

実験感染によるヒラメのレンサ球菌症・エドワジエラ症 混合ワクチンの有効性試験

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

Efficacy of a divalent vaccine preparation for streptococcosis and edwardsiellosis of Japanese flounder in experimental mixed infection

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

Streptococcosis and edwardsiellosis are the major causes of damage in aquaculture industries of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, in Japan. To develop a divalent vaccine for these infections efficacy of a mixture of formalin-killed cells of *Streptococcus iniae* and *Edwardsiella tarda* was evaluated after two weeks post-vaccination in experimental sole and mixed infections, namely, challenge solely with *S. iniae* (S) or *E. tarda* (E), challenge with *S. iniae* followed by challenge with *E. tarda* at a two-day interval (S-E), challenge with a mixture of *S. iniae* and *E. tarda* (S-E) and challenge with *E. tarda* followed by challenge with *S. iniae* at a two-day interval (E-S). Survival rates of vaccinated groups challenged by above methods were significantly higher than those of non-vaccinated groups ($P < 0.01$). Relative percent survival values of the S-challenged, E-challenged, S-E-challenged, S-E-challenged and E-S-challenged groups were 94.7 %, 68.8 %, 84.2 %, 52.9 % and 72.2 %, respectively.

Key Words: *Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda*, ホルマリン死菌 formalin-killed cells, 免疫原性 immunogenicity, ヒラメ Japanese flounder, 二価ワクチン divalent vaccine

レンサ球菌症とエドワジエラ症はヒラメ養殖が普及し始めた1980年頃から西日本の養殖場を中心に発生しており、養成中のヒラメにしばしば大きな被害を与えている。¹⁾ 両疾病は高水温期に流行しやすく混合感染も多い。レンサ球菌症の治療にはテトラサイクリン系の抗生物質が使用され効果をあげているが、エドワジエラ症には承認された治療薬がなく、対策に苦慮しているのが現状である。ワクチン接種は感染症の予防対策として有力な手段であり、魚病においてもワクチンの開発が進められている。²⁾ ヒラメで実用化されたワクチンはないが、レンサ球菌症およびエドワジエラ症ワクチンの開発が求められている。

複数のワクチンを混合して多価ワクチンとして使用することは作業性および被接種者への負担を少なくすることからしばしば行われる方法である。しかし、混合して用いることで個々のワクチンの効果が低下したり、逆に相乗的に効果が高まることも考えられる。本研究ではレンサ球菌症とエドワジエラ症の混合ワクチンを試作し、実験感染におけるその予防効果を検討した。

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。実験開始時の平均魚体重は 79.9 ± 14.4 gであった。

供試菌株および培養法

1992年に熊本県下の養殖場のヒラメ病魚より分離されたレンサ球菌症の原因菌 *Streptococcus iniae* NUF631 および1986年に長崎県下の養殖場のヒラメ腸管より分離されたエドワジエラ症の原因菌 *Edwardsiella tarda* NUF251 を用いた。これらの菌株は当研究室で液体窒素を用いて凍結保存されており、使用時に解凍して *S. iniae* はトッドヒューイット (TH, Difco Laboratories) 寒天, *E. tarda* は酵母エキス寒天 (0.5%酵母エキス, 1%ポリペプトン, 0.5%NaCl, 1.5

*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

%寒天, pH7.2) に接種し, 両菌株とも27 で培養した。

ホルマリン死菌 (FKC) の調製

S. iniae NUF631および*E. tarda* NUF251の新鮮培養菌をそれぞれTHブイオンおよび酵母エキスブイオンに接種した。27 で24時間振とう培養後, 各培養菌液に1/200量のホルマリン (和光純薬) を加えて室温に48時間静置して殺菌した。遠心分離で集めたFKCを滅菌0.01Mリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.2) で3回遠心洗浄し, ホルマリン添加前に測定した生菌数をもとに, それぞれ 2×10^{10} CFU/mLの濃度になるように0.02% NaN₃ 加PBSに懸濁し, 冷蔵庫で保存した。

試作ワクチンの有効性試験

使用時に各FKC懸濁液を等量混合し, 0.1mL/100 g 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。供試尾数は免疫区および対照区それぞれ100尾とした。接種後, フィンカットで標識して1,000 L水槽に收容し, 流水飼育した。2週間後, 5つの200 L水槽に免疫魚および対照魚をそれぞれ20尾ずつ收容し, *S. iniae* NUF631のTHブイオン24時間振とう培養菌あるいは*E. tarda* NUF251の酵母エキスブイオン24時間振とう培養菌を水槽に添加して15分間菌浴攻撃した。攻撃方法はそれぞれ, *S. iniae*攻撃, *S. iniae*攻撃2日後に*E. tarda*攻撃 (S E攻撃), *S. iniae*と*E. tarda*同時攻撃 (S・E攻撃), *E. tarda*攻撃2日後に*S. iniae*攻撃 (E S攻撃), *E. tarda*攻撃, とした。攻撃菌濃度は*S. iniae*が 10^7 CFU/mL, *E. tarda*が 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。*S. iniae*の再分離にはCSOA寒天,³⁾ *E. tarda*の再分離にはSS寒天を用いた。免疫期間および攻撃期間中の水温は, それぞれ25.5~27.0 および25.2~28.8 であった。

有意差検定

免疫区と対照区の生残率の有意差検定にはFisherの直接確率計算法を用いた。

結果および考察

各攻撃法における死亡経過をFig. 1~5に, 死亡魚からの攻撃菌の再分離状況をFig. 6に示した。また, 観察終了時の生残尾数と生残魚の保菌状況をTable 1に示した。

*S. iniae*の単独攻撃に対しては免疫区と対照区の生残率の差が顕著であり, 有効率 (RPS)* も94.7%と非常に高かった。*S. iniae* FKC単独ワクチンの有効性試験でも高い効果が得られているが (金井, 未発表), *E. tarda* FKCと混合しても*S. iniae*に対する免疫効果は低下しないと考えられる。*E. tarda*の単独攻撃でも免疫区の生残率は対照区に比べて高く ($P < 0.001$), またその値が60%以上であるとそのワクチンが有効と

認められる有効率⁶⁾も68.8%と比較的高かった。前報⁴⁾で, 本研究とほぼ同じ方法で作製された*E. tarda* FKCによる単独ワクチンの有効性試験ではあまりよい結果は得られていない。本研究で*E. tarda*の攻撃に対して混合ワクチンが有効であった理由として*S. iniae* FKCを混合したことが考えられるが, この点はさらに実験を繰り返して確認する必要がある。

*S. iniae*と*E. tarda*の混合感染を想定した多重攻撃では, 攻撃の順序を変えたいずれの攻撃法も免疫区の生残率が対照区に比べて有意に高かった ($P < 0.01$)。また, 免疫区の死亡原因の大部分が*E. tarda*単独によるものだったことから, 混合感染においても*S. iniae*に対する高い免疫効果が確認された (Fig. 6)。なお, 有意な差ではなかったものの, 免疫区の死亡経過に攻撃の順序による若干の違いがみられ, 最終的な生残率はS E攻撃が最も高く, 続いてE S攻撃, S・E攻撃の順であった。また, 有効率はそれぞれ84.2%, 72.2

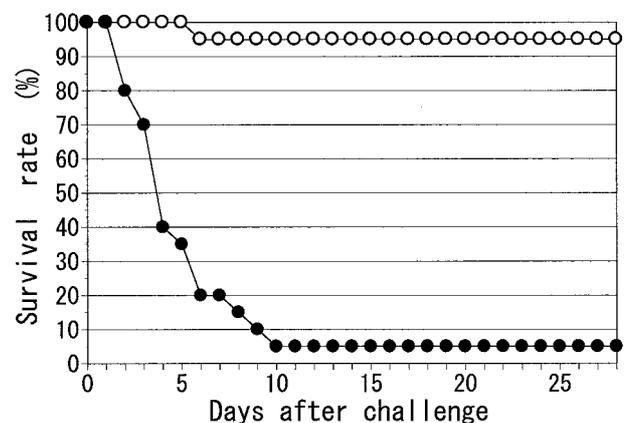


Fig. 1 Change in survival rate of flounder immunized with a *S. iniae*-*E. tarda* divalent vaccine preparation after immersion-challenged with *S. iniae*. , vaccinated; , non-vaccinated.

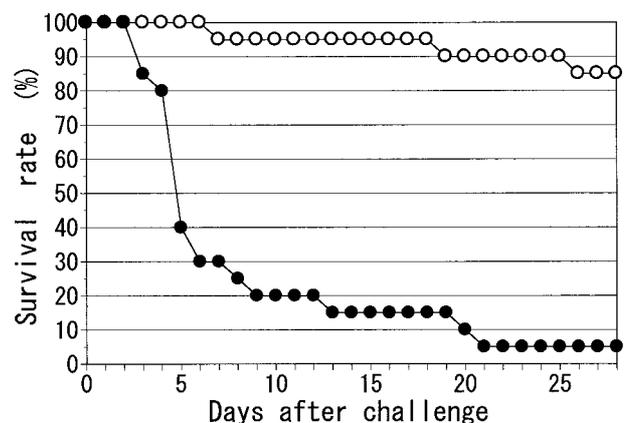


Fig. 2 Change in survival rate of flounder immunized with a *S. iniae*-*E. tarda* divalent vaccine preparation after immersion-challenged with *S. iniae* followed by immersion-challenged with *E. tarda* at a two-day interval. , vaccinated; , non-vaccinated.

* RPS = (1 - 免疫区の死亡率/対照区の死亡率) × 100

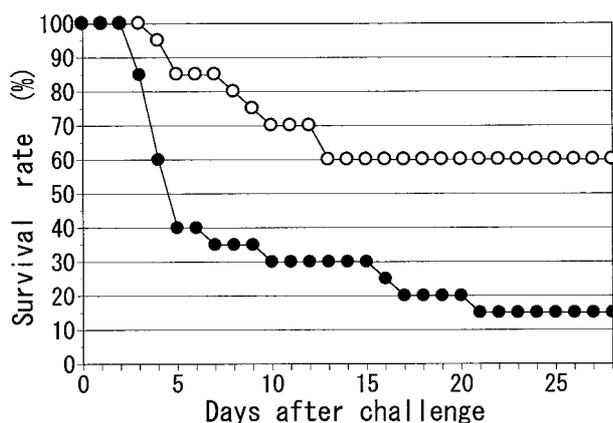


Fig. 3 Change in survival rate of flounder immunized with a *S. iniae*-*E. tarda* divalent vaccine preparation after immersion-challenged with a mixture of *S. iniae* and *E. tarda*. \circ , vaccinated; \bullet , non-vaccinated.

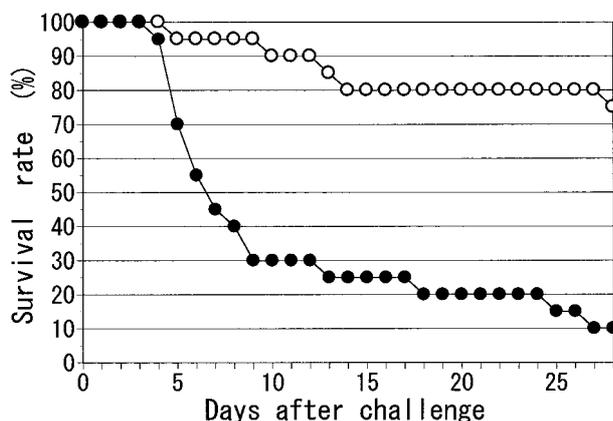


Fig. 4 Change in survival rate of flounder immunized with a *S. iniae*-*E. tarda* divalent vaccine preparation after immersion-challenged with *E. tarda* followed by immersion-challenged with *S. iniae* at a two-day interval. \circ , vaccinated; \bullet , non-vaccinated.

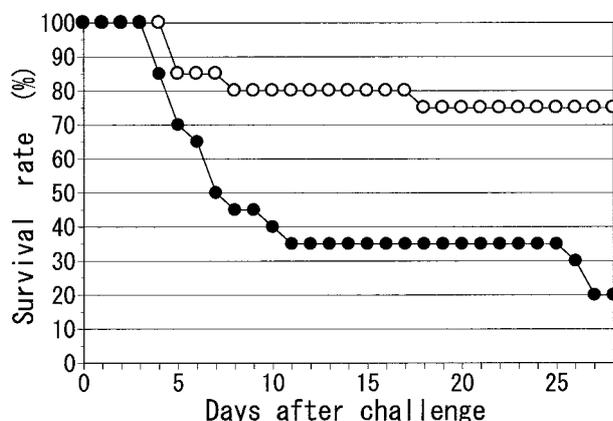


Fig. 5 Change in survival rate of flounder immunized with a *S. iniae*-*E. tarda* divalent vaccine preparation after immersion-challenged with *E. tarda*. \circ , vaccinated; \bullet , non-vaccinated.

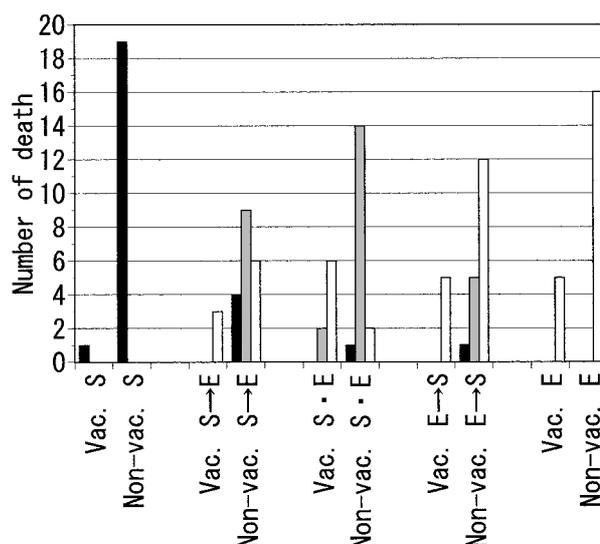


Fig. 6 Reisolation of bacteria from the kidney of dead vaccinated and non-vaccinated flounder. CSOA agar³⁾ and SS agar were used for the isolation of *S. iniae* and *E. tarda*, respectively. \bullet , isolation of *S. iniae*; \circ , isolation of both *S. iniae* and *E. tarda*; \square , isolation of *E. tarda*; S, challenged with *S. iniae*; S-E, challenged with *S. iniae* followed by challenged with *E. tarda*; S-E, challenged with a mixture of *S. iniae* and *E. tarda*; E-S, challenged with *E. tarda* followed by challenged with *S. iniae*; E, challenged with *E. tarda*

%, 52.9%であった。前報⁵⁾で、*S. iniae* FKcで免疫したヒラメを*S. iniae*で攻撃するとマクロファージが活性化して感染防御能が高まることを報告した。本研究でS-E攻撃の生残率が高かった理由として、*S. iniae*攻撃によって活性化したマクロファージが、*S. iniae*だけでなくその後感染した*E. tarda*の排除にも働いた可能性が考えられる。

免疫区の生残魚の*E. tarda*保菌率は前報⁴⁾と同様に比較的高かった (Table 1)。したがって、保菌した生残魚が発

Table 1. Carrier rate of survived flounder at the end of the experiment

Experimental Group	No. of survivor (survival rate)	No. of carrier (carrier rate)	
		<i>S. iniae</i>	<i>E. tarda</i>
Vaccinated			
S-challenged	19 (95%)	5 (26%)	—
S→E-challenged	17 (85%)	0 (0%)	8 (47%)
S-E-challenged	12 (60%)	0 (0%)	8 (67%)
E→S-challenged	15 (75%)	0 (0%)	3 (20%)
E-challenged	15 (75%)	—	4 (27%)
Non-vaccinated			
S-challenged	1 (5%)	0 (0%)	—
S→E-challenged	1 (5%)	0 (0%)	1 (100%)
S-E-challenged	3 (15%)	0 (0%)	2 (67%)
E→S-challenged	2 (10%)	1 (50%)	0 (0%)
E-challenged	4 (20%)	—	2 (50%)

病する,あるいは感染源になる可能性があることから,ワクチンの効果としては十分とはいえない。⁷⁾ 生残魚の保菌率が高かった理由としては*E. tarda*のマクロファージ内における高い生存能が考えられる。混合ワクチンの実用化のためにはマクロファージの殺菌能を高めるような*E. tarda*ワクチンの開発が必要と思われる。

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) 岡本信明, 中西照幸, 飯田貴次: シンポジウム「我が国における魚類ワクチン開発の現状」. 魚病研究, **36**, 103-114 (2001).
- 3) H.T. Nguyen and K. Kanai: Selective agars for the isolation of *Streptococcus iniae* from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and its cultural environment. J. Appl. Microbiol., **86**, 769-776 (1999).
- 4) 金井欣也, 金丸素久, 塚原淳一郎, 一ノ瀬弘幸, 佐々木英治: 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. 長大水研報, **85**, 31-34 (2004).
- 5) 角田紀子, 金井欣也, 塚原淳一郎, 一ノ瀬弘幸, 佐々木英治: *Streptococcus iniae*のホルマリン死菌で免疫したヒラメの感染防御メカニズムに関する研究. 長大水研報, **85**, 21-29 (2004).
- 6) D.F. Amend: Potency testing of fish vaccines. Dev. Biol. Standard., **49**, 447-454 (1981).
- 7) 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).