

アユの冷水病に対する経口ワクチンの研究—Ⅲ

ワクチン内包腸溶性マイクロカプセルに対する水溶性アジュバントの添加について

原 日出夫

Study of Oral Vaccination against Coldwater Disease
in Cultured Ayu, *Plecoglossus altivelis*—ⅢEnhancement of vaccination efficacy with enteric-coated microcapsules
by the use of water-soluble adjuvant.

Hideo HARA*

はじめに

近年全国的に発生し、問題となっているアユ冷水病の予防対策として、アユ冷水病ワクチン(以下「ワクチン」と記す)の研究が進められている^{1), 2), 3)}。これまでに、注射ワクチンにおいて有効性が確認されている⁴⁾が、稚魚への負担が大きいこと、手間がかかることなどから、より簡便な投与方法が求められている。

経口ワクチンは、簡便であるものの胃液の作用により効果が低く、実用化が難しいとされてきた。そこで著者は、胃液で溶解せず腸液により溶解する性質のマイクロカプセル⁵⁾(以下「MC」と記す)に着目した。ワクチンをマイクロカプセルに内包して、アユに経口投与した結果、アユ冷水病の原因菌(*Flavobacterium psychrophilum*)に対する血中凝集抗体価(以下「抗体価」と記す)の上昇を確認した^{6), 7)}。しかし、オイルアジュバントを添加した注射ワクチンの抗体価(1:2~1:16)と比較して低い傾向(1:2~1:8)にあり、実用化を目指すためにはワクチンの効果を高めるアジュバントや投与期間の検討および攻撃試験による評価等が必要とされた⁷⁾。

そこで本研究では、水溶性アジュバント添加ワクチン内包MCをアユに一定期間経口投与した後、その効果について、冷水病菌の生菌注射による攻撃試験および同菌に対する抗体価による評価を行った。

材料および方法

供試魚は、神奈川県水産総合研究所内水面試験場において継代(2代)飼育された親魚から、2002年11月に採

卵し、養成した平均体重4.8gのアユを用いた。

ワクチン原液の調製は、滋賀県のアユから分離された冷水病菌株SG990302株を改変サイトファーガ液体培地で96時間振とう培養し、ホルマリンを0.3%濃度となるように添加後、4℃で24時間以上保存して不活化した(6.0×10⁸CFU/mL)。

試験区は、FKB-MC区、1.0%IMS-MC区、10.0%IMS-MC区および無処理対照区の4区を設定した。FKB-MC区は、アジュバント無添加のワクチン内包MCを用いた。すなわち、ワクチン原液を4℃、5000rpm、30分で遠心分離し、上清を除去後、原液の容量で1/10となるようPBS(-)水溶液を添加し、10倍濃縮ワクチン液を調製した。これを既報⁷⁾に基づきカプセル化した(以下「FKB-MC」と記す)。1.0%IMS-MC区は、水溶性アジュバント添加ワクチン内包MCを用いた。すなわち、10倍濃縮ワクチン液に対して水溶性アジュバント(セピック社製 Montanidae IMS 1312)(以下「IMS」と記す)を外割りで1.0%の容量で添加し、FKB-MCと同様に作製した(以下「1.0%IMS-MC」と記す)。10.0%IMS-MC区は、10倍濃縮ワクチン液に対してIMSを外割りで10.0%の容量で添加し、FKB-MCと同様に作製した(以下「10.0%IMS-MC」と記す)。なお、オイルアジュバントは注射ワクチンにおいてその効果が確認されているが、本研究では、MCへの内包作業が複雑となるため用いなかった。水溶性アジュバントは効果が確認されており⁸⁾、既報⁷⁾と同様の製造方法でMCに内包できることから、本研究ではこれを用いた。無処理対照区は、配合飼料のみを与えた。

ワクチンの経口投与は、2003年8月4日から開始した。ワクチンを確実に投与するため、次のとおり配合飼料と混合した。すなわち、配合飼料(大洋飼料(株)製「あゆっ

子4号)に滅菌蒸留水を適量散布し、柔らかくした後、各MCとそれぞれ混合し、先端をカットした10mLのシリンジにこれを入れ、シリンジ先端に目合い約5mmのナイロンメッシュをあてて押し出した後、細断した。これを各MC相当量で0.5g/kg(BW)/日となるよう各区にそれぞれ投与した。投与期間は、5日間連続投与後2日間休止する方法を3回繰り返した。

ワクチン投与開始から攻撃試験直前までの飼育管理は、円型0.5t水槽に供試魚を各150尾収容し、井戸水のかげ流しで飼育した。この間の水温は17.0~20.0°Cであった。

初回ワクチン処理後29日目に、冷水病菌の生菌注射による攻撃試験を行った。生菌液は、冷水病菌SG990302株を改変サイトファーガ液体培地で15°C、96時間振盪培養後、高濃度(3.0×10^7 CFU/尾)または低濃度(2.0×10^6 CFU/尾)に調製した(以下それぞれ「高濃度攻撃」および「低濃度攻撃」と記す)。生菌液の濃度を2濃度設定したのは、冷水病菌の攻撃性が水温により変化する⁹⁾ことを考慮したためである。前者は各区からそれぞれ20尾、後者は各区からそれぞれ25尾を取り上げ、攻撃試験に供した。アユに対して生菌注射直前にFA100による麻酔を行った後、背鰭基部筋肉内に各生菌液を50 μ L/尾注射した。攻撃後14日間の死亡数を経日的に観察した。攻撃試験期間中の飼育管理は、20Lの角型アクリル水槽で、井戸水のかげ流しで飼育し、水温は18.2~19.0°Cであった。無処理対照区とワクチン区における死亡数の差の検討はFisherの直接確立計算法により行い、ワクチンの有効率(relative percent survival:RPS(%))=(1-ワクチン区のへい死率/無処理対照区のへい死率) \times 100)は、Cory and Amend¹⁰⁾に従い算出した。

冷水病菌に対する抗体価は、各区から5尾ずつマイクロタイター法により測定した。測定に供する血清は、注射器を用いて尾柄部より採血し、24時間、4°Cで保存した。その後、4°C、4500rpmで20分間遠心分離して得た。補体の非動化処理は、血清を40°Cのインキュベーター内に30分間静置して行った。

結 果

攻撃試験の結果をTable1およびFig.1、2に示した。

高濃度攻撃で攻撃開始後に初めて死亡が確認されたのは、FKB-MC区では2日後、無処理対照区では3日後、1.0%IMS-MC区および10.0%IMS-MC区では4日後であった。攻撃開始から14日後の死亡率は、低い順にFKB-MC区が55.0%、10.0%IMS-MC区が60.0%、1.0%IMS-MC区が75.0%および無処理対照区が80.0%であった。各MCとも無処理対照区に対する死亡率に有意差が認められなかった。RPSは、高い順にFKB-MC区が31.3%、10.0%IMS-MC区が25.0%および1.0%IMS-MC区が6.3%であった。低濃度攻撃で攻撃開始後に初めて死亡が確認されたのは、無処理対照区では2日後、1.0%IMS-MC区では5日後、FKB-MC区および10.0%IMS-MC区では6日後であった。攻撃開始から14日後の死亡率は、低い順に10.0%IMS-MC区が40.0%、1.0%IMS-MC区が44.0%、FKB-MC区が72.0%および無処理対照区が80.0%であった。1.0%IMS-MC区および10.0%IMS-MC区において、無処理対照区に対する死亡率に有意差($P < 0.01$)が認められた。RPSは、高い順に10.0%IMS-MC区が50.0%、1.0%IMS-MC区が45.0%およびFKB-MC区が10.0%であった。

Table1 Relative percentage survival (RPS) of Vaccinated ayu after challenge with *F. psychrophilum* strain SG990302.

表1 冷水病菌(SG990302株)による攻撃試験の結果

| Groups | Challenge dose (CFU/fish) | Total (numbers of fish) | Specific loss (numbers of fish) | Mortality (%) | RPS (%) |
|-------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------------|------------------|------------|
| FKB-MC | 3.0×10^7 | 20 | 11 | 55.0 | 31.3 |
| | 2.0×10^6 | 25 | 18 | 72.0 | 10.0 |
| 1.0%IMS-MC | 3.0×10^7 | 20 | 15 | 75.0 | 6.3 |
| | 2.0×10^6 | 25 | 11 | 44.0* | 45.0 |
| 10.0%IMS-MC | 3.0×10^7 | 20 | 12 | 60.0 | 25.0 |
| | 2.0×10^6 | 25 | 10 | 40.0* | 50.0 |
| Control | 3.0×10^7 | 20 | 16 | 80.0 | |
| | 2.0×10^6 | 25 | 20 | 80.0 | |

Water temperature, 18.2~19.0°C

Asterisks indicate that the mortality is significantly different from the control group of the same challenge dose. *, $P < 0.01$.

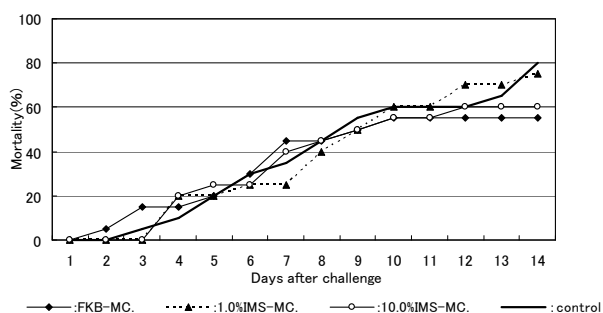


Fig. 1 Changes in cumulative mortality for 14 days after challenge (challenge level was 3.0×10^7 CFU/fish).

図1 攻撃試験における死亡率の推移(攻撃菌量: 3.0×10^7 CFU/尾)

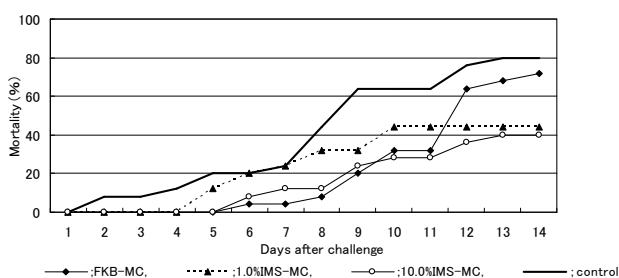


Fig.2 Changes in cumulative mortality for 14 days after challenge (challenge level was 2.0×10^6 CFU/fish).

図2 攻撃試験における死亡率の推移(攻撃菌量: 2.0×10^6 CFU/尾)

抗体価の測定結果を Table2 に示した。

Table 2 Agglutinating antibody titers in sera of ayu 29days after vaccination.

表2 ワクチン投与後29日後のアユの血中凝集抗体価

| Vaccines | Individual serum titers(1:) | | | | |
|-------------|------------------------------|-----|-----|-----|----|
| FKB-MC | <4, | <4, | <4, | <4, | 4 |
| 1.0%IMS-MC | <4, | <4, | <4, | <4, | <4 |
| 10.0%IMS-MC | <4, | <4, | <4, | <4, | 4 |
| Control | <4, | <4, | <4, | <4, | <4 |

初回ワクチン投与から 29 日後に抗体価を測定した結果、抗体獲得が確認されたのは FKB-MC 区および 10.0% IMS-MC 区の各 1 尾のみで、抗体価は各 1:4 であった。これらの他は抗体獲得が確認されなかった。

考 察

へい死遅延効果は、高濃度攻撃では認められず、低濃度攻撃では全ワクチン区で認められた。このことは、低濃度攻撃はワクチンの効果が現れる適当な強さであったが、高濃度攻撃はワクチンの効果を上回る強さであったと思われる。

これまでの FKB-MC の経口投与研究では、アユに対して FKB-MC を 1.0g/kg(BW)/日として合計 2 日または 10 日投与した場合の RPS は、0.0~11.1%と報告されている¹¹⁾。本研究における FKB-MC の RPS は、これらと比較して高い

傾向にある。楠田他¹²⁾によると、アユのビブリオ病の経口ワクチンでは、ワクチンの効果はワクチンの投与量および投与期間に比例するとされている。このことから、本研究においても投与期間の延長が RPS の値に影響した可能性が考えられた。

1.0%IMS-MC の死亡率は、低濃度攻撃で無処理対照区との間において有意差 ($P < 0.01$) が認められ、RPS は、FKB-MC のそれより高い値を示した反面、より低い値も示し、安定しなかった。これらのことから、1.0%の IMS を添加した場合、IMS の添加効果は低いと思われた。

10.0%IMS-MC の死亡率は、低濃度攻撃で無処理対照区との間において有意差 ($P < 0.01$) が認められ、RPS の最高値または最低値は、各 MC と比較して、いずれも最も高い値を示した。これらのことから、IMS の添加量の増加により効果が高まったと思われた。既に実用化されているビブリオ病ワクチンの RPS は 60.0%以上¹³⁾である。今後、アユ冷水病の経口ワクチンの実用化にあたり、IMS 添加量を更に増加させるなど PRS を高めるための検討が必要である。

抗体価はほとんど上昇が認められず、IMS の添加効果について比較検討ができなかった。この原因は不明である。一方、抗体価がほとんど上昇していないにも拘わらず、各 MC で一定の予防効果が認められている。このことは、経口ワクチンの投与により、血中抗体以外の要因が誘導された可能性が考えられる。

摘 要

本研究では、水溶性アジュバントを添加したアユ冷水病ワクチンを腸溶解性マイクロカプセル(MC)に内包後、アユに経口投与し、その有効性を検討した。

生菌注射攻撃では、ワクチンに10.0%の水溶性アジュバントを添加後、これを内包した MC において、無処理対照区に対する死亡率に有意差 ($P < 0.01$) が認められ、ワクチンの有効率についても25.0~50.0%と比較的高い値を得た。

以上のことから、MC を用いたアユ冷水病の経口ワクチンにおいて、水溶性アジュバントをワクチンに添加することは有効と思われた。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、独立行政法人水産研究センター養殖研究所病害防除部健康管理研究グループ乙竹充博士には水溶性アジュバントを提供して頂いた。厚くお礼申し上げます。また、試験魚の飼育管理等に協力いただいた日本大学生物資源科学部岩崎俊彦君に感謝いたします。本研究は、魚病対策技術開発研究推進事業費 ((社) 日本水産資源保護協会委託) により実施した。

引用文献

- 1) アユ冷水病研究部会(2000):アユの冷水病研究, 50-54.
- 2) 永井崇裕(2003):アユの冷水病に対するワクチンの有効性等に関する研究, 平成14年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 63-75.
- 3) 金辻宏明・二宮浩司・山本充孝(2003):アユ冷水病に対するワクチン開発に関する研究, 平成14年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 77-95.
- 4) RAHMAN, M. H., M. OTOTAKE, Y. IIDA, Y. YOKOMIZO and T. NAKANISHI(2000):Efficacy of Oil-adjuvanted Vaccine for ColdwaterDisease in Ayu *Plecoglossus altivelis*, Fish Pathology, **35(4)**, 199-203.
- 5) 藤野裕弘・永井彰(1992):魚類腸溶性マイクロカプセルの試作, 東海大学紀要教養学部, **23**, 275-284.
- 6) 原日出夫(2000):アユ冷水病に対する経口ワクチンの研究-I, 神奈川県水産総合研究所研究報告, **6**, 109-112.
- 7) 原日出夫(2002):アユ冷水病に対する経口ワクチンの研究-II, 神奈川県水産総合研究所研究報告, **8**, 17-20.
- 8) 永井孝裕・飯田悦左・米塚隆(2003):アユ冷水病に対する水溶性アジュバント添加ワクチンの野外試験, 魚病研究, **38(2)**, 63-65.
- 9) 相川英明(2000):アユ冷水病防除技術開発と診断手法の研究, 平成11年度魚病技術開発研究成果報告書, 161-171.
- 10) CORY, T. R. and D. F. AMEND(1977):Immunization of sockeye salmon(*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. Aquaculture, **12**, 317-325.
- 11) 原日出夫(2003):アユ冷水病ワクチンの開発に関する研究, 平成14年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 101-110.
- 12) 楠田理一・川合研児・城泰彦・秋月友治・福永稔・小竹子之助(1978):アユのビブリオ病に対する経口ワクチンの効果について, 日本水産学会誌, **44(1)**, 21-25.
- 13) 城泰彦(1991):ワクチンの有効性試験, 水産増養殖叢書, **41**, 102-110.