Vibrio anguillarum に対するウナギの免疫反応—II.

経口免疫の可能性について

室賀 清 邦・江 草 周 三*

(昭和 44 年 7 月 1 日受理)

筆者らは、マーゾニン処理をした *Vibrio anguillarum* をウナギに筋肉注射すると顕著な凝集素抗体の産生が見られること、その速度は水温に大きく影響されることをすでに明らかにした¹⁾。

免疫反応を疾病予防に利用しようという養魚の実際的な面を考える場合、経口免疫が有効であるか否かということが重要な問題となってくる。そこでよく餌付けされたウナギを用いて、実験水槽レベルでの経口免疫の可能性を調べてみた。

材料および方法

抗 原

前報と同様に *Vibrio anguillarum* strain PB-15 を用い抗原を調製した。普通寒天培地 (NaCl 3%) で 28°C, 48 時間培養した菌を滅菌食塩水 (0.85% NaCl 溶液) に 1 mg (菌体湿重量)/1 ml の割合に懸濁させ生菌抗原液とした。この生菌抗原液は毎日の投餌の直前に用意した。死菌抗原液は生菌抗原と同じ培養の菌を 0.01% マーゾニン溶液に 10 mg/1 ml の割合に懸濁させ、冷蔵庫中に保存した。死菌抗原液は 1 カ月に 1 回調製した。0.01% マーゾニン溶液に懸濁させた菌は 1 日後には完全に死滅していることを確認した。なお実験の前に本菌をウナギに接種し、瀕死魚より再分離することにより毒性を高めて使用した。

生菌抗原液、滅菌食塩水を用いて 10 倍に稀釈した死菌抗原液、および対照区のための 0.001% マーゾニン溶液、水道水 (脱塩素処理をしたもの) とを用いてウナギ用配合餌料 (日清製粉製粉餌) をねり合わせ 4 種の餌を毎日用意した。粉餌 1 に対し抗原液、マーゾニン溶液、または水道水を 1.5 (重量: 容量) の割合に混ぜたので、実験区用の 2.5 g (湿重量) の餌に 1.5 mg の生菌もしくは死菌が含まれていたことになる。なお、配合餌料中には抗生物質、フラン系薬剤などの抗菌物質は含まれていなかった。

実験材料魚および抗原投与方法

実験に使用したウナギは 1967 年冬から 1968 年初春にかけてシラスウナギとして採捕し、最初は生餌で餌付けし、その後配合餌料で飼育した体重 (実験開始時) 5~50 g の小ウナギである。なお、実験開始時および実験期間中にも摂餌への影響を考え、採血し凝集価を測定する魚以外の実験魚の体重は測定しなかった。これらの材料魚を 2 m×1 m (水深 15 cm) のコンクリート水槽 4 つに 50 尾ずつ収容し、I~IV 区とした。I 区は死菌投与区、II 区は生菌投与区、III 区はマーゾニン区、IV 区は水道水区とした。それぞれの区に前述のようにして準備した餌を原則として毎日 1 回投与した。投餌量は投餌直後 (30 分以内) に完全に食べてしまうような量を与え、食べ残しのないように注意した。投餌は 1969 年 1 月 31 日から 6 月 3 日まで約 4 カ月続けられた。

凝集素抗体の検出と生菌接種による防禦作用試験

投餌を開始し、最初は 1 週間後、その後は 1 カ月おきに各区より 2 尾ずつ魚を取り上げ、凝集反応により抗体価を測定した。測定法は前報と同様にマーゾニン処理死菌を反応抗原とする試験管内凝集反応によった。

投餌開始後 4 カ月目に投餌をやめ、各区より 10 尾ずつ取り上げ生菌攻撃試験を行なった。生菌抗原液と同じ方法で準備した生菌懸濁液 (5 mg/1 ml) を魚体重 10 g 当り 0.02 ml (=0.1 mg 菌体) の割合で体側筋

* 東京大学農学部

表 1 各区の投与菌量, 投餌量, 水温, および凝集価

期 間		I 死菌区 Killed cells feeding	II 生菌区 Viable cells feeding	III マーゾニン区 Control (merzonin)	IV 水道水区 Control (city water)
1969 年* 1 月 31 日 ~2 月 5 日 凝集価測定 2 月 6 日	投与菌(餌)量**	33 mg(55 g)	47 mg(78 g)	0(73 g)	0(73 g)
	水 温	14.6±1.8°C	15.3±1.0°C	14.8±1.0°C	15.0±1.2°C
	供試魚体重	56 g, 54 g	13 g, 11 g	16 g, 13 g	14 g, 11 g
	凝集価	—	—	—	—
2 月 7 日 ~3 月 5 日 凝集価測定 3 月 7 日	投与菌(餌)量	115(192)	149(248)	0(273)	0(290)
	水 温	13.7±2.1	14.8±1.5	14.3±1.7	15.1±1.9
	供試魚体重	32, 23	19, 14	24, 20	27, 20
	凝集価	—	—	—	—
3 月 8 日 ~4 月 7 日 凝集価測定 4 月 8 日	投与菌(餌)量	122(203)	158(263)	0(270)	0(300)
	水 温	16.4±2.1	16.4±1.7	16.9±2.5	17.9±2.5
	供試魚体重	25, 23	21, 18	19, 19	27, 19
	凝集価	—	—	—	—
4 月 9 日 ~5 月 6 日 凝集価測定 5 月 7 日	投与菌(餌)量	204(340)	210(350)	0(360)	0(375)
	水 温	21.1±1.7	18.9±2.4	19.7±2.9	21.5±2.1
	供試魚体重	86, 32	34, 17	28, 18	25, 23
	凝集価	—	25, 50	—	—
5 月 8 日 ~6 月 3 日 凝集価測定 6 月 6 日	投与菌(餌)量	254(423)	213(355)	0(340)	0(308)
	水 温	21.1±0.8	21.4±1.8	19.5±1.7	20.4±1.3
	供試魚体重	65, 41	34, 27	34, 21	47, 25
	凝集価	—	—, 12.5	—	—

* Period of feeding

Date of agglutination test

** Amount of organisms (food) given

Water temperature

Body weight of fish tested

Agglutinin titer

肉部に注射した。注射後 1 週間目までの死亡率から防禦作用を調べた。

結 果

各区の投与菌量, 投餌量(湿重量), 各期間の水温(平均水温±標準偏差), 凝集価, および凝集価測定に供したウナギの体重を表 1 に示した。なお, 凝集価測定に際しては各区においてなるべく大きい魚を選んだ。

この表に見られるように, 死菌区 (I), および 2 つの対照区 (III, IV) の魚には 4 カ月の実験期間を通じて, 凝集素抗体はまったく認められなかった。なお, 凝集素検出実験の際, 魚体が小さく血液量が少ないため血清の最小稀釈倍数は 12.5 ないし 25 としたので, 表 1 に見られる凝集価マイナスとなっているものは正確には <12.5 あるいは <25 ということになる。

生菌投与区 (II) においては菌体投与開始後約 3 カ月目に凝集価 25, 50 を得た。しかしさらに 1 カ月菌体を投与し続けても凝集価の上昇は見られずむしろ 12.5, <12.5 と下ってしまった。実験期間を通じて生菌投与区においても, 他の区と同様発症あるいは死亡はまったく認められなかった。

次に投餌開始後 4 カ月目に生菌攻撃試験を行なった。菌接種後 1 週間目までの各区における累積死亡率を示したのが図 1 である。本実験以外のいくつかの病原性実験の場合でも, 本菌株を魚体重 10 g 当り 0.1 mg を筋注した時の累積死亡率は 1 週間後で 80~100% であり, 2 日目すでに 70% 以上になり 4 日目以降

図 1 生菌接種による各区の累積死亡率
Cumulative mortality of each group after challenge.

の死亡はほとんどないのが普通である。従って本実験の場合、I, III, IV 区いずれの場合もそれらの通常の結果と一致している。しかし II 区の場合、3 日目以降になると他の区と差がないが、2 日目における死亡率が目立って低い。これは生菌投与区 (II) の魚が多少とも防禦作用を持っていたためではないかと考えられる。しかし 3 日目以降の死亡率を見ると、これだけで II 区の魚が防禦抗体を持っていたと断定するのは危険であるかもしれない。

考 察

魚類における経口免疫に関する研究はいくつかあり、川津が魚類の免疫反応の総説の中でふれているごとく²⁾、その結果はまちまちであるが、おもな研究結果を表 2 にまとめてみた。魚種はウナギの 1 例を除けばすべてサケ・マス類についてである。また抗原としては KRANTZ ら³⁾の研究を除けばすべて死菌である。ウナギの 1 例は経口免疫の効果を否定しており (腸管免疫は成立)、サケ・マス類の 8 つの報告の中、4 例が肯定、4 例が否定的な結果を出している。魚種、菌種、あるいは抗原作製方法の違いによる結果の違いは認められず、結果はまったくばらばらと言わざるを得ない。しかしこれらのいくつかの結果から判断すると、魚類においても経口免疫は可能であり、否定的な結果を示すものは抗体産生の程度が著しく低かったのではないかと考えられる。

本実験の結果では抗原を餌に混ぜて投与し始めて 3 カ月目に生菌投与区のみ凝集素抗体の産生が認められ、その後さらに 1 カ月投与し続けたが抗体価の上昇は認められなかった。また 4 カ月目に筋肉注射による生菌攻撃試験を行なった結果、生菌投与区にわずかに死亡の遅れが認められた。この結果は先に示した過去の研究結果から引き出されてくる、あまり高いレベルにはならないが経口免疫は可能であるという結論を裏付けるものである。しかし本実験では死菌区には抗体は産生されず、生菌区にのみ産生されたという点は過去の結果と違う点である。人間などの温血動物の場合には経口免疫には弱毒菌株などの生ワクチンを抗原として投与するのが普通である。従って従来の魚類における経口免疫の効果の程度が低いのは死菌を抗原として用いていることが一つの原因かもしれない。

なお、毒性の強い生菌を投与した区においてまったく発病が認められず、抗体が産生されたという事実は興味ある結果である。

いずれにしても経口免疫を実用化するまでにはいくつかの問題、すなわち十分防禦作用をもつだけの抗体

表 2 経口免疫に関する過去の研究結果

研究者		年	菌 種	魚 種	方 法	結 果	
						凝 集 価	防禦作用
1	DUFF, D. C. B. ³⁾	1942	<i>A. salmonicida</i>	Cutthroat Trout (<i>Salmo clarki</i>)	CP クロロホルム死菌 2週間に 64~70 回投与	対照区よりやや 高かった	生菌水中添加感染 死亡率 29% 対照 77%
2	SNIESZKO, S. F. and S. B. FRIDDLE ⁴⁾	1949	<i>A. salmonicida</i>	Brook Trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	加熱・マーズニン死菌 8日間投与		対照区と差なし
3	保科利一 ⁵⁾	1962	<i>A. punctata</i>	ウナギ	加熱死菌 2週間投与	対照区と差なし	対照区と差なし
4	林孝市郎, 他 ⁶⁾	1964	<i>Vibrio</i> spp.	ニジマス	ホルマリン死菌 (多価ワ クチン) 5週間投与	3週間で 64 4週間で 128	(1例)生菌筋注 死亡率 70% 対照 100%
5	SAITO, Y., et al. ⁷⁾	1964	<i>V. piscium</i> var <i>japonicus</i>	Rainbow Trout (<i>Salmo gairdnerii</i>)	加熱死菌	認められず	効果なし
6	KRANTZ, G. E. et al. ⁸⁾	1964	<i>A. salmonicida</i>	Brown Trout (<i>Salmo trutta</i>)	生菌, クロロホルム死菌 1日おきに 65 回投与	対照区と差なし	
7	SPENCE, K. D. et al. ⁹⁾	1965	<i>A. salmonicida</i>	Coho Salmon (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	ホルマリン死菌 98 日間投与	認められず	対照区と有意の差な し
8	ROSS, A. J. and G. W. KLONTZ ¹⁰⁾	1965	"Red mouth disease" の病原体	Rainbow Trout	0.5% 石炭酸死菌 最初の 2 週間 10 回, その後 1 週間に 1 回投与	認められた	腹腔注射 (70 日後) 死亡率 10% 対照 90%
9	Post, G. ¹¹⁾	1966	<i>A. hydrophila</i>	Rainbow Trout	加熱死菌 9カ月間投与	対照区より僅か に高かった	腹腔注射 死亡率 60~90% 対照 80~100%

産生レベルにまで高めることの可能性,あるいはウナギの *Aeromonas* 感染症に見られるような多種血清学的菌型存在¹²⁾の問題など,さまざまな問題があるが,経口免疫の可能性が存在することは確かなことである。

最後にウナギの配合餌料を提供して下さった日清製粉株式会社,ならびに同社中央研究所の青江 弘博士,吉島重鉄氏に感謝する。

文 献

- 1) MUROGA, K. and S. EGUSA 1969 Immune response of Japanese eels to *Vibrio anguillarum*. I. An effect of temperature on agglutinating antibody production in starved eels. 日本誌, 35, (9), 856~862.
- 2) 川津浩嗣 1969 (総説) 魚類の免疫反応, 本誌 3(2), 57~72.
- 3) DUFF, D. C. B. 1942 The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. *J. Immunol.* 44, 87~94.
- 4) SNIESZKO, S. F., and S. B. FRIDDLE 1949 Prophylaxis of furunculosis in brook trout by oral immunization and sulfamerazine. *Prog. Fish-Cult.* 11(3), 161~168.
- 5) 保科和一 1962 ウナギの鱗赤病に関する研究, 東水大特別報告 6(1), 1~104.
- 6) 林孝市郎・小林茂雄・鎌田淡紅郎・尾崎久雄 1964 ニジマスのビブリオ病に関する研究 II ワクチンの予防効果, 三重県立大水産学部紀要, 6(2), 181~191.
- 7) SAITO, Y., M. OTSURU, T. FURUKAWA, K. KANDA, and A. SATO 1964 Studies on an infectious disease of rainbow trout. *Acta. Medica. et Biologica* 11, 267~295.
- 8) KRANTZ, G. E., J. M. REDDECLIFF, and C. E. HEIST 1964 Immune response of trout to *Aeromonas salmonicida*. Part II Evaluation of feeding techniques. *Prog. Fish-Cult.* 26(2), 65~69.
- 9) SPENCE, K. D., J. L. FRYER, and K. D. PILCHER 1965 Active and passive immunization of certain salmonid fishes against *Aeromonas salmonicida*. *Canadian J. Microbiol.* 11(3), 397~405.
- 10) ROSS, A. J. and G. W. KLONTZ 1965 Oral immunization of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against an etiologic agent of "red mouth disease". *J. Fish. Res. Bd. Canada.* 22, 713~719.
- 11) POST, G. 1966 Response of rainbow trout to antigens of *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish. Res. Bd. Canada,* 23(10), 1487~1494.
- 12) 清水朋子・江草周三 1968 ウナギのワタカブリ病から分離された *Aeromonas liquefaciens* の血清学的菌型について, 本誌, 3(1), 12~15.

Summary

An attempt was made on oral immunization of *Anguilla japonica* against *Vibrio anguillarum*.

Four groups of eels, 5g~50g in body weight, were kept in separate experimental tanks. The first group was given the merzonin-killed organisms mixed with a formula powder food for about four months. The second group received the viable organisms in a similar way. The other two groups served as controls, being fed only food. Among those four groups, only the second group did produce circulating agglutinating antibody after three month's feeding, and a slight protective immunity was demonstrated in the same group after four month's feeding.

These results suggest that oral immunization deserves further work from a practical point of view.