

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

マダイは本県の重要な海面養殖魚種であるが、腸内細菌科に属するグラム陰性細菌 *Edwardsiella tarda* の感染によ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病と並んでマダイ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、罹病魚では生残しても外観が醜悪となり、商品価値が消失す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これまでにマダイの他にヒラメでも報告されているが、現在までに実用化されたものはない。そこで、大学、ワクチンメーカーと連携し、マダイに対して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することとした。まず、第1段階として平成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、複数の有効株を選定した。そして、平成18年度以降は第2段階と位置づけ、これら有効株を用いた詳細な検討を行うこととした。初年度の平成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。次に、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て、注射法よりも再現性が高いと結論づけた浸漬法について条件検討を実施した。

本年度は最終年度として、浸漬感染時間の検討と免疫時の詳細な条件設定を目的とした飼育実験を行った。

1 浸漬法を用いた感染実験系の検討

筆者のこれまでの研究により、浸漬法では感染マダイにおいて養殖現場でみられるような典型症状が再現されやすく、死亡率の上昇も実際の発生状況に近く慢性的に進むことから、本方法がワクチンの有効性の判定に適していると判断された。しかし、これまでの実験は浸漬時間を60分間として実施しており、一般的な浸漬感染条件と比較して非常に長い。そこで、実験の効率化を目的として本年度は浸漬時間の短縮を試みた。次に、浸漬感染時の収容密度がその後の死亡率や発症に及ぼす影響についても調べた。

(1) 浸漬感染時間の検討

1) 材料及び方法

供試魚には高知県水産試験場内の室内飼育実験室で砂ろ過、紫外線殺菌及び精密ろ過処理した海水を用いて約2ヶ月間予備飼育した平均体重11.2gのマダイを用いた。なお、予備飼育中の供試魚でエドワジェラ症やその他の感染症による死亡は認められなかった。供試菌株にはマダイの腎臓から分離し、スクリーニングによりマダイに対して毒性が強いことを確認したMR-04株を用いた。菌株はスキムミルクを加えたTryptose phosphate broth (TPB) に懸濁させたのち、それをセラムチューブに分注して-80℃で凍結保存し、使用時にはそれを1本ずつ取り出して用いた。解凍した菌液は100倍量のハートインヒュージョン (HI) 液体培地に懸濁させ、25℃で24時間静置培養したのちに、全量を別のHI液体培地に再び100倍量になるように

マダイのエドワジェラ症に有効なワクチン開発

移し替えて本培養したものを菌原液とした。

感染水槽には 30L の円形パンライト水槽を用い、供試尾数は各 17 尾とした。供試菌濃度は 2 段階に設定し、水量が 25L で統一されるように菌原液と飼育海水を組み合わせた。供試菌液中の生菌数を SS 寒天培地を用いて計数 (25°C・48 時間培養) した結果、 1.4×10^8 及び 7.0×10^7 CFU/ml であった。浸漬時間はそれぞれの菌数について 10、20 及び 30 分に設定し、感染中は水槽内を十分に通気した。感染後は水量が 180L のポリエチレン製の 200L 角形水槽に速やかに魚を移動させ、通気しながら 21 日間経過観察を行った。なお、期間中は市販のドライペレットを 1 日 1 回給餌し、水温は 25.0~25.2°C であった。

感染実験期間中にみられた死亡魚は直ちに上げ、累積死亡率を算出した。生残魚については、解剖後に SS 寒天培地を用いて腎臓から原因菌の回収 (25°C、48 時間培養) を行った。また、腎臓及び脾臓の結節様白点を確認し、さらに頭部膿瘍症状と腎臓からの原因菌の回収結果の計 4 指標を元にして、生残魚の感染状況を総合的に判定するために以下の式から平均感染価を算出した。なお、腎臓及び脾臓における結節様白点はスライドグラス 2 枚で圧ぺい標本を作製して、頭部膿瘍症状は目視により確認した。

平均感染価 = (各実験区の生残魚でみられた腎臓結節様白点、脾臓結節様白点、頭部膿瘍及び原因菌の分離が確認された結果をそれぞれ 1 とした合計) / 生残個体数

2) 結果及び考察

感染実験期間中の累積死亡率の推移を図 1 に、実験終了時における累積死亡率、生残魚の発症状況及び平均感染価を表 1 に示した。死亡は両菌濃度とも 2 日後から始まった。 1.4×10^8 CFU/ml の菌数で 30 分浸漬した区では 5 日後まで急激に死亡率が上昇したが、その後は一定の値で推移した。その他の実験区でも、いずれの菌濃度についても実験開始 2~5 日後には顕著

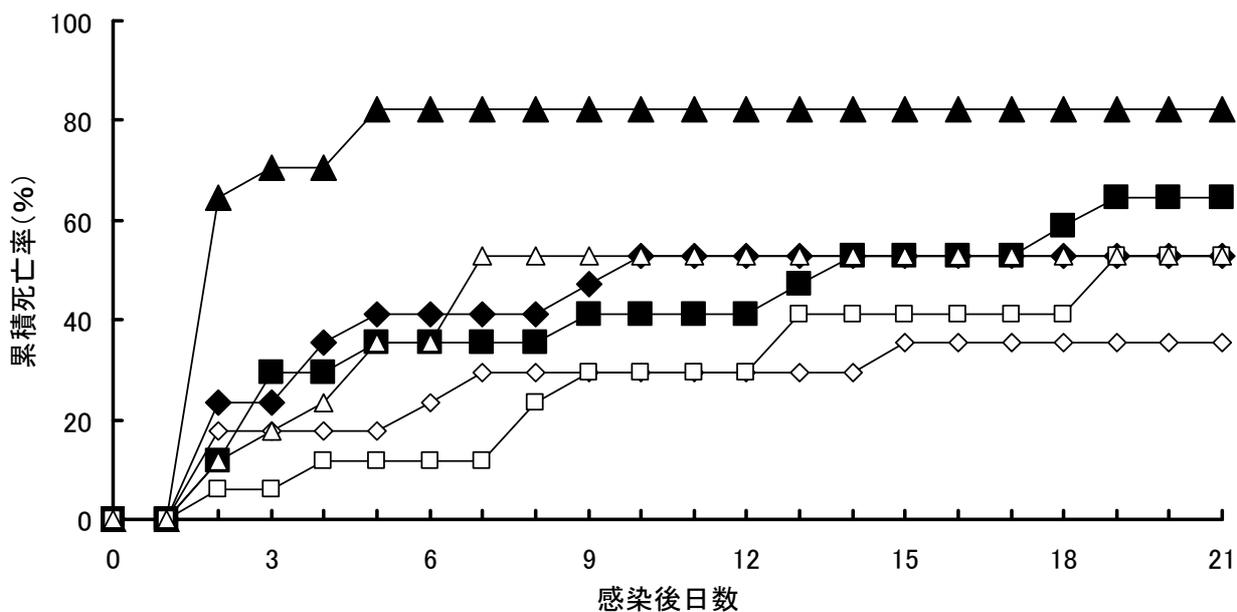


図 1 浸漬感染時間の違いによる累積死亡率の推移
 7.0×10^7 CFU/ml-(◇):10分、(□):20分、(△):30分、
 1.4×10^8 CFU/ml-(◆):10分、(■):20分、(▲):30分。

表 1 生残魚でみられた症状、原因菌の回収及び平均感染価

菌濃度 (CFU/ml)	浸漬時間 (分)	飼育尾数		累積死亡率 (%)	生残魚でみられた症状 ^{*1}				平均感染価
		開始時	終了時		結節様白点		原因菌の ^{*2} 回収		
					腎臓	脾臓		原因菌の ^{*2} 回収	
7.0×10^7	10	17	11	35.3	8/11	0/11	0/11	1/11	0.82
	20	17	7	58.8	3/7	1/7	3/7	2/7	1.29
	30	17	7	58.8	5/7	2/7	0/7	3/7	1.43
1.4×10^8	10	17	8	52.9	6/8	3/8	1/8	1/8	1.38
	20	17	6	64.7	3/6	0/6	2/6	1/6	1.00
	30	17	3	82.4	1/3	1/3	1/3	2/3	1.67

*1 陽性個体数/生残個体総数。

*2 腎臓から菌分離し、SS寒天培地を用いて25°C、48時間培養した結果。

な死亡率の上昇が認められたが、その後は緩やかな上昇で推移した。終了時における累積死亡率は 7.0×10^7 CFU/ml では 10 分浸漬で 35.3%、20 分及び 30 分浸漬で 58.8% となった。 1.4×10^8 CFU/ml では 10 分浸漬で 52.9%、20 分浸漬で 64.7%、30 分浸漬で 82.4% となり、浸漬時間とともに顕著に上昇した。表 1 の生残魚の発症状況をみると、腎臓における結節様白点は多くの個体で確認され、特に 10 分浸漬では 7.0×10^7 CFU/ml で 11 尾中 8 尾、 1.4×10^8 CFU/ml で 8 尾中 6 尾と高率に認められた。平均感染価にも累積死亡率と同様の傾向がみられ、 7.0×10^7 CFU/ml では浸漬時間が長くなるにつれて上昇がみられた。また、 1.4×10^8 CFU/ml では 20 分浸漬で 1.00 と低い値を示したものの 30 分浸漬で 1.67 と最も高く、 7.0×10^7 CFU/ml と類似した傾向が認められた。

以上の結果から、10 分浸漬でもエドワジェラ症による死亡や生残魚における典型症状は確認されるものの、ワクチンの有効性判定として用いることを念頭に置くと、10 分浸漬では累積死亡率が低く、30 分程度は必要であると考えられた。

(2) 浸漬感染時の収容尾数の検討

1) 材料及び方法

供試魚には (1) と同様に予備飼育した平均体重 17.8 g のマダイ稚魚を用いた。菌株、菌原液及び供試菌液の調製は (1) と同様とし、2 段階の菌濃度でマダイを感染させた。供試菌液の生菌数を計数した結果、 4.0×10^6 及び 8.0×10^6 CFU/ml となり、感染水槽内の収容尾数はそれぞれの菌濃度について 5、10 及び 20 尾とした。浸漬時間は 30 分とし、その間は菌液の拡散を促すためにエアレーションで充分通気した。感染後は速やかに魚を水量が 180L のポリエチレン製の 200L 角形水槽に移動させ、流水飼育しながら 17 日間経過観察を行った。その間、実験魚には市販のドライペレットを 1 日 1 回給餌し、水温は 25.1~25.4°C であった。

実験期間中は死亡尾数から累積死亡率を算出した。また、終了時における生残魚は全て取り上げ、解剖して発症状況を確認するとともに (1) と同様にして平均感染価を算出した。

2) 結果及び考察

感染実験期間中の累積死亡率の推移を図 2 に、実験終了時における累積死亡率、生残魚の発症状況及び平均感染価を表 2 に示した。 4.0×10^6 CFU/ml の菌濃度では死亡は 2 日後から始まったが、累積死亡率の顕著な上昇は認められなかった。 8.0×10^6 CFU/ml でも死亡は 2 日後から始

マダイのエドワジェラ症に有効なワクチン開発

まり、20尾区では7日後まで累積死亡率の上昇が認められたが、それ以降は終息した。5尾区では2日後、10尾区では6日後まで死亡が続き、その後は一旦終息して15日以降に再び死亡率が上昇した。終了時における累積死亡率は 4.0×10^6 CFU/mlでは10尾区及び20尾区で10.0%となり、5尾区では死亡はみられなかった。 8.0×10^6 CFU/mlでは5尾区及び10尾区で60.0%、20尾区で35.0%であった。生残魚の発症状況をみると、どちらの菌濃度でも20尾区で典型的な症状が確認された個体が多く、原因菌も3尾から再分離された。また、どちらの菌濃度でも収容尾数が増加するにつれて平均感染価は上昇し、5尾区では 4.0×10^6 CFU/mlで0.60、 8.0×10^6 CFU/mlで0.50であったが、20尾区ではそれぞれ0.94及び1.00となった。

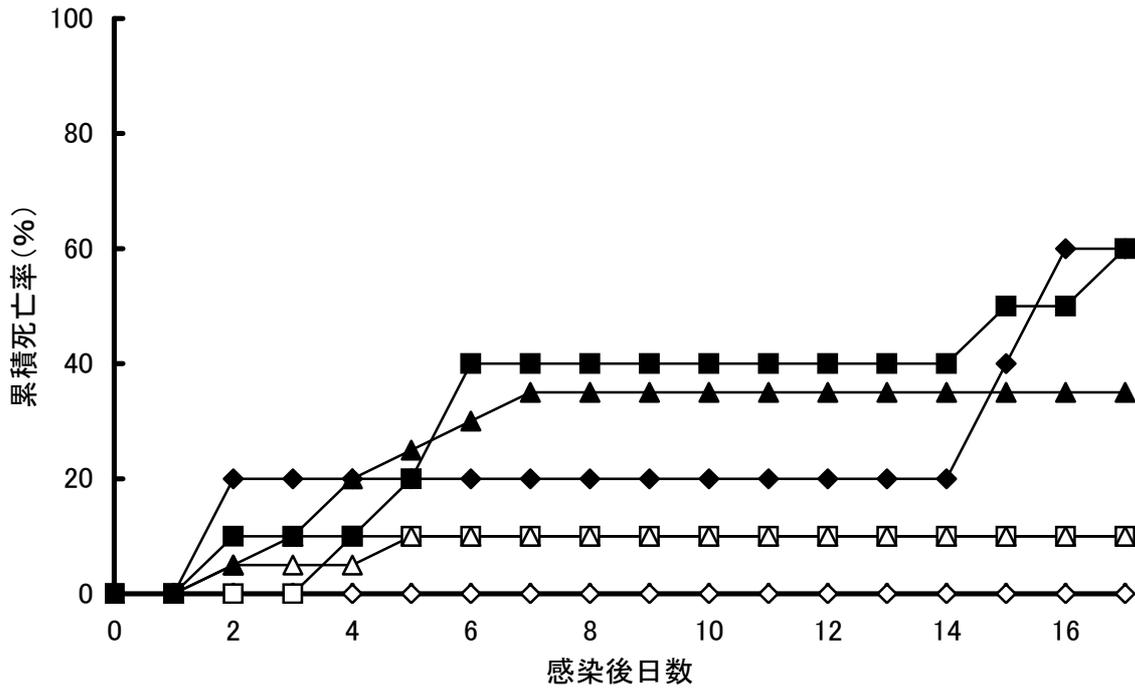


図2 収容尾数の違いによる累積死亡率の推移
 4.0×10^6 CFU/ml-(◇):5尾、(□):10尾、(△):20尾、
 8.0×10^6 CFU/ml-(◆):5尾、(■):10尾、(▲):20尾。

表2 生残魚でみられた症状、原因菌の回収及び平均感染価

菌濃度 (CFU/ml)	飼育尾数		累積死亡率 (%)	生残魚でみられた症状*1				平均感染価
	開始時	終了時		結節様白点		頭部膿瘍	原因菌の*2 回収	
				腎臓	脾臓			
4.0×10^6	5	5	0	1/5	0/5	0/5	2/5	0.60
	10	9	10.0	0/9	2/9	2/9	1/9	0.56
	20	18	10.0	6/18	4/18	4/18	3/18	0.94
8.0×10^6	5	2	60.0	0/2	0/2	1/2	0/2	0.50
	10	4	60.0	1/4	0/4	0/4	2/4	0.75
	20	13	35.0	5/13	2/13	3/13	3/13	1.00

*1 陽性個体数/生残個体総数.

*2 腎臓から菌分離し、SS寒天培地を用いて25°C、48時間培養した結果.

以上の結果から、浸漬感染水槽内の収容密度は生残魚の発症に影響を及ぼし、高密度ではより典型症状が再現されやすいことが明らかとなった。

2 ワクチンの有効性の検討

筆者のこれまでの研究から、ヒラメ及びマダイ由来の複数の菌株からワクチンを試作し、マダイに対する免疫原性を比較した結果、ヒラメ由来の M-1 株で最も高い有効性が確認された。そこで、本年度はこのワクチン株を用いたデータ収集のため、免疫時の魚体重の影響、追加免疫効果及び有効抗原量について検討した。

(1) 免疫時の魚体重の影響

本実験では、免疫時の魚体重がワクチンの有効性に及ぼす影響を調べるため、試作したホルマリン死菌ワクチン (FKC) を体重の異なるマダイに投与して有効性を比較した。

1) 材料及び方法

供試魚には 1 と同様に予備飼育したマダイを用い、開始時の平均体重は小型魚試験で 6.2 g、大型魚試験では 47.3 g とした。ワクチン株にはヒラメ由来の M-1 株を用いた。ワクチンは通常の FKC のようにホルマリンで不活化した後に洗浄と懸濁は行わず、不活化したものをそのまま供試した。なお、ワクチンの抗原量は 2.0×10^9 CFU/ml であった。供試尾数は小型魚試験で 17 尾、大型魚試験で 11 尾とし、ツベルクリンシリンジを用いて 1 尾あたり 0.1 ml の割合でワクチンをマダイの腹腔内に投与した。なお、対照区の魚には滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を同様にして接種した。免疫後は市販のドライペレットを 1 日 1 回投与しながら 3 週間飼育した。

ワクチンの有効性の判定は 1 と同様にマダイ由来の MR-04 株を用いた浸漬感染実験により行った。菌原液の調製法も 1 と同様とし、それぞれ 2 段階とした。SS 寒天培地で供試菌液の生菌数を計数 (25°C、48 時間培養) した結果、小型魚試験では 1.2×10^7 及び 2.4×10^7 CFU/ml、大型魚試験で 1.2×10^7 及び 2.3×10^7 CFU/ml であった。浸漬時間は 30 分に設定し、浸漬中は十分に通気した。どちらの実験でも、感染後は魚を速やかに水量が 180L のポリエチレン製の 200L 角形水槽に移動させ、小型魚試験では 25 日間、大型魚試験では 21 日間経過観察を行った。期間中は市販のドライペレットを 1 日 1 回給餌し、水温を 25 ± 1 °C に維持しながら飼育した。経過観察中にみられた死亡魚は直ちに引き上げ、対照区とワクチン区の累積死亡率をもとに、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。また、どちらの実験も生残魚の腎臓から SS 寒天培地を用いて菌分離し、25°C で 48 時間培養して原因菌の回収を行った。さらに、1 と同様の方法で発症状況から平均感染価を算出した。

2) 結果及び考察

小型魚試験における感染実験期間中の生残率の推移を図 3 に、実験終了時の累積死亡率と生残魚でみられた症状、原因菌の菌分離結果及び平均感染価を表 3 に示した。死亡は 2 日後からみられ始め、対照区ではどちらの菌濃度とも 4~5 日後まで急激に生残率が低下し、その後は 22~23 日後まで一定で推移した。ワクチン区では、 1.2×10^7 CFU/ml において期間中緩やかに減少しながら対照区よりも高い値で推移したが、 2.4×10^7 CFU/ml では対照区と同様に推移した。

マダイのエドワジェラ症に有効なワクチン開発

終了時における生残率は 1.2×10^7 CFU/ml では対照区で 5.9%、ワクチン区で 58.8%とワクチン区で高かったが、 2.4×10^7 CFU/ml では対照区・ワクチン区とも 23.5%となった。 1.2×10^7 CFU/ml ではワクチン有効率は 56.3%となったが、 2.4×10^7 CFU/ml では対照区とワクチン区が生残率が同値であったため、0%となった。生残魚のうち、エドワジェラ症に特有の症状を呈した個体や原因菌が回収された個体の数は比較的少なかったが、平均感染価はどちらの菌濃度でもワクチン区で低い値を示した。

大型魚試験における試験期間中の生残率の推移を図4に、実験終了時における生残魚でみられた症状、原因菌の菌分離結果及び平均感染価を表4に示した。死亡は4日後からみられ始めたが、いずれの菌濃度でも対照区・ワクチン区ともに生残率は高く推移した。終了時における生残率をみると、 1.2×10^7 CFU/ml では対照区で 81.8%、ワクチン区で 63.6%となった。一方、 2.3×10^7 CFU/ml ではワクチン区で 90.9%と高い生残率を示したが、対照区でも 81.8%の生残率が認められたためにワクチン有効率は 50.0%にとどまった。生残魚で確認された典型症状を

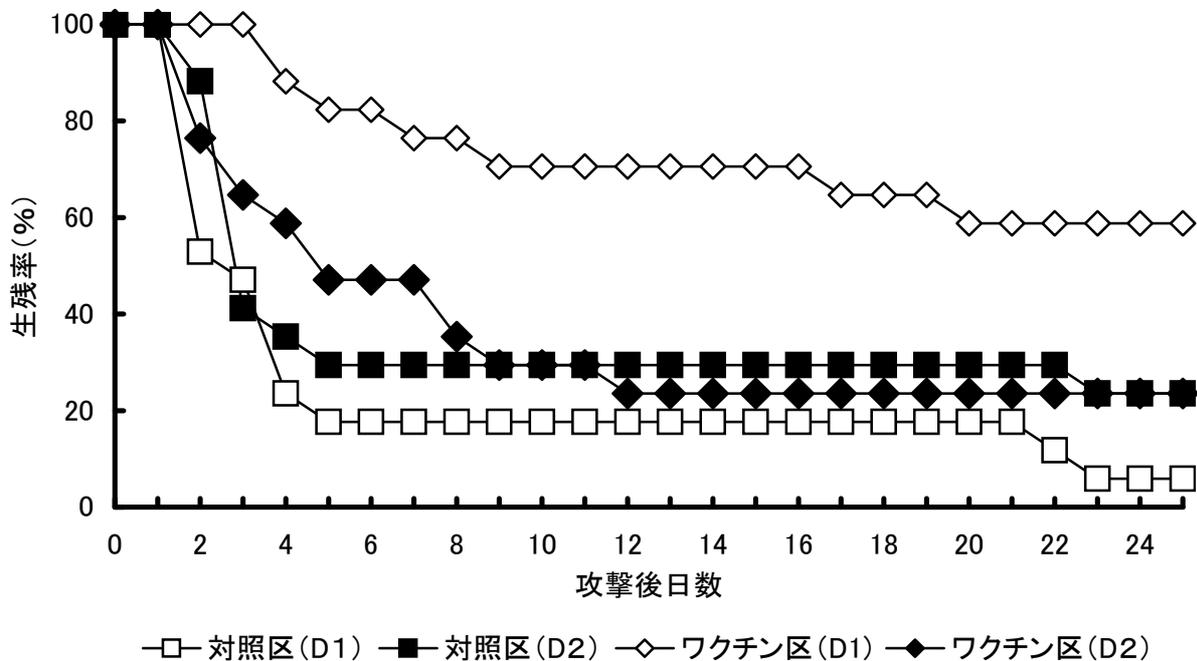


図3 小型魚試験における感染試験期間中の生残率の推移
(D1 : 1.2×10^7 CFU/ml、D2 : 2.4×10^7 CFU/ml)

表3 小型魚試験の生残魚でみられた症状、原因菌の回収及び平均感染価

菌濃度 (CFU/ml)	試験区	飼育尾数		生残率 (%)	ワクチン 有効率 (%)	生残魚でみられた症状 ^{*1}			原因菌の ^{*2} 回収	平均感染価
		開始時	終了時			結節様白点 腎臓	脾臓	頭部膿瘍		
1.2×10^7	対照区	17	1	5.9	—	1/1	1/1	0/1	0/1	2.00
	ワクチン区	17	10	58.8	56.3	2/10	2/10	0/10	1/10	0.50
2.4×10^7	対照区	17	4	23.5	—	3/4	2/4	0/4	0/4	1.25
	ワクチン区	17	4	23.5	0	2/4	0/4	0/4	1/4	0.75

*1 陽性個体数/生残個体総数.

*2 腎臓から菌分離し、SS寒天培地を用いて25°C、48時間培養した結果.

みると 1.2×10^7 CFU/ml では対照区において脾臓の結節様白点が確認された個体や原因菌が回収された個体数が多く、平均感染価は対照区で 1.56、ワクチン区で 0.86 となった。また、 2.3×10^7 CFU/ml の菌液でも 1.2×10^7 CFU/ml と同様の傾向が認められ、対照区で 0.44 と高く、ワクチン区で 0.30 となった。

以上の結果から、小型魚試験・大型魚試験とも生残魚における平均感染価は対照区で高く、エドワジェラ症の典型症状を示す罹病魚は対照区で多いと判断されたが、全体的に対照区における生残率が高かったためにワクチン有効率は低く算出された。また、本実験の大型魚試験ではいずれの実験区でも生残率が均衡していた。筆者のこれまでの実験では、魚体重が 10~15 g の供試魚を用いて 10^7 CFU/ml 前後の菌濃度でマダイを浸漬感染させると対照区において継続的な死亡がみられ、ワクチン区と対照区において生残率の差が顕著に認められた。そこで、今回の実験でもその菌数を採用

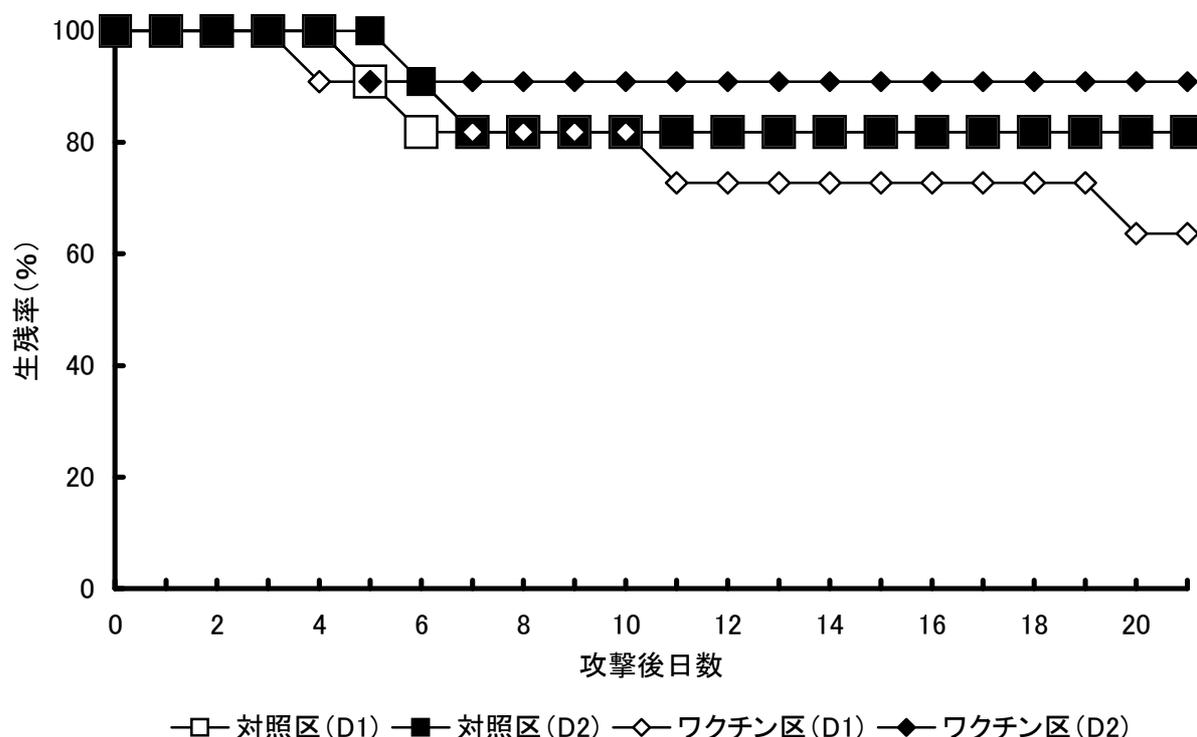


図 4 大型魚試験における感染実験期間中の生残率の推移
(D1: 1.2×10^7 CFU/ml、D2: 2.3×10^7 CFU/ml)

表 4 大型魚試験の生残魚でみられた症状、原因菌の回収及び平均感染価

菌濃度 (CFU/ml)	試験区	飼育尾数		生残率 (%)	ワクチン 有効率 (%)	生残魚でみられた症状* ¹				平均感染価
		開始時	終了時			結節様白点 腎臓	脾臓	頭部膿瘍	原因菌の 回収* ²	
1.2×10^7	対照区	11	9	81.8	—	0/9	5/9	2/9	7/9	1.56
	ワクチン区	11	7	63.6	0	2/7	2/7	1/7	1/7	0.86
2.3×10^7	対照区	11	9	81.8	—	1/9	1/9	1/9	1/9	0.44
	ワクチン区	11	10	90.9	50.0	2/10	1/10	0/10	0/10	0.30

*¹ 陽性個体数/生残個体総数 × 100.

*² 腎臓から菌分離し、SS寒天培地を用いて25°C、48時間培養した結果.

マダイのエドワジェラ症に有効なワクチン開発

したが、開始時の平均体重が比較的大きいマダイでは、小型魚とは別の感染条件等を検討する必要があるものと考えられた。

(2) 追加免疫間隔の検討

ワクチンの有効性は追加免疫によって向上することが知られており、魚類でもブリ属の α レンサ球菌症において追加免疫が実施できるワクチンが市販されている。

そこで、本実験では試作したマダイのエドワジェラ症ワクチンについての追加免疫効果を確認するとともに初回免疫から追加免疫までの期間について検討した。

1) 材料及び方法

供試魚には1と同様に予備飼育した平均体重 10.5 g のマダイ稚魚を用いた。ワクチンには2—(1)と同一のM-1株由来のものを用い、ツベルクリンシリンジを用いて1尾あたり 0.1ml のワクチンを各区 15尾ずつのマダイの腹腔内に投与した。これを初回免疫とし、追加免疫区では初回免疫から1週間後及び2週間後に再度同様にワクチン投与を行いながら計4週間の経過観察を行った。なお、1回免疫区では開始時のみのワクチン投与とし、対照区の魚には開始時に滅菌PBSを腹腔内接種した。そして、感染実験までの間市販のドライペレットを1日1回投与し、水温を $25 \pm 1^\circ\text{C}$ に維持しながら流水飼育した。

免疫後はマダイ由来のMR-04株を用い、1と同様に浸漬法を用いて2段階の菌濃度で感染実験を行った。SS寒天培地 (25°C 、48時間培養)を用いて菌液の終濃度を計数した結果、 3.2×10^7 及び 6.4×10^7 CFU/mlとなった。浸漬時間は30分に設定し、その間は感染水槽内を充分通気した。感染後は水量が180Lのポリエチレン製の200L角形水槽に速やかに魚を移動させ、同様に給餌して25日間飼育した。なお、その間の水温は $25.1 \sim 25.4^\circ\text{C}$ であった。

感染実験期間中の死亡魚は取り上げて累積死亡率を算出した。また、終了時における生残魚は解剖して症状を確認するとともに、腎臓から原因菌の再分離を行った。さらに、1と同様に平均感染価を算出した。

2) 結果及び考察

感染実験期間中の累積死亡率の推移を図5に、終了時における生残率、生残魚の発症状況及び平均感染価を表5に示した。どちらの菌濃度でも死亡は実験開始2日後からみられ始め、 3.2×10^7 CFU/mlで感染させた魚では実験期間中緩やかな生残率の減少がみられた。一方、 6.4×10^7 CFU/mlで感染させた魚では、対照区において6日後までに急激な生残率の低下が認められたが、ワクチン区では対照区よりもそれが緩やかであった。終了時の生残率をみると、 3.2×10^7 CFU/mlではいずれの試験区とも同等の値となり、対照区でも80.0%を示した。一方、 6.4×10^7 CFU/mlでは1回免疫区で80.0%の生残率を示し、対照区の33.3%と比較して有意に高い値が認められた。追加免疫区では1週間後・2週間後とも60.0%の生残率を示し、対照区よりも高かったものの1回免疫よりも低下した。 3.2×10^7 CFU/mlで感染させた魚では、各区の生残率の差は小さかったのに対し、1週間後の追加免疫区では平均感染価が0.18と他の試験区よりも顕著に低い値を示した。 6.4×10^7 CFU/mlでも対照区で1.40と最も高く、追加免疫区では1週間後・2週間後ともに0.56と低かった。 6.4×10^7 CFU/mlで感染させた各区について、累積死亡率から算出したワクチン有効率を図6に示した。その結果、1回免疫区では70.0%と実用化の

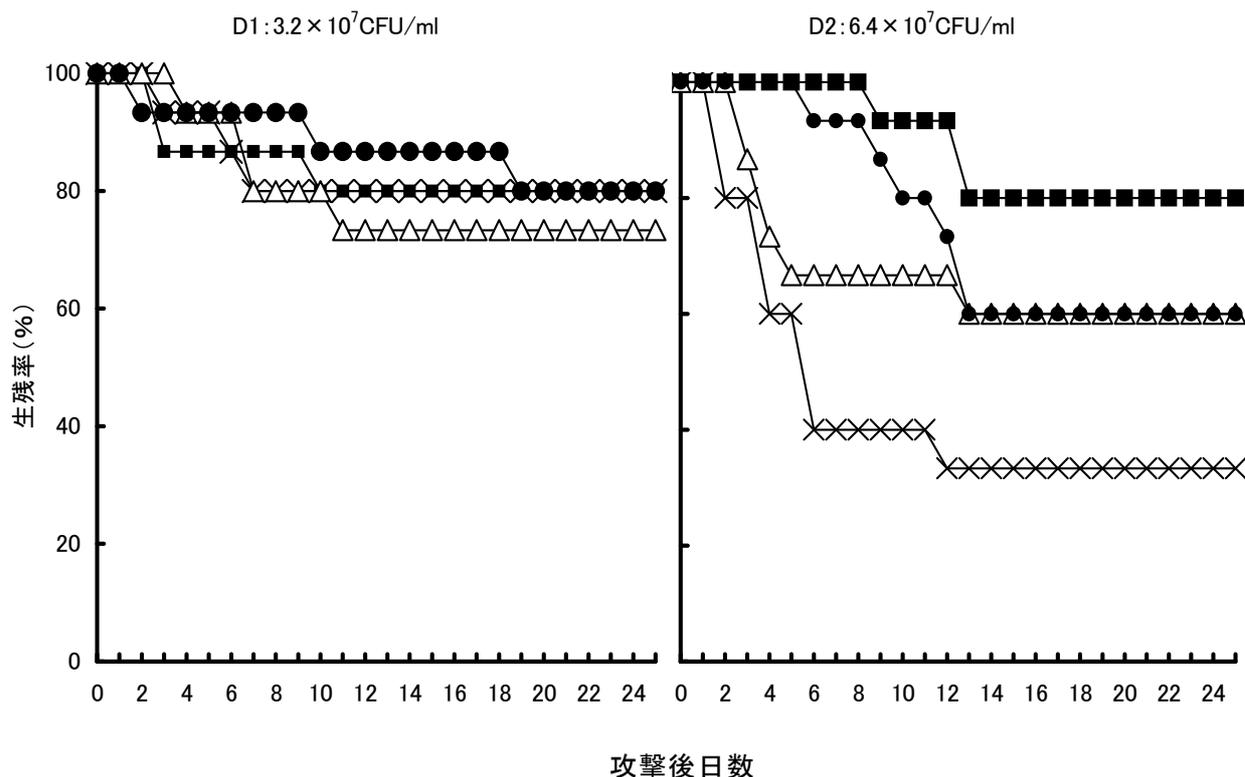


図5 異なる方法で免疫した後の感染実験期間中における生残率の推移
(× : 対照区、■ : 1回免疫区、△ : 1週間後追加免疫区、● : 2週間後追加免疫区)

表5 生残魚でみられた症状、原因菌の回収及び平均感染価

菌濃度 (CFU/ml)	試験区	飼育尾数		生残率 (%)	生残魚でみられた症状* ¹				平均感染価
		開始時	終了時		結節様白点		原因菌の* ² 回収	頭部膿瘍	
					腎臓	脾臓			
D1 : 3.2 × 10 ⁷	対照区	15	12	80.0	3/12	4/12	3/12	0/12	0.83
	1回免疫区	15	12	80.0	1/12	3/12	3/12	1/12	0.67
	1週間後追加免疫区	15	11	73.3	1/11	0/11	1/11	0/11	0.18
	2週間後追加免疫区	15	12	80.0	2/12	3/12	1/12	2/12	0.67
D2 : 6.4 × 10 ⁷	対照区	15	5	33.3	2/5	3/5	2/5	0/5	1.40
	1回免疫区	15	12	80.0* ³	2/12	2/12	2/12	1/12	0.75
	1週間後追加免疫区	15	9	60.0	1/9	1/9	2/9	1/9	0.56
	2週間後追加免疫区	15	9	60.0	1/9	2/9	1/9	1/9	0.56

*¹ 陽性個体数/生残個体総数.

*² 腎臓から菌分離し、SS寒天培地を用いて25°C、48時間培養した結果.

*³ χ^2 検定、 $p < 0.05$

目安となる60%を超える値が認められたものの、追加免疫区ではいずれも40%となった。

以上のことから、本実験では1週間後・2週間後のいずれの追加免疫区においても顕著な生残率の上昇は認められず、有効性が低い結果となった。しかし、どちらの菌濃度で感染させた場合でも、追加免疫区では対照区や1回免疫区よりも平均感染価が低い傾向がみられたことから、追加免疫は生残魚に占める発症個体の割合を減少させる効果はあると推察された。

マダイのエドワジェラ症に有効なワクチン開発

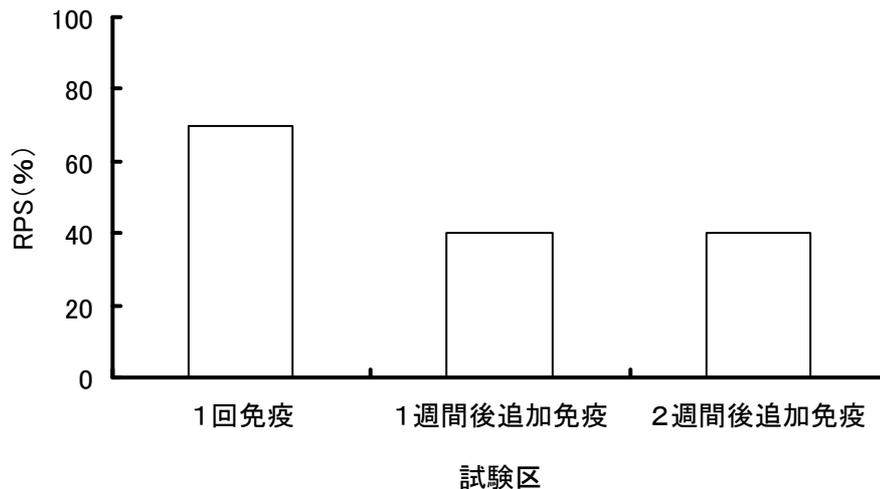


図6 6.4×10^7 CFU/ml で感染させた試験区におけるワクチン有効率

(3) 有効抗原量の検討

ワクチンの抗原量は製造コストを左右する要因となり、商品化を見据えた場合、低い抗原量で有効率の高いワクチンが望ましいといえる。

そこで、本実験ではこれまでの一連のワクチン投与試験に用いてきたワクチン株について、ワクチンとしての有効性が認められる有効抗原量について検討した。

1) 材料及び方法

供試魚には、1と同様に予備飼育した平均体重 14.1 g のマダイを、ワクチンは2-(1)と同様に M-1 株由来のものを用いた。本実験では、これを 10 倍階段希釈して調製した 2.0×10^7 、 2.0×10^8 CFU/ml 及び 2.0×10^9 CFU/ml (原液) の 3 種を供試し、ツベルクリンシリンジを用いて 1 尾あたり 0.1ml のワクチンを各 15 尾ずつのマダイの腹腔内に投与した。なお、対照区の魚には滅菌 PBS を同量投与した。免疫期間は 21 日間とし、1 日 1 回市販のドライペレットを投与しながら流水飼育した。なお、この間の水温は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ に維持した。

免疫後、MR-01 株を用いて 1 と同様に各区のマダイを浸漬感染させた。本実験では感染菌濃度を 1 段階とし、SS 寒天培地 (25°C 、48 時間培養) を用いて菌液の終濃度を測定した結果、 1.5×10^7 CFU/ml であった。感染後は水量が 180L のポリエチレン製の 200L 角形水槽に速やかに魚を移動させ、同様にして 21 日間飼育した。なお、その間の水温は $25.3 \sim 26.0^\circ\text{C}$ であった。

感染実験期間中の死亡魚は取り上げて累積死亡率を算出した。また、終了時における生残魚は解剖して症状を確認するとともに、腎臓から原因菌の再分離を行った。さらに、1 と同様にして平均感染価を算出した。

2) 結果及び考察

実験期間中の生残率の推移を図 7 に、終了時における生残率、生残魚の発症状況及び平均感染価を表 6 に示した。死亡は実験開始 1 日後からみられ始め、対照区では 4 日後まで急激に生残率が低下したのちは緩やかな減少で推移した。ワクチン区では、いずれも終了時まで継続的

かつ緩やかに生残率が低下した。終了時における生残率をみると、対照区では20.0%であったのに対し、抗原量が 2.0×10^8 CFU/ml 及び 2.0×10^9 CFU/ml では53.3%と有意に高かった。生残魚の発症状況をみると、平均感染価は対照区で2.00と最も高く、 2.0×10^7 CFU/ml で0.20、 2.0×10^8 CFU/ml 及び 2.0×10^9 CFU/ml で0.38であった。累積死亡率から算出したワクチン有効率は図8に示したように、 2.0×10^7 CFU/ml で16.7%、 2.0×10^8 CFU/ml 及び 2.0×10^9 CFU/ml で41.7%となった。

以上の結果から、抗原量が 10^7 CFU/ml ではワクチン有効率が著しく低下し、有効抗原量としては 10^8 CFU/ml 以上必要と判断された。同じワクチン株を用いたこれまでの実験では、 10^9 CFU/ml オーダーの抗原量で60%以上のワクチン有効率が確認されているが、本実験では 10^9 CFU/ml でもワクチン有効率は41.7%と低く、再現性の面で課題が示された。

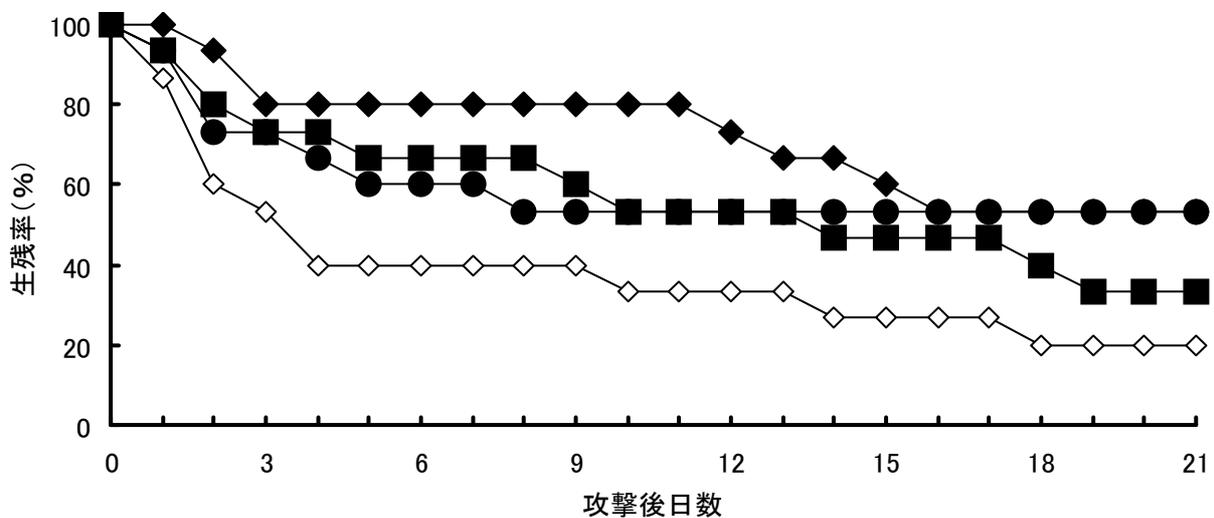


図7 抗原量の異なるワクチンで免疫した後の感染実験期間中における生残率の推移 (◇：対照区、■： 2.0×10^7 CFU/ml、●： 2.0×10^8 CFU/ml、◆： 2.0×10^9 CFU/ml)

表6 生残魚でみられた症状、原因菌の回収及び平均感染価

試験区	飼育尾数		生残率 (%)	生残魚でみられた症状 ^{*1}			原因菌の ^{*2} 回収	平均感染価
	開始時	終了時		結節様白点		頭部膿瘍		
				腎臓	脾臓			
対照区	15	3	20.0	1/3	1/3	1/3	3/3	2.00
2.0×10^7	15	5	33.3	0/5	0/5	1/5	0/5	0.20
2.0×10^8	15	8	53.3 ^{*3}	2/8	0/8	1/8	0/8	0.38
2.0×10^9	15	8	53.3 ^{*3}	1/8	0/8	1/8	1/8	0.38

*1 陽性個体数／生残個体総数.

*2 腎臓から菌分離し、SS寒天培地を用いて25°C、48時間培養した結果.

*3 χ^2 検定、 $p < 0.05$

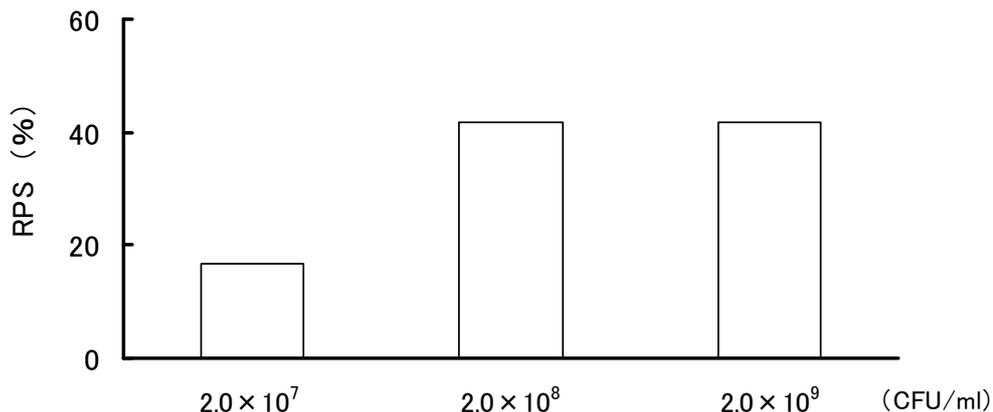


図8 ワクチン有効率

3 総括

平成 14 年度から計 7 年間、実験感染方法の検討と並行してマダイのエドワジェラ症に有効なワクチンの開発について検討した。本研究では、まずワクチン投与後に用いる攻撃菌株をスクリーニングし、その後は選択した菌株の培養方法を含む条件を一定に保ちながら感染実験を実施した。その結果、良好な結果が認められた実験もあったが、実施する年や時期あるいは実験魚による結果のバラツキがみられ、再現性の面で課題が残された。これを克服するためには FKC 以外のワクチンの検討も必要であるが、予備飼育段階からの実験魚の管理も重要なものかもしれない。

実験感染法については、死亡率の上昇や発症状況を考慮した結果、浸漬法が養殖現場でみられる状況を最も反映する実用的な手法であると判断された。また、浸漬感染時の収容密度がエドワジェラ症の発症に影響を及ぼしていると推察されることから、この知見は養殖現場におけるマダイエドワジェラ症対策の一つとして活用できると思われる。

引用文献

- ・黒原健朗(2006)平成 16 年度高知県水産試験場事業報告. 137-143.
- ・黒原健朗(2007)平成 17 年度高知県水産試験場事業報告. 118-122.
- ・黒原健朗(2008)平成 18 年度高知県水産試験場事業報告. 131-141.
- ・黒原健朗(2009)平成 19 年度高知県水産試験場事業報告. 152-160.
- ・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.