

アユの冷水病に対する経口ワクチンの研究 -

ワクチン内包腸溶性マイクロカプセルの投与方法について

原 日出夫

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

Method of Oral Vaccination with Enteric-Coated Microcapsules

Hideo HARA*

はしがき

近年、全国的にアユ冷水病が発生し、その予防対策として、アユ冷水病ワクチン(以下「ワクチン」と記す)の研究が進められている。これまでに、オイルアジュバント添加ワクチンを注射により腹腔内へ投与方法において、ワクチンの有効性が確認されている^{1,2,3)}。

しかしながら、注射法は、乙竹⁴⁾によると0.5g以下の稚魚への負担が大きいとされており、また、手間がかかることなどから、より簡便な投与方法が求められている。簡便な投与方法として経口法がある。しかし、中西⁵⁾によると、一般に経口投与は注射法や浸漬法に比べ効果の点で数段劣るとし、その主な原因として、胃の消化酵素により抗原が変性してしまうためと考えられている。NAKAMURA *et. al*⁶⁾はシラスウナギ *Anguilla japonica* にニワトリIgYを経口投与し、胃の発達に伴い経口投与されたニワトリIgYの血中移行量が顕著に減少し、やがて検出されなくなることを確認している。

前報⁷⁾では、ワクチン内包腸溶性マイクロカプセル(以下「MC」と記す)を用いて、これをアユに経口投与した結果、投与前には血中凝集抗体価(以下「抗体価」と記す)は未検出であったが、投与後には検体の40%において、1:2~1:8の抗体価が確認された。血中凝集抗体(以下、「抗体」と記す)は、抗原である異物と反応し、その結果、1)病原体の感染単位を減少させ感染力を奪う、2)毒性を中和する、3)捕食の古典経路を活性化させる、4)抗体のFc部がオプソニンとして働くなどの効果により異物を効率よく生体内から排除するとされている⁸⁾。アユ冷水病の原因菌(*Flavobacterium psychrophilum*)に対する抗体の獲得割合および抗体価が上昇することは、同病を予防するうえで重要と考えられ

る。RAHMAN *et. al*⁹⁾によると、注射ワクチンについて、ワクチンにオイルアジュバント(セピック社製 Montanidae ISA 763A(以下「763A」と記す))を添加した場合、全検体で抗体価が1:16~1:64に上昇し、有効率¹⁰⁾(RPS(%)=(1-(mortality of vaccinated group/mortality of unvaccinated control group))×100)は60%であったと報告している。有効率が60%以上であった場合、ビブリオ病ワクチンにおいては実用可能なワクチンであると判断されている¹¹⁾。一方、経口ワクチンは前報⁷⁾のとおり一定の効果は認められたものの、注射ワクチンと比較して抗体価は低く、有効率は未確認となっている。今後、実用化を目指すために抗体価の向上、さらに有効率の確認が必要である。

楠田他¹²⁾によると、アユのビブリオ病の経口ワクチンでは、ワクチンの効果はワクチンの投与量および投与期間に比例するとされている。そこで本研究では、MCの投与量および投与期間について検討したところ、抗体価の向上が認められたので報告する。

材料および方法

供試魚

神奈川県水産総合研究所内水面試験場において継代(24代)飼育された親魚から、2001年9月に採卵し、養成した平均体重3.1gのアユを用いた。

ワクチンの調製

ワクチン原液は、滋賀県のアユから分離された冷水病菌株SG990302株を改変サイトファーガ液体培地で96時間振とう培養し、ホルマリンを0.3%濃度となるように添加後、4℃で24時間以上保存して不活化した(6.0×10⁸CFU/mL)。注射ワクチンは、ワクチン原液と763A

を容積比3:7でルアーロック式ガラスシリンジを用いて混合し、763A添加ワクチンを調製した。経口ワクチンは、ワクチン原液を4、5000rpm、30分で遠心分離し、上清を除去後、原液の1/10容量となるよう滅菌PBS(-)水溶液を添加混合し、10倍濃縮ワクチン液を調製した。これを藤野・永井¹³⁾の方法に準じてカプセル化した。MCをpH6.8に調整して腸液を想定した液体¹⁴⁾に混合後、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し、内包を確認した。

ワクチン処理

ワクチンの投与を開始を2002年5月21日とした。注射ワクチンは、オイゲノール(田辺製薬製「FA100」)で麻酔したアユの腹腔内に25 μ L/尾注射し、これを対照区とした。経口ワクチンは、配合飼料(日本配合飼料(株)製「鮎アルファメガ2C」)に滅菌蒸留水を適量散布し、配合飼料が柔らかくなった後MCを混合、先端をカットした10mL容のシリンジにこれを入れ、カットした部分に目合い約2mm \times 2mmのナイロンメッシュをあてて押し出した後、細断した。これをMC相当量で1日魚体重kgあたり0.1gを1日で投与したものを経口1区とし、同1.0gを1日で投与したものを経口2区とし、同0.2gを5日間連続で投与したものを経口3区とした。経口1~3区は、14日後再度同様に投与した。

飼育管理

円型0.3t水槽に各100尾収容し、ヒートポンプによる

井戸水のかけ流して飼育した。ワクチン処理後の水温は19.9~21.5とした。

ワクチンの評価

ワクチン処理後14日後と28日後に、2尾で1検体として各区10検体ずつ、それぞれサンプリングし、マイクロタイター法¹⁵⁾により冷水病菌に対する抗体価を測定した。すなわち、アユ血清の2倍希釈系列にホルマリン不活化冷水病菌(SG990302株)(6.0×10^8 CFU/mL)を加え、凝集の認められた血清の最高希釈倍率を抗体価とした。測定に供する血清は、注射器を用いて尾柄部より採血し、24時間、4 $^{\circ}$ Cで保存した。その後、4、4500rpmで20分間遠心分離して得た。さらに、補体の非動化処理¹⁶⁾として、血清を44 $^{\circ}$ Cのインキュベーター内に20分静置した。

抗体獲得割合および平均抗体価は、それぞれ次式により算出した。

抗体獲得割合(%) = 抗体価1:2以上の検体数/総検体数
平均抗体価 = 各検体の抗体価の和/総検体数

なお、予め供試魚群から10尾の抗体価を測定し、当該魚群の供試の適否について確認を行った。

結 果

試験開始前に供試魚群からサンプリングしたアユについて抗体価を測定したが、抗体価は認められなかった。

初回ワクチン処理から14日後の抗体価の測定結果をTable 1に、同28日後の測定結果をTable 2に示した。

Table 1 Agglutinating antibody titers in sera of ayu 14days after vaccination.

表1 ワクチン投与14日後のアユの抗体価

Groups	Individual serum titers (1:)	Ave.	Number 2	Number <2	%**
Injection (cont) Oil-adjuvanted vaccine: 25 μ L/fish	<2, 2, 2, <2, 2, 2, <2, <2, <2, <2	0.8	4	6	40
Oral-1* MC: 0.1g/kg (body weight)/day	<2, <2, <2, <2, <2, <2, <2, 2, <2, <2	0.2	1	9	10
Oral-2* MC: 1.0g/kg (body weight)/day	2, <2, 2, 4, <2, <2, <2, <2, <2, <2	0.8	3	7	30
Oral-3* MC: 1.0g/kg (body weight)/5days	<2, <2, <2, <2, <2, <2, <2, <2, <2, 2	0.2	1	9	10
Pre-immunized fish	<2, <2, <2, <2, <2, <2, <2, <2, <2, <2	0	0	10	0

*: Booster was administered 14days after the first vaccination.

** : ((Number 2)/10) \times 100

Table 2 Agglutinating antibody titers in sera of ayu 28days after vaccination.

表2 ワクチン投与28日後のアユの抗体価

Groups	Individual serum titers (1:)	Ave.	Number 2	Number <2	%
Injection (cont)	4, 8, 4, 8, 4, 8, 4, 16, 4, 4	6.4	10	0	100
Oral-1	<2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, <2, <2, 2	1.4	7	3	70
Oral-2	<2, 2, <2, 2, 2, <2, 4, 2, 2, <2	1.4	6	4	60
Oral-3	2, 2, 4, 2, 2, 4, 2, 8, 4, 4	3.4	10	0	100

初回ワクチン処理から14日後の抗体獲得割合は、対照区40%、経口2区30%、経口1区および経口3区10%であった。それらの抗体価について、対照区は1:2が4検体で平均抗体価は1:0.8であった。経口2区は1:2が2検体、1:4が1検体で平均抗体価は1:0.8であった。経口1区および経口3区は1:2が1検体で平均抗体価は1:0.2であった。

初回ワクチン処理から28日後の抗体獲得割合は、対照区および経口3区100%、経口1区70%、経口2区60%であった。それらの抗体価について、対照区は1:4が6検体、1:8が2検体、1:16が1検体で平均抗体価は1:6.4であった。経口3区は1:2が5検体、1:4が4検体、1:8が1検体で平均抗体価は1:3.4であった。経口1区は1:2が7検体で平均抗体価は1:1.4であった。経口2区は1:2が5検体、1:4が1検体で平均抗体価は1:1.4であった。

考 察

アユ冷水病の予防対策として簡易なワクチン投与方法の開発が期待されている。前報⁷⁾では、MCを用いることにより、一部の検体に経口ワクチンとしては初めて抗体価の上昇が認められた。しかし、注射ワクチン⁹⁾と比較するとその効果は低かった。そこで本研究では、経口ワクチンの効果向上を図るため、MCの投与量や投与期間について検討した。

試験開始前に供試魚群からサンプリングしたアユにおいて抗体価は認められず、本研究に用いたアユは、供試魚として適正であると判断された。

経口1区は、MC初回投与14日後における抗体獲得割合は10%であった。前報⁷⁾では、この時点で抗体価の上昇した検体は確認されていない。同28日後における抗体獲得割合は70%に上昇した。前報⁷⁾では、この時点で初めて40%の抗体獲得割合が確認された。このように、前報⁷⁾と比較して経口1区は、抗体獲得時期の早期化および抗体獲得割合の上昇が認められた。この理由として、本研究においてカプセルに内包したワクチンはワクチン原液を10倍濃縮したものを使用したことが考えられる。楠田他¹²⁾によると、アユのピブリオ病の経口ワクチンでは、ワクチンの効果はワクチンの投与量に比例するとされており、MCの経口投与においても、抗原量の増加により効果が向上することが示唆された。しかしながら、対照区と比較した場合、抗体獲得割合および平均抗体価ともに低く、この条件では、注射ワクチンほどの有効性が期待できないと思われた。

経口2区は、MC初回投与14日後において対照区とほぼ同等の抗体の獲得割合を示し、平均抗体価は対照区と同じ値となった。しかし、同28日後においては、抗体獲得割合および平均抗体価ともに対照区に及ばず、平均抗体価は経口1区と同じ値となり、抗体獲得割合は最も低くなった。コイにおいて、GTHの経口投与により血中抗体の誘導および投与の繰り返しによる抗体価の低下が確

認されており¹⁷⁾、その原因として消化管における抗原の特異的な吸収阻害能の獲得が確認されている¹⁸⁾。経口2区において2回目の経口投与で吸収阻害が生じたか否かは不明であるが、経口2区は経口1区と比較してMCが10倍量投与されたにも拘わらず、経口1程度の効果であったことについて、この吸収阻害が可能性の一つとして考えられ興味深い。

経口3区は、経口2区とMCの総投与量を同量とし、これを5日ずつに分割して連続投与を行ったものである。MC初回投与14日後において、抗体の獲得割合および平均抗体価ともに経口2区に及ばず、経口1区と同じ値となった。しかし、同28日後においては、抗体の獲得割合が経口2区を上回り、対照区と同様100%の抗体獲得割合が確認された。さらに、平均抗体価は対照区の約半分値であるが、経口区の中で最も高い1:3.4となった。抗体産生の個体間差は、投与される抗原量が少ない場合、各個体に取り込まれる抗原量に個体差が生じることが原因とされる¹⁹⁾²⁰⁾。経口2区および経口3区は投与される抗原量、すなわちMCの総投与量は同量であり、一日当たりの投与量では経口3区の方が経口2区より少ない。楠田他¹²⁾は、アユのピブリオ病に対する経口ワクチンにおいて、14日間以上の連続投与で高い有効性を認めている。これらのことから、MCを用いた経口ワクチンにおいても、一定期間連続した投与を実施することで効果が向上することが示唆された。

中島・近畑²¹⁾は、アユのピブリオ病の経口ワクチンで、ワクチンを配合飼料に吸着させて、15日間でワクチン原液(1.3×10⁹CFU/mL)に換算して340.1mL/kg (Body Weight)のワクチンを経口投与し、初回投与後30日後の抗体獲得割合は20%であったとしている。ワクチンの種類が違うものの、経口3区は、5日間の反復投与でワクチン原液(6.0×10⁹CFU/mL)に換算して約20.0mL/kg (Body Weight)のワクチンを経口投与し、初回投与28日後の抗体獲得割合は100%であった。これらのことから、MCの経口投与では少量のワクチン原液でも抗体の産生能力が確保されると思われた。

本研究において有望と思われたMCの連続投与方法については、さらに、投与期間など効果的な投与方法の検討を進めるとともに、経口ワクチンの効果を高めるアジュバント²²⁾の検討を行い、早急に攻撃試験による評価を行う必要がある。

最近、人工育成したアユは水温や密度などの飼育条件によって、天然のアユと比較して胸腺の発達が悪くなるがあると報告されている²³⁾。会田他²⁴⁾によると、胸腺は免疫担当器官であり哺乳類の場合とほぼ同様な機能を果たしていると考えられている。このことから胸腺はワクチンによる疾病予防に重要な役割を果たしていると思われる。胸腺の発達が悪いアユはワクチンの効果が低くなる可能性が考えられ、今後、ワクチン効果と胸腺の発達との関係も検討に加え、簡易かつ効果的なワクチンの開発に継続して取り組む必要がある。

摘 要

本研究は、アユ冷水病の予防対策としてワクチン内包魚類腸溶性マイクロカプセル(MC)の経口投与について、投与量および投与期間について検討を行った。

経口1区では、MCを0.1g/kg(BW)/dayとして14日間隔で反復投与したところ、初回投与28日後の抗体獲得割合が70%であり、平均抗体価は1:1.4であった。

経口2区では、MCを1.0g/kg(BW)/dayとして14日間隔で反復投与したところ、初回投与28日後の抗体獲得割合が60%であり、平均抗体価は1:1.4であった。

経口3区では、MCを0.2g/kg(BW)/dayとして5日間の連続投与を14日間隔で反復投与したところ、初回投与28日後の抗体獲得割合が100%であり、平均抗体価は1:3.4であった。

これらのことから、MCを用いた経口法において、一定期間連続した投与を反復実施することによって効果が向上することが示唆された。

謝 辞

本報告をまとめるにあたり、独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所病理部組織病理研究室の三輪理博士には、英文の御校閲を賜りました。日本大学生物資源科学部の松本憲治君には、試験魚の飼育管理等に御協力いただきました。厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) 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.
- 2) 永井崇裕(2001): アユの冷水病に対するワクチンの有効性等に関する研究, 平成12年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 91-100.
- 3) 原日出夫(2001): ワクチンを利用したアユ親魚の冷水病防除技術等に関する研究, 平成12年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 101-110.
- 4) 乙竹充(2001): アユの冷水病・細菌性出血性腹水病(シュードモナス症)ワクチンの開発, 魚病研究, 36(2), 110.
- 5) 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.
- 6) NAKAMURA, O., Y. SUZUKI, K. AIDA and H. HATTA (2001): Decreased transport of orally administered protein into the blood circulation of developing juveniles of Japanese eel *Anguilla japonica*, *Fisheies Science*, 67(5), 863-869.
- 7) 原日出夫(2000): アユ冷水病に対する経口ワクチンの研究, 神奈川水産総合研究所研究報告, 6, 109-112.
- 8) 飯田貴次(1996): 魚類の生態防衛, 「魚病学概論(室賀清邦, 江草周三編)」, 恒星社厚生閣, 東京, 9-20.
- 9) RAHMAN, M. H., M. OTOTAKE, Y. IIDA, Y.

- YOKOMIZO and T. NAKANISHI(2000): Efficacy of Oil-adjuvanted Vaccine for Coldwater Disease in Ayu *Plecoglossus altivelis*, *Fish Pathology*, 35(4), 199-203.
- 10) CORY, T. R. and D. F. AMEND (1977): Immunization of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. *Aquaculture*, 12, 317-325.
- 11) 城泰彦(1991): ワクチンの有効性試験, 水産増養殖叢書, 41, 102-110.
- 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): アユのピ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) 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.
- 14) ANONYMOUS(1976): 崩壊試験法, 「第九改正日本薬局方解説書(刈米達夫・石館守三・長瀬雄三監修, (財)日本公定書協会編)」, (株)廣川書店, 東京, 222-224.
- 15) 中井敏孝(1996): 免疫学的検査法, 「魚病学概論(室賀清邦, 江草周三編)」, 恒星社厚生閣, 東京, 138-141.
- 16) SAKAI, D. K. (1981): Heat Inactivation of Complements and Immune Hemolysis Reactions in Rainbow Trout, Masu Salmon, Choho Salmon, Goldfish and Tilapia, *Fisheies Science*, 47(5), 565-571.
- 17) NAKAMURA, O., Y. SUZUKI and K. AIDA (1998): Oral immunization specifically inhibits the intestinal protein uptake in common carp, *Cyprinus carpio* L, *Fisheies Science*, 66(3), 540-546.
- 18) NAKAMURA, O., Y. SUZUKI and K. AIDA (1998): Humoral immune response against orally administered human globulin in carp, *Fisheies Science*, 64(4), 558-562.
- 19) 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, 淡水区水産研究所研究報告, 28, 47-53.
- 20) 中西照幸(1982): カサゴ *Sebastiscus marmoratus* の免疫応答, 養殖研究所研究報告, No.3, 81-89.
- 21) 中島基寛・近畑裕邦(1979): アユのピ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.
- 22) 酒井正博(2001): アジュバント等の開発, 魚病研究, 36(2), 112.
- 23) MIWA, S., A. SAKAI and M. NAKANE (2003): Impairment of thymus development in cultured osmerid fish, the ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Aquaculture* (in press).
- 24) 会田勝美・小林牧人・金子豊二(1991): 内分泌, 「魚類生理学(板沢靖男・羽生功編)」, 恒星社厚生閣, 東京, 229-230.