1	95.0	1/1	1/1	0/1	0/1
	28-60	20	1	95.0	1/1	0/1	0/1	0/1

引用文献

- ・高知県水産試験場(2006)平成16年度高知県水産試験場事業報告. 137-143.
- ・高知県水産試験場(2007)平成17年度高知県水産試験場事業報告. 118-122.
- ・高知県水産試験場(2008)平成18年度高知県水産試験場事業報告. 131-141.
- ・馬久地隆行・清川智之・本多数充・中井敏博・室賀清邦(1995)ヒラメのエドワジェラ症に対する予防免疫の試み. 魚病研究. 30. 251-256.
- ・馬久地隆行・清川智之・本多数充・中井敏博・室賀清邦 (1995): ヒラメにおける *Edwardsiella tarda* の感染実験. 魚病研究. 30. 247-250.
- ・緑書房(2006)新魚病図鑑. 177