

# 莢膜を除去した冷水病菌体および冷水病菌由来コラゲナーゼを併用した冷水病浸漬ワクチンの効果

金辻宏明

## 1. 目的

冷水病浸漬ワクチンを開発するため、本研究では、冷水病菌の細胞壁から莢膜を除去して細胞壁中のタンパク質抗原を露出させてアユの免疫系に認識しやすくなるよう加工したワクチンと、さらに冷水病菌由来コラゲナーゼ(特許第6709395号)を併用することで効果がより高まるかどうか検討した。

## 2. 方法

供試魚には、2014年に琵琶湖で採捕され、28℃で加温処理した無病歴アユを用いた。供試菌には冷水病菌SG150804株を用いた。冷水病菌の莢膜除去菌ワクチン(SFPワクチン)は、供試菌を1mM CaCl<sub>2</sub>を含む500mLの1/2CGY培地で、15℃、48時間攪拌培養した培養液を4,000×gで10分間冷却遠心分離して上清を除去した菌体に0.5% SDS 10mLとNuclease (Sigma Benzo nase® E1014-5KU : 250unit/mL) 5μLを加え、24℃で16時間静置して可溶化液中のDNAを分解した。さらにホルマリン原液を終濃度0.1%になるよう混合して24℃、1時間固定後、5Lの蒸留水で希釈して調製し、速やかに使用した。コラゲナーゼ溶液(大腸菌組み換え産物)は松岡科学研究所(松研)提供のものを用いた。ワクチン処理は、供試魚500g(平均体重2.1g)を地下水で20倍希釈したコラゲナーゼ溶液2Lに30分間浸漬し、次に5LのSFPワクチン液に供試魚を移して20分間浸漬して行った。また、このワクチン処理の2週間後に再度、同様に2回目のワクチン処理を行った。ワクチンの効果は、松研の指示に従って初回免疫28日後のアユに、1mM CaCl<sub>2</sub>を含む1/2 CGY培地で15℃、48時間、120rpmで振盪培養した供試菌

表 冷水病由来コラゲナーゼおよびSFP併用ワクチン接種魚の有効率の評価

	攻撃時 死亡数	生残尾数	死亡尾数	死亡率	RPS (%)
SFPワクチン区	3	30	6	17%	38.9
Control	9	24	9	27%	-

※ 表の攻撃時死亡数は注射後1時間以内に死亡した数

液とグリセリンを等量混合したものをアユの腹腔内に50μL注射(1.3×10<sup>6</sup>CFU/Fish)して攻撃を行い、攻撃後は60×30×35cm水槽(55L)に移して地下水を通水しながら15日間飼育して死亡魚を計数した。また、ワクチンの有効性はRPS((1-試験区の死亡率/無処理区の死亡率)×100)およびFisherの直接確率計算法(片側検定)で評価した。

## 3. 結果

攻撃後の生残率およびRPSを表に示す。まず、注射筒内で攻撃菌の沈殿を防止することを目的としてグリセリンを攻撃菌液に加えて供試魚に注射接種を行ったところ、注射後1時間以内にSFPワクチン区および対照区にそれぞれ3および9尾が死亡した。その後の初期死亡を除いた各区の死亡率はそれぞれ17および27%、RPSは38.9%と効果も低く、Fisherの直接確率計算法による検定でもp=0.22と有意差は認められなかった。これらの結果は、攻撃にグリセリンを使用すると供試魚に対する毒性が生じたと推察されることから、今回の攻撃手法では正確な評価ができなかったと考えられる。ただし、RPSは38.9%と弱い効果が示したことから、コラゲナーゼとSFPワクチンに効果があるかは再試験を行う必要があると考えられる。

※ 本報告は(財)松岡科学研究所による「平成28年度アユ冷水病ワクチンの開発に関する委託研究」の成果の一部であり、委託時に指定された手法により本ワクチンの効果の評価を行ったものである。