

# ブリ類結節症ワクチン開発研究

## *P. piscicida* 菌体外産物 (ECP) の有効性

沢田健蔵・杉本善彦

*P. piscicida* 菌体外産物(ECP)には毒性があり,ワクチン濃度をあげることは困難である。そのため,低濃度から段階的に濃度をあげることでECPに対する抵抗性を付与し,投与濃度をあげることが可能か検討した(実験1)。また,免疫原性を失わずに毒性を無くするトキシド化についても検討した(実験2)。

### 材料および方法

使用したECPは,*P. piscicida* HT95014株をBHI液体培地で25℃,72時間培養した後,培養液を50%硫酸で塩析,再度1/100M PBSに懸濁後Sephacryl S-200を充填した30×1000mm(ベッド長約75mm)のカラムを用い,1/100M PBSを流出液として毎時約30mlの流量でゲル濾過を行った。開始後3時間後から15分間の間隔で各フラクションを採取し,ブリ稚魚に対して毒性の見られるピークのフラクション15付近の流出液を0.45μのメンブランフィルターを通した後凍結保存し毒性試験に用いた。流出パターンを図1に示した。

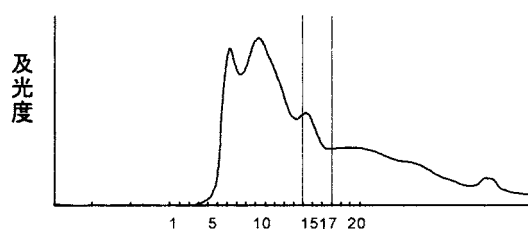


図1 流出パターン

各フラクションの毒性試験は平均体重18gのブリ稚魚に0.05ml/尾接種し,死亡状況を観察した。各フラクションの毒性試験結果は次の表1のとおりであった。最も毒性が強くなる分画(フラクションNo15~17)を混合したものをECP原液とし少量ずつ分注し試験に使用するまで凍結保存した。

表 1 毒性試験結果

フラクションNo	13	14	15	16	17	18	19
死亡率(%)	60	90	100	100	100	100	30

実験 1

表 2 に試験区を示した。1 回目の接種は、ECP 原液を PBS で 100 倍に希釈して平均体重 28g プリ稚魚 1 尾当たり 0.05ml を腹腔内接種し、30 尾ずつ 2 槽に收容した。2 回目及び 3 回目の接種は、1 回目接種から 1 週間後及び 3 週間後、生残魚を取り上げ ECP 原液を 10 倍に希釈して同量、腹腔内接種し元の水槽に戻し、飼育中の死亡状況を観察した。対照区では ECP のかわりに PBS を接種した。3 回目の接種時には新たに平均 30g のプリ稚魚に 10 倍希釈の ECP を接種し、毒性の対照とした。

3 回目の接種から 2 週間後、生残魚に対して免疫の成立を見るために  $1.7 \times 10^4$  及び  $10^5$  CFU/ml の菌濃度の *P. piscicida* で浸漬攻撃を行い死亡状況を観察した。

表 2 ECP 接種時期と濃度

区	1	2	3	4	5
回 (経過週)	ワクチン区 ECP希釈		対照区	毒性対照 ECP希釈	
1	(0)	1/100	PBS		
2	(1)	1/10	PBS		
3	(3)	1/10	PBS		1/10

実験 2

トキソイド化 ECP 原液に 0.5%ホルマリン、0.1M リジン添加 (最終濃度) 20 24 時間静置 その後、PBS で透析 5 で保存した。使用前に中和処理の ECP と同じ希釈率となるよう PBS を加えて調整した。

中和 ECP 実験 1 の実験感染後 2 週間の観察期間終了後ワクチン区の低濃度攻撃区生残魚から血清を採取し、A9 20 分非動化後、10 倍に希釈した血清に等量の ECP 原液を加え 20 に 1 時間反応させた。この生残魚から得られた血清には ECP に対してゲル内沈降反応で沈降線が認められるもの (血清 A) と沈降線が認められないもの (血清 B) の 2 種類が存在したため両者の比較を行った。場内で飼育していた類結節症未感染プリ稚魚血清 (対照血清) を同様の処理をして対照とした。血清のかわりに PBS を用いて同様な処理を行った ECP を中和処理の対照とした。

表 3 の試験区に示したように、平均体重 45g のプリ稚魚を各区 20 尾ずつ供試し、各 ECP を腹腔内接種して、2 週間死亡状況を観察した。その後、1、2、4 及び 5 区の生残魚に対して  $1.2 \times 10^4$  CFU/ml の菌濃度の *P. piscicida* で浸漬攻撃を行い死亡状況を観察した。

表3 計数区

試験区	ECP種類	接種量
1	トキシイド ECP	
2	対照(PBS接種)	
3	PBS処理ECP	0.05ml/尾
4	中和 ECP (血清A)	
5	中和 ECP (血清B)	
6	中和 ECP (対照血清)	

結 果

実験 1

表 4 に各濃度の ECP 接種後の死亡状況を示した。1 回目の 100 倍希釈 ECP では死亡が見られなかったが 2 回目の 10 倍希釈 ECP の接種後ワクチン区の 1 区で 10 尾, 2 区で 4 尾の死亡が見られた。粘液胞子虫が原因の側彎症の発生があり 3 回目の接種時に除去した。3 回目の 10 倍希釈 ECP の接種後, 毒性対照区で 70%の死亡が見られたにもかかわらずワクチン区の 2 区において 1 尾が死亡しただけで ECP の毒性に対する抵抗性が増した。

実験感染結果を図 1 に示した。対照区では低濃度攻撃区においても 4 日目までに全数が死亡する強い攻撃であったにもかかわらず ECP ワクチン区では 67%が生残した。

表 4 各濃度の ECP 接種後の死亡状況

回		ワクチン区		対照区	毒性対照区	
		1	2	3	4	5
1	処理尾数	30	30	30	30	
	死亡尾数	0	0	0	1	
	死亡率(%)	0	0	0	3.3	
2	処理尾数	30	30	30	30	
	死亡尾数	10	4	1	0	
	死亡率(%)	33.3	13.3	3.3	0	
	変形魚除去*	2	1	2	2	
3	処理尾数	18	25	27	27	10
	死亡尾数	0	1	0	0	7
	死亡率(%)	0.0	4.0	0	0	70.0
計	死亡率(%)	35.7	17.2	3.6	3.6	

\* 粘液胞子虫による側彎症

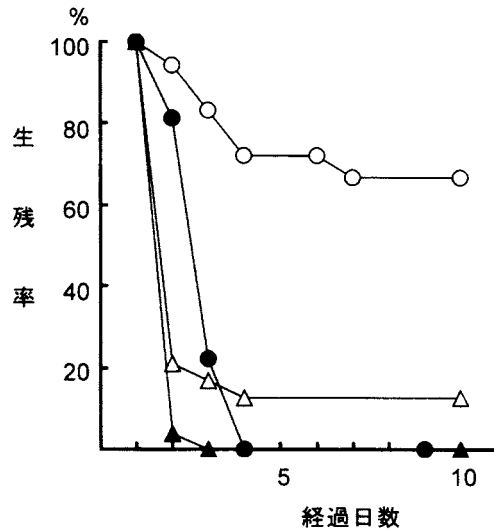


図1 ECP ワクチンの有効性判定結果

: ECP ワクチン区 (1 区)  $1.7 \times 10^4$  攻撃

: 対照区 (3 区) "

: ECP ワクチン区 (2 区)  $1.7 \times 10^5$  攻撃

: 対照区 (4 区) "

## 実験 2

図 2 に各種 ECP の接種後の死亡状況を示した。無処理 ECP では 80% が死亡したがトキシイド化処理をした ECP では 10% にとどまった。血清で中和した ECP では類結節症非感染の対照血清においても死亡率は 40% となり ECP の毒性を中和する作用が見られ、類結節症感染耐過魚の血清では死亡率は 20% 及び 10% となり対照血清よりも死亡率は低下し、中和作用が見られた。

死亡状況観察終了後、実験感染により類結節症に対する防御効果を見た結果を図 3 に示したが、PBS を接種した対照区での 10% の生残率に対し、トキシイド化処理をした ECP 接種区では 67%、類結節症感染耐過魚の血清による中和 ECP 区では 44% 及び 47% と防御効果が見られた。しかしながら、ECP に対する沈降線の有無による差は見られなかった。

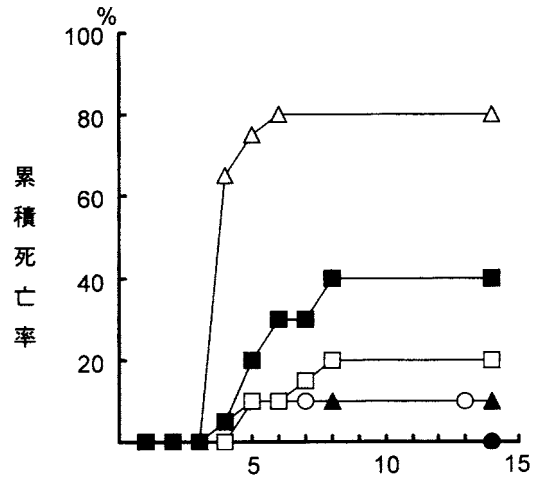


図2 各種 ECP 接種後の死亡状況

: トキシイド ECP      : 対照 (PBS 接種)  
 : 無処理 ECP      : 中和 ECP (血清 A)  
 : 中和 ECP (血清 B)      : 中和 ECP (対照血清)

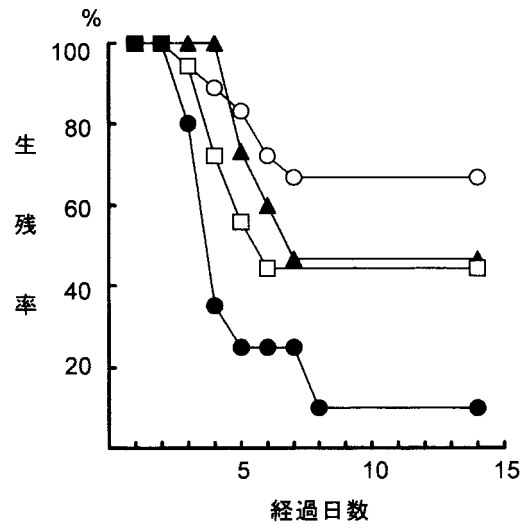


図3 トキシイド及び中和 ECP ワクチンの有効性判定結果

: トキシイド ECP      : 対照 (PBS 接種)  
 : 中和 ECP (血清 A)      : 中和 ECP (血清 B)

### 考 察

実験 1 では、ECP の毒性の低減方法として、免疫による中和抗体の可能性について検討を行ったが、初回接種から 1 週間後ではその効果は弱かったものの 3 週間後には ECP に対する十分な抵抗性が付与されているとともに *P.pisscicida* の浸漬法による実験感染においても強い防御効果が得られた。このことか

ら、ECP 濃度、接種間隔等を検討することで ECP の毒性を低減させ、強い免疫を付与させることが可能と考えられる。ECP を接種した実験感染耐過魚の血清の ECP の毒性の中和能力を見た実験 2 では類結節症非感染の血清に比べ ECP の毒性を中和する能力が高い傾向が見られ中和抗体の存在の可能性が示唆された。

実験 2 では ECP のトキシド化についても検討を行い実験感染の結果から有効な結果が得られたが、以前に行った ECP ワクチンの結果では、ECP 接種後 2.5%の死亡率を示した実験において、その後の実験感染によって対照区 10%の生残率、ECP 区では 55%の生残率が得られており（平成 6 年度海産魚ワクチン研究部会 提出資料）、今回の結果は、実験感染での生残率が高かったもののほぼ同様な結果となっており、トキシド化処理により変性を受けなかった ECP の効果である可能性があり、さらに、トキシド化の方法等について検討する必要がある。