

2 1) ビブリオ病菌体の免疫原性を利用した冷水病菌体浸漬ワクチンの有効性

金辻宏明・二宮浩司・山本充孝・遠藤 誠

【目的】 *Flavobacterium psychrophilum* を原因菌とするアユ冷水病は近年、非常に問題となっており、早急に対策を講じる必要がある。現在アジュバントを併用したホルマリン不活化菌体(FKC)注射ワクチンで効果が認められているが、その有効性はやや低く、さらに個体ごとへの注射作業があることからより簡便な浸漬ワクチンの開発が切望されている。これまでに我々はFKCをハプテン化してワクチンとしての有効性を調べたところその効果は従来ワクチンより低かった。一般に免疫原性が高いと考えられているリポ多糖(LPS)と、免疫原性の高いビブリオ病ワクチンとを結合させてワクチンとしての有効性を調べても、同様に従来ワクチンより効果は低かった。そこで本研究では冷水病菌のLPSまたは超音波破壊した細胞壁と血清型の異なるビブリオ病ワクチンを結合させて浸漬ワクチンとしての有効性について検討した。

【方法】 供試魚には11月に琵琶湖で採捕され、冷水病経験のない平均体重1.87 gの湖産アユを用いた。ワクチンには浸漬法で接種する冷水病LPS、超音波破壊した冷水病FKC、超音波破壊したビブリオFKC(A型)とビブリオ病FKC(A, J-O-1,2)または冷水病FKCとを表1に示す組み合わせで結合させた5種類および従来の冷水病FKCを浸漬または注射接種する2種類の合計7種類を用いた。供試菌には*F. psychrophilum* SG-990302株、*Vibrio anguillarum* PT-479株(A型)およびマスのビブリオ病菌としてピシバックビブリオ【共立製薬】を用いた。*F. psychrophilum* の培養は改変サイトファーガ培地で、*V. anguillarum* の培養はハートインフュージョン液体培地で行い、不活化はホルマリンを添加して行った。LPSの抽出は培養菌体から温フェノール水を用いたWestpaulの方法¹⁾で行った。超音波破壊はFKCに超音波を2min照射して行った。LPSとビブリオFKC(J-O-1,3混合)との結合はタンニン酸法で行い、反応液をそのままワクチンとして用いるLPS結合Aワクチンと反応終了後リン酸緩衝食塩水で洗浄して用いるLPS結合Bワクチンを作製した。超音波破壊した冷水病またはビブリオFKCと、冷水病またはビブリオFKCとの結合はタンニン酸法で行った。ワクチンの接種は浸漬法では前報²⁾と同様にワクチン液に10min浸漬して、注射法では供試魚の腹腔内に50 μl接種して行った。免疫期間中は供試魚を0.5t水槽に収容して地下水を通水し、市販飼料を与えて飼育(2%魚体重/day)した。攻撃は免疫3および6week後に冷水病発生飼育水槽水導入法³⁾で行った。ワクチンの有効性は次の式により算出して評価した。有効率(%)=[1-(試験区死亡率 / 対照区死亡率)]×100

【結果】 免疫3および6week後の攻撃試験の死亡状況を図1および2に有効率を表2に示した。3weekではLPS結合AワクチンでFKC注射ワクチンの有効率を上回った。しかし、6week後ではLPS結合Aワクチンの有効率は2.9と大きく減少した。LPS結合Bワクチンでは3および6week後でそれぞれ4.1および11.5%とやや上昇した。ゆえにLPS結合Aワクチンでは短時間で有効性は上がるものの長期間の効果は期待できないと考えられた。しかし、3week後で従来ワクチンより効果があることから今後改良試験を行ってその有効性を評価する必要があると考えられた。またこれ以外の結合ワクチンでは従来のワクチン効果を上回らず、期待する効果は得られないと判断された。

表2 本研究で用いたワクチンの有効率

ワクチン	有効率(%)	
	免疫3週後に攻撃	免疫6週後に攻撃
FKC 浸漬用	16.3	2.9
LPS結合A ^{*1}	26.5	7.7
LPS結合B ^{*2}	4.1	11.5
Sonicated-FKC-マスビブリオFKC結合	12.2	-5.1
Sonicated-FKC-アユビブリオFKC結合	10.2	-7.0
Sonicated-アユビブリオFKC-FKC結合	14.3	3.1
FKC 注射用	16.3	28.4

*1: 結合未反応LPSを含む, *2: 結合未反応LPS除去.

文献 1) O. Westphal and K. Jann: Bacterial Lipopolysaccharides. Extraction with Phenol-Water and Further Applications of the Procedure. by R. L. Whistler, J. N. BeMiller and M. L. Wolfrom, "Methods in Carbohydrate Chemistry" Vol. V, Academic Press, New York, 83-91 (1965).
2) 金辻宏明: ハプテン化および免疫原性強化した冷水病菌体ワクチンの有効性, 平成14年度滋賀水試事報, in press (2003).

表1 本研究で用いたワクチンの種類、組成および接種方法

種類(ワクチン呼称)	結合ワクチン組成		接種法
	成分 I	成分 II	
FKC 浸漬用	<i>F.p.</i> FKC	—	浸漬
LPS結合A ^{*1}	<i>F.p.</i> LPS	<i>V.a.</i> (J-O-1,3) ^{*3} FKC	〃
LPS結合B ^{*2}	〃	〃	〃
Sonicated-FKC-マスビ [®] リアFKC結合	破壊 <i>F.p.</i> FKC	〃	〃
Sonicated-FKC-アユビ [®] リアFKC結合	〃	<i>V.a.</i> (A) ^{*3} FKC	〃
Sonicated-アユビ [®] リアFKC-FKC結合	破壊 <i>V.a.</i> (A) ^{*3} FKC結合	<i>F.p.</i> FKC	〃
FKC 注射用	<i>F.p.</i> FKC	アジュバント	注射
無処理	—	—	—

F.p. : *Flavobacterium psychrophilum*, *V.a.* : *Vibrio anguillarum*.

*1: 結合未反応LPSを含む, *2: 結合未反応LPS除去, *3: カッコ内は血清型を示す, 破壊: 超音波破壊

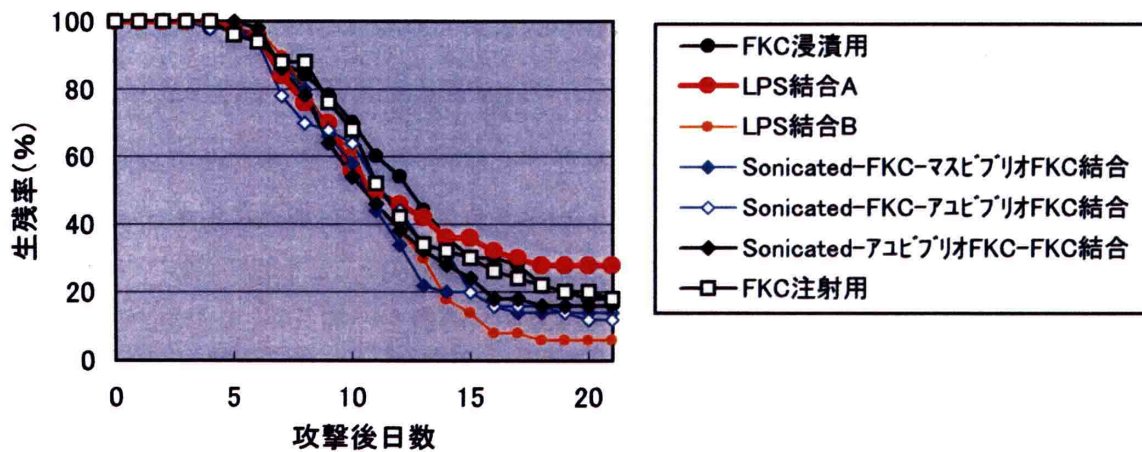


図1. ビブリオ病菌体結合冷水病ワクチンを浸漬または注射して3週間後のアユの攻撃による生残率の推移.

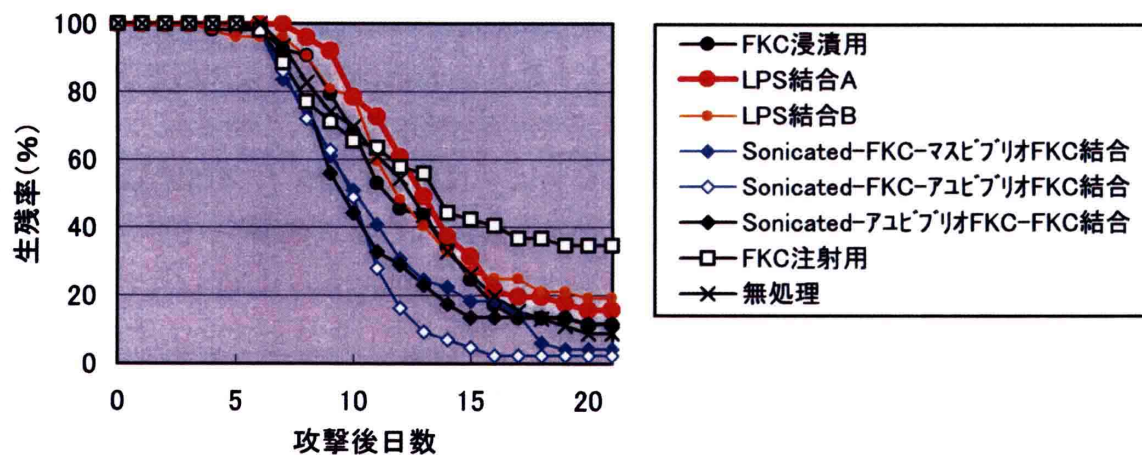


図2. ビブリオ病菌体結合冷水病ワクチンを浸漬または注射して6週間後のアユの攻撃による生残率の推移.