

アユの冷水病に対する経口ワクチンの研究— I

ワクチン内包腸溶性マイクロカプセルの有効性について

原 日出夫

Study of Oral Vaccination against Cold-water Disease
in Cultured Ayu, *Plecoglossus altivelis*- I

Efficacy of Oral Vaccination with Enteric-Coated Microcapsules

Hideo HARA*

Abstract

Cold-water disease vaccine encapsulated in the enteric-coated microcapsules(MC) was given to cultured Ayu by oral route.

When MC was made to mix with the artificial feed, agglutinating antibody titers was raised in 2 individuals out of 5 individuals examined.

On the other hand, agglutinating antibody titers was not raised when the feed adsorbed with vaccine liquid were provided.

These results indicate the possibility of obstructive efficacy of oral vaccination with MC for cold-water disease in cultured Ayu.

はしがき

近年、全国的にアユ冷水病が発生し、養殖場等で大きな被害を与えている。本県では、相澤(1996)¹⁾により発生が確認されて以来、毎年発生が報告されており(相澤・相川,1996²⁾:1997³⁾, 相川,1998⁴⁾:1999⁵⁾)、1998年のアユの魚病診断結果では、本疾病が全体の60%以上を占めている(相川, 1999⁶⁾)。本疾病は、一旦発生すると、投薬によりへい死数は減少するものの、完全に終息せず、長期間へい死が継続する特徴を持つ(相澤,1996⁷⁾)。羅病魚は、体表の穴あき、あごの欠損および鱗の発赤等を呈し、商品価値が著しく低下する。

本県では、1996年から予防対策として、アユ冷水病ワクチン(以下「ワクチン」と記す。)の研究に着手しており(相川・相澤,1997⁸⁾)、アジュバンド添加ワクチンを注射により腹腔内へ投与する方法において、ワクチンの有効性が確認されている(相川,2000⁹⁾)。しかしながら、注射法は、池から魚を取り上げ、1尾ずつ注射するため手間がかかるうえ、魚に与えるストレスも多大であると考えられる。そこで、ワクチンを養殖現場へ普及するためには、より簡便かつ魚にストレスを与えない投与方法が求められている。

これらのことから、本研究ではワクチンを魚類腸溶性マイクロカプセル(以下、「MC」と記す。)に内包し、アユに経口投与すれば、抗原が変性してしまうことなく胃を通過し、腸後部で抗原が吸収されるものと考え、ワクチン内包MCを作製し、アユ冷水病への有効性について検討した。

材料および方法

供試魚 平均体重14.8gの人工産アユを、室内の0.5t FRP製円形水槽2基にそれぞれ40尾ずつ収容した。飼育水は、井戸水をヒートポンプで20℃に加温し、かけ流しとした。飼料は、配合飼料(日本農産工業(株)製「あゆソフトNo.2」)を魚体重の2%で1日4回に分けて給餌した。1週間飼育後、ワクチンの初回経口投与を実施した。さらに、初回経口投与後、14日目に2回目の経口投与を実施した。試験区では、1尾あたりの投与量が、0.1gとなるようワクチン内包MCを配合飼料に混合し、供試魚に経口投与した。対照区では、1尾あたりの投与量が、0.1gとなるようワクチン液を配合飼料に吸着させ、経口投与した。

ワクチン内包MCの製作 ワクチン液は、徳島県のアユから分離された冷水病菌株 FPC840(Wakabayashi et.al,1994⁶⁾)を、改変サイトファーガ液体培地で96時間しんとう培養し、0.3%となるようにホルマリンを添加後、4℃で24時間以上保存して不活化した。これを 6.0×10^8 cells/mlとなるように生理食塩水に懸濁した。ワクチンのMCへの内包は、藤野・永井(1992)⁵⁾の方法を一部改変して行った。内包の確認は、MCをpH6.8の腸液を想定した液体に混合し、MCの崩壊によって放出される不活化菌体を光学顕微鏡で観察することにより行った。

血中凝集抗体価の測定 ワクチン投与前とワクチン初回投与後14日目およびワクチン2回目投与後14日目の計3回、各試験区から5尾ずつ、注射器を用いて尾柄部より採血した。採集した血後は、24時間4℃で保存し、その後、4℃、4500 r p mで20分間遠心分離して血清を得た。冷水病菌に対する凝集素価はマイクロタイター法により測定した。なお、今回、血清中の補体の吸収操作をせず

に抗体価の測定を行ったが、池田(1990)¹⁰⁾によれば、非免疫魚血清に見られる見かけ上の凝集素価よりも高い値の凝集素価に関しては、吸収操作の有無に関係なく正確な凝集素価を得ることができるとされており、今回の試験では、対照区の抗体価がいずれも検出限界以下で見かけ上の凝集素価が見られなかったため、試験区の測定値を真の抗体価と同等と見なした。

結 果

ワクチン投与魚の血中凝集抗体価 ワクチン投与前および投与後の抗体価をTable1に示した。ワクチン投与前は、供試魚の血清中の供試菌に対する抗体価は全ての個体が1 : < 2であった。対照区は、初回ワクチン投与後14日目および28日目ともに全ての個体が1 : < 2であり、検出限界以下であった。一方、試験区は、初回ワクチン投与後14日目は全ての個体が1 : < 2であり、検出限界以下であったが、28日目は1 : < 2が3個体みられたものの、1 : 2 および 1 : 8 に上昇している個体がそれぞれ1個体ずつ認められた。

Table 1 Agglutinating antibody titers of Ayu vaccinated by different administrative methods.
表 1 ワクチン投与前およびワクチン投与後14日目と28日目のアユの血中凝集抗体価

Methods of vaccination	Fish no.	Before first vaccination	Days after first vaccination	
			14days	28days
Oral with microcapsules (Experiment)	1	<2		
	2	<2		
	3	<2		
	4	<2		
	5	<2		
	6		<2	
	7		<2	
	8		<2	
	9		<2	
	10		<2	
	11			<2
	12			<2
	13			8
	14			2
	15			<2
Oral (Control)	1	<2		
	2	<2		
	3	<2		
	4	<2		
	5	<2		
	6		<2	
	7		<2	
	8		<2	
	9		<2	
	10		<2	
	11			<2
	12			<2
	13			<2
	14			<2
	15			<2

考 察

魚にストレスを与えないと考えられるワクチン投与方法のひとつに経口法がある。しかしながら、この方法は、魚を取り上げる必要がないものの、腸後部で抗原が吸収される前に胃の消化酵素により抗原が変性すると考えられ、注射法や浸漬法に比べ効果が低いとされる(中西, 1998¹¹⁾)。例えば、アユのピブリオ病経口ワクチンの研究では、ワクチンを飼料に吸着させて経口投与しているが(楠田他, 1978¹²⁾, 中島・近畑, 1979¹³⁾, 川合・楠田, 1981¹⁴⁾)、そのうち、対照区に比して抗体価の上昇が認められたのは、中島・近畑(1979)¹³⁾による報告のみである。今回の試験において、対照区の抗体価が、いずれも検出限界以下であったのも、腸後部で抗原が吸収される前に胃の消化酵素により抗原が変性したため、抗体価の上昇が認められなかったのではないと思われる。

一方、試験区において、初回ワクチン投与後14日目までは血中凝集抗体価が1 : < 2の検出限界以下であったが、初回ワクチン投与後28日目には、2個体でそれぞれ1 : 2および1 : 8に上昇し、MCを利用したワクチンの経口投与の有効性が認められた。森下他(1964)¹⁵⁾は、アユの胃液のpHは4.0~4.2であり、腸液のpHは6.0~6.8であると報告している。また、藤野・永井(1992)⁹⁾は、pH1.2の液体中でMCは崩壊せず、pH6.8の液体中で崩壊することを明らかにしている。これらのことから、酸性域で崩壊せず、中性から弱アルカリ域で崩壊するMCの性質が機能し、抗原性を保った状態で胃を通過したワクチンが、腸管から取り込まれたものと思われる。北尾他(1980)¹⁶⁾は、ニジマス、コイおよびハマチの抗体産生細胞と液性抗体の出現時期について、抗原として類結節症原因菌(*Pasteurella piscicida*)を接種後、まず、抗体産生細胞が5~7日目頃より出現し、10~14日目にピークとなり、その後減少するのに対して液性抗体は、抗体産生細胞が減少し始める頃より上昇すると報告している。魚種が違うため一概に比較できないものの、試験区において、初回ワクチン投与後14日目の時点では抗体産生の時期が遅れており、抗体が産生されていなかったか、産生されていてにもかかわらずであったが、初回ワクチン投与後28日目の時点では抗体が十分産生され、抗体価の上昇が認められたものと考えられる。一方、馬場(1984)¹⁷⁾は魚類においても免疫記憶が成立するとしているように、初回ワクチン投与後14日目の時点では抗体が産生されたものの、極わずかであったが、初回ワクチン投与後28日目の時点では二次免疫応答により抗体が十分産生され、抗体価の上昇が認められたとも考えられる。

試験区において抗体価が上昇した個体が認められた反面、上昇しなかった個体も認められたことは、抗原量が少ないために抗体産生の個体間差が生じたことによるもの(池田, 1978¹⁸⁾, 中西, 1982¹⁹⁾)と考えられる。本研究で、経口投与したワクチン内包MCは、カプセル化されていない球状のワクチン混合寒天が混在していた。このことから、ワクチン内包MCの実質的な投与量は、1尾

あたり0.1g未満となり、MCに内包されているワクチンの正確な投与量が不明であった。今後は、完全にカプセル化することが可能な製作方法の検討や球状寒天の分離をすることなどから、正確な投与量を把握する必要がある。また、摂取量の個体差を防ぐために、添着剤などを使用して、ワクチン内包MCを配合飼料とともに確実に摂取させること、内包するワクチン濃度の検討などにより、ワクチン内包MCの有効性の向上を図る研究が必要である。

摘 要

アユ冷水病ワクチン内包MCをアユに経口投与し、血中凝集抗体価を指標にしてその有効性を検討した。

ワクチン液を配合飼料に吸着させて経口投与した場合、血中凝集抗体価の上昇が認められなかった。

一方、ワクチン内包MCを配合飼料に混合させて経口投与した場合、5個体測定したうち、2個体にそれぞれ1 : 2および1 : 8の血中凝集抗体価の上昇が認められた。

以上のことから、ワクチン内包MCを用いた経口投与方法の有効性が示唆された。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、東海大学教養学部藤野裕弘教授には、マイクロカプセル作製方法について御指導いただいた。第一工業製薬(株)の長沼準二氏には、乳化剤(DKエステルF-10)を御提供いただいた。(財)神奈川県内水面漁業振興会手代木亨祐氏には多くの有益な情報をいただいた。厚くお礼申し上げます。また、試験魚の飼育管理等に協力いただいた日本大学農獣医学部橋本耕介君に感謝いたします。

引用文献

- 1) 相澤康(1996) : 神奈川県下で発生したアユの冷水病について、神奈川県水産総合研究所研究報告、(第1号)、63-67.
- 2) 相澤康・相川英明(1996) : 水産動物保健対策推進事業、平成7年度神奈川県水産総合研究所業務概要、96.
- 3) 相澤康・相川英明(1997) : 水産動物保健対策推進事業、平成8年度神奈川県水産総合研究所業務概要、87.
- 4) 相川英明(1998) : 水産動物保健対策推進事業、平成9年度神奈川県水産総合研究所業務概要、64. 5) 相川英明(1999) : 水産動物保健対策推進事業、平成10年度神奈川県水産総合研究所業務概要、56.
- 6) 相川英明・相澤康(1997) : アユ冷水病のワクチン試験、平成8年度神奈川県水産総合研究所業務概要、77.
- 7) 相川英明(2000) : 魚病技術開発研究、平成11年度神奈川県水産総合研究所業務概要、70-71.
- 8) Wakabayashi, H., T. Toyama and T. Iida (1994) : A

- Study on Serotyping of *Cytophaga psychrophila* Isolated from Fishes in Japan, Fish Pathology., 29(2),101-104.
- 9) 藤野裕弘・永井彰 (1992) : 魚類腸溶性マイクロカプセルの試作, 東海大学紀要教養学部, (23), 275-284.
- 10) 池田和夫 (1990) : アマゴ血清中の凝集素価に及ぼす非免疫原菌体吸収操作の影響, 養殖研報, No.17, 51-54.
- 11) 中西照幸 (1998) : 魚病ワクチン開発の現状と展望, 水産増殖, 46 (3), 461-468.
- 12) 楠田理一・川合研児・城泰彦・秋月友治・福永稔・小竹子之助 (1978) : アユのビブリオ病に対する経口ワクチンの効果について, 日本水産学会誌, 44 (1), 21-25.
- 13) 中島基寛・近畑裕邦 (1979) : アユのビブリオ病に対するワクチン経口投与と高張浸漬法の効果, 魚病研究, 14 (1), 9-13.
- 14) 川合研児・楠田理一 (1981) : ビブリオ病経口ワクチンによるアユの免疫機構の研究, 魚病研究, 16 (1), 1-8.
- 15) 森下達雄・野田宏行・北御門学・高橋喬・立野新光 (1964) : 養殖魚の消化酵素について, 三重県立大学紀要水産学部, 6 (2), 239-246.
- 16) 北尾忠利・青木宙・神田美喜夫 (1980) : 魚類細胞性免疫の基礎的研究, 昭和55年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 403.88.
- 17) 馬場威 (1984) : (総説) 比較免疫学からみた魚類の免疫特性, 魚病研究, 18(4), 209-219.
- 18) 池田和夫 (1978) : *Aeromonas salmonicida* の死菌ならびに生菌に対するニジマスの免疫応答の比較, 淡水研報, (28), 47-53.
- 19) 中西照幸 (1982) : カサゴ *Sebastiscus marmoratus* の免疫応答—I, 養殖研報, No.3, 81-89.