

Mg²⁺およびFe²⁺除去培地で培養した
Edwardsiella tarda ホルマリン死菌の免疫原性

金井 欣也^{*1}, 金丸 素久^{*1}, 塚原淳一郎^{*2},
一ノ瀬弘幸^{*3}, 佐々木英治^{*4}

Immunogenicity of formalin-killed cells of
Edwardsiella tarda grown in Mg²⁺ and Fe²⁺-deficient media

Kinya KANAI^{*1}, Motohisa KANEMARU^{*1}, Junichiro TSUKAHARA^{*2},
Hiroyuki ICHINOSE^{*3} and Hideharu SASAKI^{*4}

Edwardsiellosis causes serious damage to aquaculture industries of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and red sea bream, *Pagrus major*, in Japan. To date effective vaccines for this disease have not been developed. In this study efficacies of bacterins (formalin-killed cells) of *Edwardsiella tarda* grown in metal ion-deficient, Fe²⁺-deficient, Mg²⁺-deficient or H₂O₂-supplemented media were investigated in flounder in comparison with a control bacterin prepared from the bacterial cells grown in yeast extract medium by immersion-challenged with *E. tarda* after two weeks post-vaccination. As a result, although survival rates of all experimental groups at a month post-challenge were higher than that of the non-vaccinated group, none of the cultural conditions remarkably improved the efficacy of the control bacterin in respect of survival rate as well as carrier rate of survivors.

Key Words: *Edwardsiella tarda*, ホルマリン死菌 formalin-killed cells, 免疫原性 immunogenicity, ヒラメ Japanese flounder, ワクチン vaccine

グラム陰性菌 *Edwardsiella tarda* を原因菌とするエドワジエラ症は高水温期にヒラメやマダイなどの海水魚に発生し、その養殖に大きな被害を与えている。¹⁾ 本症は化膿性炎および肉芽腫性炎を特徴とし、病勢は比較的慢性的である。²⁾ 一旦流行が始まると、わずかな死亡が長期間続き、累積死亡率が30%を超えることもある。薬事法で承認された本症の治療薬はなく、たとえ本菌が感受性を示す薬剤を投与しても一時的に病勢を抑えるだけで完治させるのは困難であるといわれている。³⁾ 病巣ではマクロファージなどに貪食された *E. tarda* がその殺菌作用に抵抗して細胞内で増殖する様子が観察されている。²⁾

疾病の予防は防除対策として一義的に重要と考えられるが、本症の予防法は確立されていない。ワクチンは宿主の免疫機構を特異的に活性化して感染症に対する強い防御能を賦与することから、有効な感染症予防法としてヒトや動物で長年用いられてきた。魚類の感染症にもすでにいくつかのワクチンが使われているが、エドワジエラ症ワクチンはまだ開発さ

れていない。ホルマリンで不活化した *E. tarda* の菌体をワクチンとした実験では、ある程度の防御効果が認められるものの実用化には不十分なものであると報告されている。^{4, 5)}

ワクチンに含まれる抗原の中で宿主に免疫を賦与する抗原が感染防御抗原であり、ワクチンには十分な量の感染防御抗原が含まれている必要がある。また、菌体成分は培地や培養法によって変化するため、^{6, 7)} 感染防御抗原の産生の有無や産生量も変動すると考えられる。一方、生体内は体外環境に比べ鉄イオン濃度が低く、さらに細胞内はマグネシウムイオンの濃度も低いことが知られている。⁸⁾ また、好中球やマクロファージは過酸化水素を産生して貪食した細菌の殺菌を行う。これら鉄イオン欠乏、マグネシウムイオン欠乏および過酸化水素などがストレスとなって、病原菌は生存あるいは増殖のために新たな蛋白(ストレス蛋白)や病原性に関与する蛋白を産生する。^{9, 10)} したがって、培地で増殖した菌と生体内で増殖した菌の間にも種々の抗原および感染防御抗原の含有量に差があることが予想される。本研究ではこれらの

*1 長崎大学水産学部

*2 長崎県総合水産試験場

*3 三鷹製薬株式会社

*4 財団法人松岡科学研究所

点を考慮して鉄イオン欠乏, マグネシウムイオン欠乏および過酸化水素で刺激した菌体からホルマリン死菌を作り, それらのワクチンとしての効果を検討した。

材料および方法

供試魚

長崎県西彼杵郡高島町の種苗生産業者より購入したヒラメ稚魚を長崎県総合水産試験場に搬入後, 1,000 L パンライト水槽に収容し, ヒラメ用配合飼料 (ドライペレット, ヒガシマル) を与えて流水飼育した。実験開始時の魚体重は, 実験 1 ~ 3 においてそれぞれ 73.8 ± 17.5 g, 100.5 ± 22.7 g, 74.4 ± 17.0 g であった。

供試菌株および培養法

1986年に長崎県下の養殖場のヒラメ腸管より分離された *E. tarda* NUF251 を用いた。本菌株は当研究室で液体寒天を用いて凍結保存されており, 使用時に解凍して酵母エキス寒天 (0.5% 酵母エキス, 1% ポリペプトン, 0.5% NaCl, 1.5% 寒天, pH 7.2) に接種し, 27 °C で培養した。合成培地 (Table 1) はろ過滅菌して用いた。

Table 1. Composition of a semi-synthetic (agar) medium for *Edwardsiella tarda* used in this study

PIPES (Piperazine- <i>N,N'</i> -bis(2-ethanesulfonic acid))	5.12 g (0.05 M)
NH ₄ H ₂ PO ₄	5.75 g (0.05 M)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.5 mg (1 mM)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.8 mg (10 μM)
NaCl	5.0 g
Glucose	3.0 g
Bacto-casamino acid	1.0 g
Nicotinic acid	1.0 mg
Thiamin HCl	0.5 mg
(Agar	15.0 g)
Distilled water	1 L
pH 7.2	

試作ワクチンを作るための培養法を Table 2 に示した。合成培地培養: 酵母エキス寒天培養菌を合成寒天培地に接種し, 24時間後の発育コロニーを合成液体培地に接種した。24時間振とう培養後, 遠心分離で集菌し, 合成培地 (SSM), 金属イオン除去合成培地 (SSM-M), 金属イオン除去後鉄イオン添加合成培地 (SSM-Mg) あるいは金属イオン除去後マグネシウムイオン添加合成培地 (SSM-Fe) で1回遠心洗浄後, 各培地に懸濁し実験 1 および実験 3 では3時間 (それぞれSSM 3, SSM-M 3, SSM-Mg 3, SSM-Fe 3), 実験 2 では6時間 (それぞれSSM 6, SSM-M 6, SSM-Mg 6, SSM-Fe 6) 静置した。金属イオンの除去はマグネシウムおよび鉄塩を除いた合成培地をChelex 100 Resin (Bio-Rad Laboratories) カラムに通して行った。金属イオン除去後の鉄あるいはマグネシウム塩の添加量は合成培地に含ま

Table 2. *E. tarda* cells cultured under various condition for the preparation of formalin-inactivated bacterins

Exp.1 and 2	
Cells cultured in semi-synthetic medium (SSM) followed by incubating at 27°C for 3 h (Exp. 1) or 6 h (Exp. 2) in:	
①SSM (SSM 3 or 6)	
②Metal ion-deleted SSM (SSM-M 3 or 6)	
③Fe ²⁺ -supplemented SSM-M (SSM-Mg 3 or 6)	
④Mg ²⁺ -supplemented SSM-M (SSM-Fe 3 or 6)	
Cells cultured in yeast extract medium (YEM) followed by incubating at 27°C for 3 h (Exp. 1) or 6 h (Exp. 2) in:	
⑤YEM (YEM 3 or 6)	
Exp.3	
①SSM 3	
②SSM-M 3	
③SSM-Mg 3	
④SSM-Fe 3	
Cells cultured in YEM followed by incubating at 27°C for 2 h in:	
⑤YEM (YEM 2)	
⑥20 mM H ₂ O ₂ -supplemented YEM (H ₂ O ₂ -YEM 2)	

れる量とした。酵母エキス培地培養: 酵母エキス寒天24時間培養菌を酵母エキスブイオンに接種した。24時間振とう培養後, 酵母エキスブイオンで1回遠心洗浄し, 酵母エキスブイオンで3時間 (実験 1, YEM 3), 6時間 (実験 2, YEM 6) あるいは2時間 (実験 3, YEM 2), および20mM 過酸化水素添加酵母エキスブイオン (H₂O₂-YEM) で2時間静置した。

ホルマリン死菌 (FKC) の調製

各培地で処理した菌懸濁液に1/200量のホルマリン (和光純薬) を加えて室温で48時間静置した。遠心分離で集めた不活化菌を滅菌した0.01Mリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.2) で3回遠心洗浄し, 湿重量で100mg/mLの濃度になるように0.02% NaN₃ 加PBSに懸濁し, 冷蔵庫に保存した。

試作ワクチンの有効性試験

各FKCをPBSで10倍希釈して10mg/mLとし, 0.1mL/100g B.W.の割合でヒラメの腹腔内に接種した。対照区にはPBSを接種した。供試尾数は実験 1 が24尾, 実験 2 と 3 が20尾であった。接種後, フィンカットで標識して1,000 L 水槽に収容し, 流水飼育した。2週間後, 実験 1 では6つの200 L 水槽に各FKC接種魚を4尾ずつ, 実験 2 では各FKC接種魚が6つの200 L 水槽にできるだけ均等に分かれるように, 実験 3 では供試魚すべてを1,000 L 水槽1つに収容した。*E. tarda* NUF251の酵母エキスブイオン24時間振とう培養菌を供試魚が入った水槽に添加して15分間菌浴攻撃した。攻撃菌濃度は実験 1 が 4.0×10^7 CFU/mL, 実験 2 が 3.3×10^8 CFU/mL, 実験 3 が 2.5×10^8 CFU/mL であった。攻撃後約1ヶ月間死亡状況を観察し, 死亡魚については腎臓からの攻撃菌の再分離を試みた。また, 試験終了日にはすべての生残

魚を取り上げて同様に再分離を試みた。攻撃期間中の水温は、実験1～3それぞれ26.0～27.4，21.1～24.9，24.0～25.9であった。

結果および考察

各実験における攻撃後の死亡経過をFig. 1～3に、攻撃1ヵ月後の生残率、生残魚の保菌率および有効率 (Relative percent survival, RPS) をTable 3に示した。実験1と2はワクチンの有効性に及ぼす金属イオン除去培地と各培地による処理時間の影響を調べることを目的とし、それぞれ同年の8月および10月に同じ飼育群のヒラメを用いて行った。実験3は実験1の結果を再検証するとともに、過酸化水素添加の影響を調べることを目的に、翌年の9月に別の飼育群のヒラメを用いて行った。

実験1ではSSM-M 3処理FKC接種区の生残率が対照(非免疫)区に比べて有意に高かった ($P < 0.05$)。有効率も70.0%と比較的高い値を示した。一般に有効率が60%以上のワクチンが有効と認められるが、対照区の死亡率が60%以上であることが必要とされている。¹¹⁾ 本実験では対照区の死亡率が41.7%と低かったことから、有効率でワクチンの効果を論じることはできない。実験2では有効率が60%を超えたワクチンはなかったが、SSM-Mg 6処理FKC接種区の生残率が最も高く、保菌率も低かった。実験3では各ワクチン間に生残率の差はほとんどなかったが、 H_2O_2 -YEM 2処理FKC接種区の生残率および保菌率が比較的低かった。本研究では過酸化水素処理を20mMで2時間としたが、濃度や処理時間を変えた実験も行う必要があると思われる。

これまでのエドワジエラ症のワクチンに関する研究では主に普通培地あるいは酵母エキス培地で培養した*E. tarda*のFKCが使用されている。^{4,5)} 本研究では酵母エキス培地培養菌のFKCを対照ワクチンとして、各種金属除去培地処理および過酸化水素処理の効果を検討したが、その中に明確に有効性を高めるものはなかった。また、生残率は対照区に比べて高いものの、生残魚の保菌率は対照区と同程度かむしろ高いものが多かった。さらに、保菌魚のなかには発病しているものもあった(データ非提示)。これらの結果は従来の研究報告と大きな違いはない。^{4,5)} つまり、攻撃後の観察期間を延ばせば、免疫区の保菌魚が発病して死亡することにより対照区との生残率の差が次第に小さくなっていくと考えられる。鉄イオン欠乏やマグネシウムイオン欠乏がある種の細菌蛋白の発現を促すことが大腸菌や*Salmonella*を始め、多くの病原菌で知られている。^{12,13)} そのような蛋白には生体内での生存や病原性に関係するものが多いことから感染防御抗原となるものも含まれると考えられる。しかし、金属イオンによる*E. tarda*の蛋白の発現制御についてはほとんど調べられておらず、今回の金属イオン欠乏の処理条件が適切であったかどうかは不明である。さらに、金属イオン以外にも種々の環境因子が細菌の蛋白発現を制御することが知られており、¹⁰⁾ 今後は各環境因子の刺激によって発現する蛋白の解析および蛋白発現に及ぼす処理条件の検討を通してワクチンの試作を

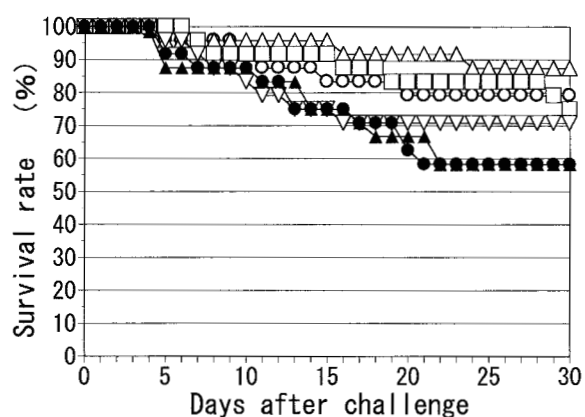


Fig. 1 Changes in survival rates of flounder immunized with various types of vaccine preparations after immersion-challenged with *E. tarda* (Exp.1). SSM 3, SSM-M 3, SSM-Mg 3, SSM-Fe 3, YEM 3, Control.

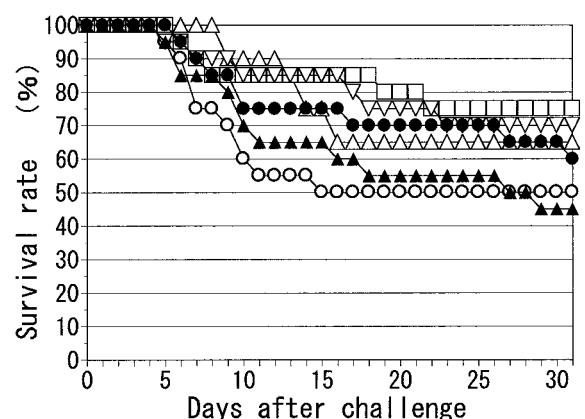


Fig. 2 Changes in survival rates of flounder immunized with various types of vaccine preparations after immersion-challenged with *E. tarda* (Exp.2). SSM 6, SSM-M 6, SSM-Mg 6, SSM-Fe 6, YEM 6, Control.

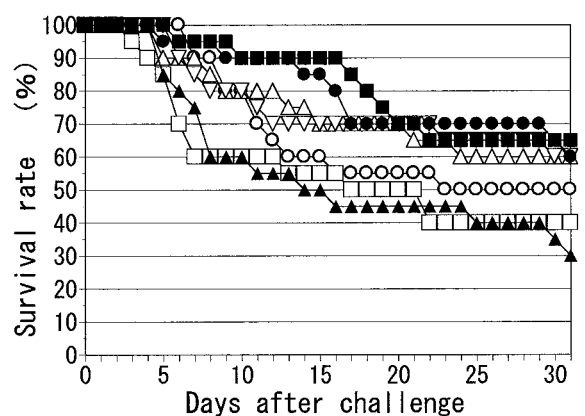


Fig. 3 Changes in survival rates of flounder immunized with various types of vaccine preparations after immersion-challenged with *E. tarda* (Exp.3). SSM 3, SSM-M 3, SSM-Mg 3, SSM-Fe 3, H_2O_2 -YEM 2, YEM 2, Control.

Table 3. Summary of the experimental results on the efficacy of various types of vaccine preparations against edwardsiellosis in Japanese flounder

Vaccine	Survival rate (%)	Carrier in survivors (%)	RPS * ¹ (%)
Exp.1			
SSM 3	79.2	52.6	50.1
SSM-M 3	87.5 * ²	57.1	70.0
SSM-Mg 3	75.0	55.6	40.0
SSM-Fe 3	70.8	41.2	30.0
YEM 3	58.3	57.1	0
Control	58.3	61.5	—
Exp.2			
SSM 6	50.0	40.0	9.1
SSM-M 6	65.0	38.5	36.4
SSM-Mg 6	75.0	7.7	54.5
SSM-Fe 6	70.0	35.7	45.5
YEM 6	60.0	25.0	27.3
Control	45.0	11.1	—
Exp.3			
SSM 3	50.0	90.0	28.6
SSM-M 3	60.0	75.0	42.9
SSM-Mg 3	40.0	87.5	14.3
SSM-Fe 3	60.0	75.0	42.9
H ₂ O ₂ -YEM 2	65.0	30.8	50.0
YEM 2	60.0	66.7	42.8
Control	30.0	16.7	—

*¹, RPS=(1 - percent vaccinate mortality/percent control mortality)×100

*², significantly different from the control($P < 0.05$).

試みる必要がある。また、同時にヒラメの*E. tarda*感染症における免疫防御メカニズムの解明などの基礎的研究を行うことも重要と思われる。

文 献

- 1) 金井欣也: ヒラメの細菌性疾病. 韓国魚病学会誌, **6**, 197-204 (1993).
- 2) T. Miyazaki and N. Kaige: Comparative histopathology of edwardsiellosis in fishes. Fish Pathol., **20**, 219-227 (1985).
- 3) 塩満捷夫, 松岡 学, 増村和彦, 反町 稔, 木島利通, 小関良二, 江草周三: エドワジエラ症. ヒラメの魚病, 日本水産資源保護協会, 東京, 24-26 (1989).
- 4) 金井欣也: ヒラメのエドワジエラ症に関する研究. 平成2年度魚病対策技術開発研究成果報告書(第1分冊), 日本水産資源保護協会, 東京, 1-19 (1991).
- 5) 馬久地隆幸, 清川智之, 本多数充, 中井敏博, 室賀清邦: ヒラメのエドワジエラ症に対する予防免疫の試み. 魚病研究, **30**, 251-256 (1995).
- 6) V. Bakopoulos, M. Pearson, D. Volpatti, L. Gousmani, A. Adams, M. Galeotti and G.J. Dimitriadis: Investigation of media formulations promoting differential antigen expression by *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* and recognition by sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), immune sera. J. Fish Dis., **26**, 1-13 (2003).
- 7) M.M. Moore and R.L. Thune: Evaluation of antigenic and nonantigenic proteins of *Edwardsiella ictaluri* at two temperatures and in enriched and minimal media using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. J. Aquat. Anim. Health, **11**, 262-274 (1999).
- 8) F.G. Portillo, J.W. Foster, M.E. Maguire and B.B. Finlay: Characterization of the micro-environment of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles within MDCK epithelial cells. Mol. Microbiol., **6**, 3289-3297 (1992).
- 9) R.W. Morgan, M.F. Christman, F.S. Jacobson, G. Storz and B.N. Ames: Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 8059-8063 (1986).
- 10) J.J. Mekalanos: Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. J. Bacteriol., **174**, 1-7 (1992).
- 11) D.F. Amend: Potency testing of fish vaccines. Dev. Biol. Standard., **49**, 447-454 (1981).
- 12) L. Escolar, J. Perez-Martin and V. de Lorenzo: Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. J. Bacteriol., **181**, 6223-6229 (1999).
- 13) S. Lejona, A. Aguirre, M.L. Cabeza, E.G. Vescovi and F.C. Soncini: Molecular characterization of the Mg²⁺-responsive PhoP-PhoQ regulon in *Salmonella enterica*. J. Bacteriol., **185**, 6287-6294 (2003).