ニジマスの β -溶血性連鎖球菌症に 対する浸漬ワクチンの有効性

酒井正博・厚田静男・小林正典

(北里大学水産学部)

魚類における β -溶血性連鎖球菌症は、ニジマス、アユ、ティラピア等の淡水魚における重要な疾病として知られている¹⁾。さらに最近では、ハマチ、ヒラメ²⁾、クロソイ³⁾といった海産魚にまで広がっている。本病に対する治療には、エリスロマイシン等の抗生物質が用いられているが、食品衛生の立場から使用を最小限に留められなければならない。本病のワクチンに関する研究は、すでに我々がニジマスを用いて、注射および浸漬法の可能性について報告している⁴⁾。しかし本ワクチンを実用化するためには、まだまだ検討しなければならない問題が残されている。そこで今回、より有効な浸漬ワクチンを開発するために、ワクチンとして有効な抗原とその持続性について検討を行った。

材料および方法

1. 供試菌株および供試魚

1980年に宮崎県のニジマスより分離した β -溶血性の連鎖球菌である *Streptococcus* sp. SG 8004 を、ワクチンの調製および攻撃に使用した。供試魚には、岩手県内水面水産指導所より分与された平均体重 15 g のニジマスを用いた。

2. ワクチンの調製

供試菌を BHI ブイヨン (白水) で 48 時間振とう培養した後、0.3% になるようにホルマリンを添加し、4°C で 48 時間不活化した。これを 4 つに分け (1) このホルマリン不活化培養をそのままワクチンとする培養不活化ワクチン (2) ホルマリン不活化培養を 0.45 μ m のフィルターに懸け菌体を除去した培養上清ワクチン (3) ホルマリン不活化培養を遠心分離 (4,000 回転, 15 分間) して菌体を集め、これを生理食塩水に浮遊させた菌体ワクチン (4) この菌体ワクチンにガラスビーズを加えて 2 時間振とうし、菌体を破壊した破壊菌体ワクチンの 4 種類のワクチンを作製した。

3. ワクチンの投与方法

各ワクチンを養魚用水で約 5 倍に希釈 (培養上清ワクチンは 2 倍) し、このワクチン希釈液にニジマスを 3 分間浸漬した。このときの培養不活化ワクチンの菌数は約

1×10^7 CFU/ml、菌体ワクチンおよび破壊菌体ワクチンにおいては、約 1×10^8 CFU/ml であった。コントロール区では魚を生理食塩水に 3 分間浸漬した。ワクチン投与魚およびコントロール魚は、攻撃実験が行われるまで水温 16°C で市販のペレットを与えて飼育した。

4. 攻撃方法および有効性の判定

ワクチン投与後、20 日目と 60 日目に SAKAI ら⁴⁾ による腹腔内接種法で攻撃試験を行った。攻撃後、10 日間魚を観察し、へい死魚の腎臓から菌分離を行い、攻撃菌が分離された魚をレンサ球菌によるへい死と判定した。ワクチンの有効性については、AMEND⁵⁾ による RPS (有効率) を求め、有効率が 60 以上を示したワクチン群を有効とした。

5. 血中凝集素価の測定法

ワクチン浸漬後、20 日目に各群 5 尾から採血し、マイクロタイター法により凝集素価を測定した。

結果及び考察

ワクチン投与後、20 日目に行った攻撃実験の結果を表 1 に示した。培養不活化ワクチン区におけるへい死率は 28% で有効率は 72、破壊菌体ワクチン区におけるへい死率は 20% で有効率は 75 であった。菌体ワクチン区においては 1 尾のへい死も見られず、有効率は 100 であった。しかし、培養上清ワクチン区においては、84% のへい死を示し、有効率も 16 と、有効性は認められなかった。なおコントロール区においては、攻撃後 6 日以内にすべての魚がへい死した。なおこれらの区における攻撃菌量は、1 尾当たり 6.7×10^7 CFU であった。

ワクチン投与後 60 日目に攻撃実験を行った結果、菌体ワクチン区および破壊菌体ワクチン区においては、表 1 に示すように高い有効性が認められた。しかし、培養不活化ワクチン区および培養上清ワクチン区においては、それぞれ有効率は 25 および 0 と有効性は認められなかった。なおこの時の攻撃菌量は、1 尾当たり 6.7×10^7 CFU であった。

本研究においてホルマリン不活化菌体ワクチンあるいはガラスビーズ破壊菌体ワクチンに浸漬したニジマスは、感染実験によって有効な防御免疫を獲得することが示された。さらにこの防御免疫は、少なくともワクチン投与後、60 日目までは十分に持続することが明らかとなった。しかし、培養上清ワクチン魚には防御能が認められなかった。このことから β -溶血性連鎖球菌症の浸漬ワクチンの抗原としては、培養液中に放出される産物よりも、菌体自身が有効であると考えられる。我々は、す

表 1 各種浸漬ワクチンを投与したニジマスにおける攻撃実験後のへい死尾数と有効率

ワクチン後の日数	ワクチン	供試尾数	へい死尾数	へい死率(%)	有効率
20	培養不活化	25	7	28	72
	培養上清	25	21	84	16
	菌体	25	0	0	100
	破壊菌体	25	5	20	75
	コントロール	25	25	100	—
60	培養不活化	20	15	75	25
	培養上清	20	20	100	0
	菌体	20	1	5	95
	破壊菌体	20	1	5	95
	コントロール	20	20	100	—

で培養不活化ワクチン浸漬法の有効性について報告している。今回の実験においては、このワクチン区も有効性が認められたが、その効力は長期間持続しなかった。その原因として浸漬液中の塩分濃度や菌量の差などが考えられるがさらに詳しく検討する必要がある。

浸漬ワクチンの効力の持続性については、JOHNSONら⁶⁾が *Vibrio anguillarum* と *Yersinia ruckeri* を用いて 1 g サイズの魚で 120 日、2 g サイズで 180 日、4 g サイズで 1 年以上防御能が保持されることを報告している。本研究においては、60 日間しか検討しなかったが、それ以降も防御能の持続することは明らかであり、さらに追跡する必要がある。

本研究においては、いずれのワクチン区においてもマイクロタイター法で検出される範囲の血中凝集素価は測定されなかった。同じような例は、すでにビブリオ病の

場合についても報告されている。従って、連鎖球菌症の浸漬ワクチンにおいても他の浸漬ワクチンと同様、血中凝集抗体以外の免疫応答が防御能に関与していると考えられる。

文 献

- 1) KITAO, T., AOKI and R. SAKOH (1981): *Fish Pathology*, **15**, 301-307.
- 2) 中津川俊雄 (1983): 魚病研究, **17**, 281-285.
- 3) 酒井正博・厚田静男・小林正典 (1986): 水産増殖, **34**, 171-177.
- 4) SAKAI, M., R. KUBOTA, S. ATSUTA and M. KOBAYASHI (1987): *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 1373-1376.
- 5) AMEND, D. F. (1981): *Develop. Bio. Standard.*, **49**, 447-454.
- 6) JOHNSON, K. A., J. K. FLYNN and D. F. AMEND (1982): *J. Fish Diseases*, **5**, 207-213.

(昭和 63 年 4 月 28 日受付)