ブリ類結節症に対する浸漬法ワクチンの処理回数と 経口法併用による有効性の比較

楠 田 理 一, 浜 口 昌 巳

(昭和 61 年 10 月 23 日受理)

A Comparative Study on Efficacy of Immersion and a Combination of Immersion and Oral Vaccination Methods Against Pseudotuberculosis in Yellowtail

Riichi Kusuda* and Masami Hamaguchi*

Efficacy of various direct immersion methods was investigated for the development of a practical vaccine against pseudotuberculosis in cultured yellowtail. Formalin-killed *Pasteurella piscicida* was used to immunize fish, one, two, three times by immersion and a combination of single immersion and oral vaccination methods. An artificial infection at three doses of *P. piscicida* to determine efficacy of various administered methods was carried out three weeks after the first vaccination. The relative percent survival at ten days after artificial infection were: a) 8.0×10^4 cfu/ml: 0% in one immersion, 7% in two immersion, 13% in three immersions 17% in immersion+oral methods; b) 8.0×10^8 cfu/ml: 22% in one immersion, 39% in two immersions, 51% in three immersions and 65% in immersion+oral methods and c) 8.0×10^2 cfu/ml: 30% in immersion+oral methods. Agglutination titers against *P. piscicida* in the serum and skin mucus were determined in vaccinated fish prior to artificial infection and were observed to be enhanced with increasing frequency of immersion. In addition, agglutination titers against *P. piscicida* were observed in the intestinal mucus of fish vaccinated by three times immersion and a combination of immersion and oral methods. Efficacy of direct immersion methods increased with increasing administration times and combined with oral vaccination methods.

養殖魚のワクチンの実用化のためには、投与方法が簡便であることが要求される。この目的にかなう投与方法として、現在までに経口法¹⁾、浸漬法²⁾および噴霧法³⁾などが考案されている。それらのなかでも浸漬法は操作が簡便の上に、ワクチンの使用量が少なくすむので、実用性の面で優れていると考えられる。

ブリ稚魚の主要細菌性疾病である類結節症に対する浸漬法ワクチンについては福田、楠田⁴⁾ Fukuda and Kusuda⁵⁾の研究があり、本法によって免疫したブリ稚魚の血清や体表粘液中には凝集抗体が産生され、感染防御性が高まるとされている。しかし、有効性は噴霧法や接種法と比較して低い結果が得られている。

そこで、本研究ではブリ類結節症ワクチンに対する処理方法の簡便な浸漬法の実用化をはかるために、処理回数の増加により、あるいは浸漬法と経口法の併用により、有効性を高めることができるかどうか検討した。

実験方法

供試魚 高知県土佐市宇佐町の養殖業者から購入した

平均魚体重 20.8 g のブリ稚魚を用いた。

飼育方法 供試魚を 0.8 t の流水式 FRP 水槽に収容し、エアレーションを行いながら飼育した。餌は 1 日あたり魚体重の 12% にあたるイカナゴにビタミン剤を混合し、朝夕 2 回投与した。

ワクチンの調製 1984 年に大分県のブリ病魚から分離された OT-8447 株の魚体通過強毒株を 1.5% NaCl 加 BHI ブイヨン (Difco) に接種し、25°C で 24 時間振とう培養した菌液に、ホルマリンを 0.5% 濃度となるように添加し、冷蔵所に 48 時間静置したのち、 $5,000 \times g$ で 15 分間遠心分離して菌体を回収した。菌体は滅菌 PBS で 3 回洗浄したのち、100 mg/ml の濃度となるように同液に懸濁し、ワクチンとして使用した。

免疫方法 浸漬法ワクチン処理は次のように行った。1~3 回浸漬区はまず、ワクチンを綿ろ過海水を用いて 1000 倍に希釈し、このワクチン懸濁海水 25 l あたり 50 尾の供試魚をエアレーションを行いながら 5 分間浸漬した。この操作を Fig. 1 に示すスケジュールにそって、1 週おきに繰り返し行った。1 回浸漬と経口併用区は 1 回

* 高知大学農学部水産病理学講座 (Fish Disease Laboratory, Faculty of Agriculture Kochi University, Nankoku, Kochi 783, Japan).

Fig. 1. The schedule of vaccination in this study.

▲, immersion treatment with vaccine; △, immersion treatment without vaccine; ○, oral administration.

浸漬ののち、2日目から Hosokawa ら⁹⁾ のブリ稚魚用精製飼料にワクチンを混合し、0.4 ml/尾/回の割合で2日おきに7回投与した。

実験的感染試験 ワクチン投与3週間後に実験的感染を行って有効性を判定した。まず、1.5% NaCl 加 BHI 平板で 25°C 48 時間培養した OT-8447 株を滅菌 PBS に懸濁し、海水を用いて生菌濃度が 8.0×10^4 , 8.0×10^8 , 8.0×10^9 cfu/ml となるように希釈した。各濃度の生菌懸濁海水 25 l あたり各区 30 尾の魚をエアレーションを行いながら5分間浸漬した。実験的感染後10日間飼育し、斃死状況を観察した。斃死魚は腎臓から菌分離を行い、抗 *P. piscicida* 血清を用いて、類結節症による斃死であることを確認した。そして、最終生残数から有効率を次式を用いて算出した。

$$\text{有効率} = \left(1 - \frac{\text{ワクチン区の斃死率}}{\text{対照区の斃死率}}\right) \times 100$$

血清、体表および腸管粘液の採取 第1回目の浸漬処理から3週間後に各区10尾の魚を無作為にとりあげた。血清と体表粘液は福田、楠田⁴⁾の方法により、腸管粘液は楠田、高木⁷⁾の方法により採取した。

凝集抗体価の測定 *P. piscicida* OT-8447 株のホルマリン死菌を抗原として、マイクロタイター法によって測定した。

血清中の抗 *P. piscicida* LPS 特異抗体量の測定 松原ら^{8,9)}の方法によって行った。

結 果

各ワクチン区の実験的感染後の生残率の変化は Fig. 2 に示すとおりである。実験的感染10日後の最終生残率は、 8.0×10^4 cfu/ml の生菌濃度では1回浸漬区が0%、2回浸漬区が7%、3回浸漬区が13%、1回浸漬と経口併用区が17%、対照区が0%となった。 8.0×10^8 cfu/ml の生菌濃度では1回浸漬区が27%、2回浸漬区が43%、

Fig. 2. Change in survival rate of vaccinated and control yellowtail challenged with *P. piscicida*.

○, immersion 1X; ●, immersion 2X; ●, immersion 3X; △, immersion+oral; □, control.

Infection dose (cfu/ml); A, 8.0×10^4 ; B, 8.0×10^8 ; C, 8.0×10^9 .

3回浸漬区が53%、1回浸漬と経口併用区が67%、対照区が7%となった。 8.0×10^9 cfu/ml の生菌濃度では1回浸漬区が53%、2回浸漬区が73%、3回浸漬区が

Table 1. Protective immunogenicity of yellowtail vaccinated by various administration against challenge with *P. piscicida*

Infection dose (cfu/ml)	Vaccination group	Number of challenged	Number of survival fish	Relative percent survival
8.0×10^4	Immersion 1X	30	0	0
	Immersion 2X	30	2	7
	Immersion 3X	30	4	13
	Immersion+oral	30	5	17
	Control	30	0	—
8.0×10^8	Immersion 1X	30	8	22
	Immersion 2X	30	13	39
	Immersion 3X	30	16	51
	Immersion+oral	30	20	65
	Control	30	2	—
8.0×10^2	Immersion 1X	30	16	30
	Immersion 2X	30	22	60
	Immersion 3X	30	27	85
	Immersion+oral	30	27	85
	Control	30	10	—

90%, 1回浸漬と経口併用区が 90%, 対照区が 33% となった。

各ワクチンの有効率は Table 1 に示すとおりである。 8.0×10^4 cfu/ml の生菌濃度では 1 回浸漬区が 0%, 2 回浸漬区が 7%, 3 回浸漬区が 13%, 1 回浸漬と経口併用区が 17% となった。 8.0×10^8 cfu/ml の生菌濃度では 1 回浸漬区が 22%, 2 回浸漬区が 39%, 3 回浸漬区が 51%, 1 回浸漬と経口併用区が 65% となった。 8.0×10^2 cfu/ml の生菌濃度では 1 回浸漬区が 30%, 2 回浸漬区が 60%, 3 回浸漬区が 85%, 1 回浸漬と経口併用区が 85% となった。

第 1 回目の浸漬処理から 3 週間後の各区の血清, 体表および腸管粘液中の凝集抗体価は Table 2 に示すとおりである。平均凝集抗体価は血清では 1 回浸漬区が 1:3, 2 回浸漬区が 1:4, 3 回浸漬区が 1:6, 1 回浸漬と経口併用区が 1:2, 対照区が 1:2 以下となった。体表粘液では 1 回浸漬区が 1:3, 2 回浸漬区が 1:4, 3 回浸漬区が 1:8, 1 回浸漬と経口併用区が 1:3, 対照区が 1:2 以下となった。腸管粘液では 1 回と 2 回浸漬区が 1:2 以下, 3 回浸漬区が 1:2, 1 回浸漬と経口併用区が 1:3, 対照区が 1:2 以下となった。

血清中の抗 *P. piscicida* 特異抗体量は Table 3 に示すとおりである。平均特異抗体量は 1 回浸漬区が 14.3 g/ml, 2 回浸漬区が 25.6 g/ml, 3 回浸漬区が 31.9 g/ml, 1 回浸漬と経口併用区が 21.6 g/ml, 対照区が 8.0 g/ml となった。

考 察

展着剤を用いて薬剤やワクチンを付着させ, 自由摂餌により経口投与する場合には, それらの海水中への逸散により目的量を確実に投与することが困難となる。モイ

Table 2. The agglutination titers against *P. piscicida* of serum, skin mucus and intestinal mucus of yellowtail

Vaccination group	Agglutination titer (1:)		
	Serum	Skin mucus	Intestinal mucus
Immersion 1X	2-8 (3)*	2-8 (3)	<2-2 (<2)
Immersion 2X	2-16 (4)	2-32 (4)	<2-2 (<2)
Immersion 3X	2-16 (6)	2-64 (8)	2-4 (2)
Immersion+oral	2-4 (2)	2-8 (3)	2-8 (3)
Control	<2	<2	<2

* Figures in parentheses indicate geometric mean.

Table 3. The range of antibody concentration against *P. piscicida* LPS in sera of yellowtail

Vaccination group	Antibody (μ g/ml)
Immersion 1X	10.4-23.4 (14.3)*
Immersion 2X	15.6-40.4 (25.6)
Immersion 3X	18.4-58.7 (31.9)
Immersion+oral	14.6-24.3 (21.6)
Control	4.8-11.4 (8.0)

* Figures in parentheses indicate arithmetic mean.

ストベレットや精製飼料を用いると逸散が少なくなることが知られている。そこで, 本研究における経口法ワクチンの投与には, ワクチン量を確実に投与するために, 精製飼料にワクチンを混合して投与した。

ワクチンの有効性を実験的感染によって判定するためには, 感染方法が自然感染と同じかあるいは近似した方法であることが望ましい。ブリ類結節症の感染経路については若林ら¹⁰⁾の研究があり, 経口感染の可能性が高いとされているが, まだ十分な解明がなされていない。福田, 楠田,⁴⁾ Fukuda and Kusuda⁵⁾ は類結節症ワクチンの有効性の判定に, 生菌を封入したカプセルをストローを用いて経口的にブリの胃内に強制投与する方法を用い

ている。しかし、この方法では口腔、食道、胃壁に損傷を与える可能性が高く、加えて、魚体に大きなストレスを与えるなどの欠点がある。そこで、本研究では類結節症の再現性が高く、ストレスの少ない浸漬法による実験的感染をおこない、ワクチンの有効性を判定した。その結果、実験的感染に用いる生菌濃度が高い場合には有効性は低くなり、生菌濃度が低くなるにつれて有効性は高まった。ワクチンの有効性は1回浸漬と経口法を併用した場合が最も高く、また浸漬回数の多いほど高い結果が得られた。

第1回目の浸漬処理から3週間後の各区ブリ稚魚の血清、体表および腸管粘液中の凝集抗体価を測定した結果、血清と体表粘液では浸漬回数が多くなるほど上昇した。腸管粘液では3回浸漬区と1回浸漬と経口併用区で上昇が認められ、抗体の産生性はワクチン処理の回数や方法により変化した。また、血清中の抗 *P. piscicida* 特異抗体量を測定した結果、浸漬回数の増加に伴い上昇することがわかった。ワクチン浸漬処理後の魚の血清中の凝集抗体価はアユのビブリオ病ワクチンでは上昇しないことが知られている。^{11,12)} しかし、*pacific salmon*,¹³⁾ やブリ⁴⁾ などでは上昇することが知られている。また、松原⁹⁾ は血清中の抗 *P. piscicida* 特異抗体量を ELISA を用いて測定した結果、浸漬法ワクチンの処理回数に伴い特異抗体量の上昇が認められるとしている。いっぽう、浸漬法ワクチンによりブリの体表粘液中の抗体量が上昇することや、⁴⁾ 経口法ワクチンにより plaice の腸管粘液中の抗体量が上昇することが知られている。¹⁴⁾ 魚類においてもは乳類と同様に抗血清接種による受動免疫が成立することから、血清中の抗体が感染防御性に関与することが明らかである。^{14,15,16,17,18)} さらに、魚類では粘液への分泌抗体が感染防御に重要であることが知られている。¹⁹⁾ これらのことから、浸漬回数の増加に伴う有効率の上昇は、ワクチンの反復投与により、血清や体表粘液中の抗体産生量が増加し、感染防御性が増すのではないかと考えられる。しかし、1回浸漬と経口併用区では、血清および体表粘液中の凝集抗体価が2回および3回浸漬区と比較して低いにもかかわらず、有効性は最も高かった。このことから、経口法によって誘引された腸管粘液中の抗体が、ブリ類結節症の感染防御に有効であるのではないかと考えられる。

なお、ブリ類結節症に対する経口法ワクチンの有効性の評価は、有効であるとされるもの⁴⁾ と無効であるとされるもの¹⁰⁾ にわかれている。したがって、経口法ワクチンのブリ類結節症に対する感染防御に、腸管粘液中に産生される抗体がかかわっているかどうかは、今後検討す

べきであると思われる。

本研究においては、浸漬法の反復処理や経口法との併用により、体表や腸管粘液中の抗体産生量が上昇し、ブリ類結節症に対する有効性が高まるということが明らかになった。しかし、反復処理によってストレスが増加する欠点も考慮しなければならない。Antipa ら²⁰⁾ は最初の浸漬処理から14日後に、さらに反復処理を行っても有効性の上昇は小さく、また反復処理は魚に対するストレスや経済的な面からも有効な方法ではないとしている。

今後はブリ類結節症ワクチンの実用化にむけて、これらを考慮して、適切な処理回数や投与方法を検討するとともに、反復処理を必要としない有効な浸漬ワクチンを開発すべきであると思われる。

文 献

- 1) D. C. B. Duff: *J. Immunol.*, **44**, 87-94 (1942).
- 2) D. F. Amend and D. C. Fender: *Science*, **192**, 793-794 (1976).
- 3) T. Itami and R. Kusuda: *Nippon Suisan Gakkaishi* **44**, 1413 (1978).
- 4) 福田稔, 楠田理一: 日水誌, **47**, 147-150 (1981).
- 5) Y. Fukuda and R. Kusuda: *Fish Pathol.*, **20**, 421-425 (1985).
- 6) H. Hosokawa, Y. Sumita, and M. Takeda: *Rep. Usa mar. biol. Inst. Kochi Univ.*, **1**, 9-14 (1979).
- 7) 楠田理一, 高木修作: 高知大・海洋生物研報, **5**, 21-28 (1983).
- 8) A. Matsubara, S. Mihara, and R. Kusuda: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 921-925 (1985).
- 9) 松原明政, 三原 茂, 楠田理一: 日水誌, **51**, 927-932 (1985).
- 10) 若林久嗣, 豊田 宏, 江草周三: 魚病研究, **11**, 207-211 (1977).
- 11) T. Aoki, T. Kitao, M. Fukudome, S. Takahashi, and S. Egusa: *J. Fish Diseases*, **7**, 149-156 (1984).
- 12) T. Aoki, M. Sakai, and S. Takahashi: *Fish Pathol.*, **19**, 181-185 (1984).
- 13) K. D. Spence, J. L. Fryer, and K. S. Pilcher: *Can. J. Microbiol.*, **11**, 397-405 (1965).
- 14) T. C. Flether and P. T. Grant: *Aquaculture*, **1**, 417-428 (1973).
- 15) D. F. Amend and L. Smith: *J. Fish. Res. Board Can.*, **31**, 1371-1378 (1974).
- 16) L. W. Harrell, H. M. Etlinger, and H. O. Hodgins: *Aquaculture*, **7**, 363-370 (1976).
- 17) 福田稔, 楠田理一: 日水誌, **16**, 85-89 (1981).
- 18) R. Antipa and D. F. Amend: *J. Fish. Res. Board Can.*, **34**, 203-208 (1977).
- 19) R. S. Hines and D. T. Spira: *J. Fish Biol.*, **6**, 373-378 (1974).
- 20) R. Antipa, R. Gould, and D. F. Amend: *J. Fish Diseases*, **3**, 161-165 (1980).