

クルマエビのビブリオ病に対するワクチンの研究-Ⅱ

ワクチンの製法と作製用菌種による有効性の差異ならびに
経口ワクチンの有効性*¹

伊丹利明*²・閻 愚*³・高橋幸則*²

Studies on Vaccination against Vibriosis in Cultured Kuruma Prawn *Penaeus japonicus*-Ⅱ

Effect of Different Vaccine Preparations and Oral Vaccination Efficacy

Toshiaki Itami*², Yu Yan*³, and Yukinori Takahashi*²

In the previous paper, we proved that one per cent vaccine solution diluted with sea water was effective for control of vibriosis in kuruma prawn, when administered by water-borne route. For further development of vaccine against vibriosis in kuruma prawn, the efficacy of several vaccines prepared in different procedure or prepared with other vibrio species was studied and oral vaccination efficiency was also examined in this paper.

Ultrasonicated vaccine, cell vaccine, heat-killed vaccine and cell-free vaccine prepared from *Vibrio* sp. NU-1 were effective against artificial challenge by *Vibrio* sp. NU-1 when the prawns were vaccinated by being immersed in ten per cent solution of each vaccine for ten minutes. It is suggested that protective antigen of the vaccine was heat-stable and located both in the bacterial cells and in the culture broth. Cross protectivity against vibriosis in kuruma prawns was not obtained in the vaccine of *Vibrio* sp. YK-2, which produces the brown pigment on the prawn gill, but was found in *V. anguillarum* V-36 vaccine, in which the efficacy was slightly lower than the *Vibrio* sp. NU-1 vaccine. Oral vaccination was not effective against challenge test with *Vibrio* sp. NU-1 when 0.5g of wet-packed bacterial cells per one kg of prawn per day were fed for 14 days.

水産大学校研究業績 第1390号, 1991年10月21日受付.

Contribution from Shimonoseki University of Fisheries, No. 1390. Received Oct. 21, 1991.

* 1 平成3年度日本水産学会中国四国支部例会(下関)にて発表.

* 2 水産大学校増殖学科水族防疫学講座(Laboratory of Fish Diseases, Department of Aquaculture and Biology, Shimonoseki University of Fisheries).

* 3 山東省水産学校(Shandong Fisheries School, Yantai, Shandong, China).

1 緒言

前報¹⁾において、著者らはクルマエビのビブリオ病に対するより有効性の高いワクチンの開発を試みた。その結果、ビブリオ病原菌の液体培養菌液をホルマリンで不活化し、これを1%濃度に海水で希釈してエビを1時間浸漬した場合、高い有効性が認められることを明らかにした。しかし、10%ワクチンに10分間浸漬した場合の有効性はほとんど認められなかった。また、1%ワクチン液に5時間浸漬した場合の有効性は50日程度持続するが、クルマエビ養殖の全期間を通じてワクチン効果を延長するためには追加免疫が必要であるのではないかと考えられた。

そこで、本報では10%ワクチンのような高濃度であっても副作用がなく、しかも予防効果を有するワクチンの開発を試みるとともに、追加免疫として最も実用的な投与方法である経口ワクチンの有効性について報告する。さらに、魚類のワクチンとしてすでに用いられている *Vibrio anguillarum* A型株のホルマリン死菌をワクチンとしてエビに投与した場合に、交差感染防御効果がみられるかどうかについても検討した。

2 材料および方法

2.1 供試エビ

平均体重15gのクルマエビを用いた。実験期間中、市販の配合飼料を体重の0.5%となるように投与した。実験期間中の水温は21℃～23℃であった。

2.2 製法による有効性の差異

各種ワクチンの製法は図1に示すとおりである。クルマエビのビブリオ病原菌 NU-1 株を用いて、前報²⁾と同様に25℃で24時間培養後、その一部を100℃で2時間加熱して加熱死菌ワクチンを作製した。残りの培養液に0.5%となるようにホルマリンを添加して、ホルマリン不活化ワクチン、菌体ワクチン、培養上澄みワクチンおよび菌体破壊ワクチンの合計5種類を作製した。ワクチン投与は、これらのワクチンを海水で10%に希釈して、エアレーションをしながら10分間供試エビを浸漬して行った。菌体および菌体破壊ワクチンの場合には、菌体を収集したワクチン液量に換算して10%希釈溶液とした。対照区にはワクチンを投与していない無処理のエビを用いた。供試エビは各区18～20尾とした。

2.3 各種 *Vibrio* 属細菌で調製したワクチンの有効性

アユのビブリオ病原菌である *V. anguillarum* V-36 株、クルマエビの病原菌で色素産生性の *Vibrio* sp. YK-2 株および前述の NU-1 株を前報²⁾と同様の方法を用いて培養し、それぞれからワクチンを作製した。なお、*V. anguillarum* の培養には1%食塩加ブイオン（日水）を用いた。これら3種類のワクチンをそれぞれ1%濃度となるように海水で希釈し、供試エビを1時間エアレーションをしながら浸漬した。対照区にはワクチンを投与していない無処理のエビを用いた。供試エビは各区18～20尾とした。

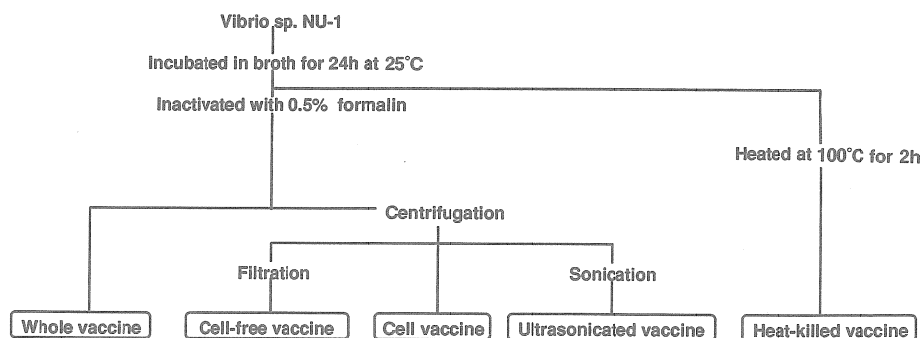


Fig. 1. Scheme for the vaccine preparation procedure.

2.4 経口ワクチンの有効性

クルマエビのビブリオ病ワクチンを遠心分離で集菌・洗浄した後、菌体を成エビ用餌料と混合して乾燥ペレットを作製した。投与量は1日に供試エビ体重1kgあたり菌体湿重量にして約0.5gとし、2週間連続投与した。対照区には菌体を含まないペレットを投与した。各区18尾ずつを供試した。

2.5 有効性の判定法

製法による有効性の差異(2.2), および各種 *Vibrio* 属細菌で調製したワクチンの有効性(2.3)の各実験においてはワクチン投与2週間後に、また経口ワクチンの有効性ではワクチン投与終了2週間後に、それぞれクルマエビのビブリオ病原菌を用いて前報²⁾と同様の方法で生菌による人為感染実験を行った。攻撃後10日間飼育して斃死の有無を観察し、斃死エビから菌の分離を試みた。

3 結果

3.1 製法による有効性の差異

いずれの区においても、ワクチン投与後の供試エビの摂餌活動や遊泳状態に異常はみられなかった。飼育期間中の斃死は各区とも2~3尾であったが、いずれも飼育水槽からの飛び出しによる事故死であった。

製法による有効性の差異は図2に示すとおりである。生菌攻撃後10日の最終生残率は、菌体破壊ワクチン投与区で66.3%、菌体ワクチンおよび加熱死菌ワクチン投与区ではいずれも65%、上澄みワクチン投与区では60%、ホルマリン不活化ワクチン投与区では43.8%であった。ワクチン無処理の対照区では29.9%であった。斃死した全ての個体からビブリオ病原菌がほぼ純粋に分離された。攻撃に用いた菌数は供試エビ1尾あたり 5.9×10^3 細胞であった。

3.2 異種の *Vibrio* 属細菌で作製したワクチンの有効性

種類の異なる *Vibrio* 属細菌で作製したワクチンの有効性

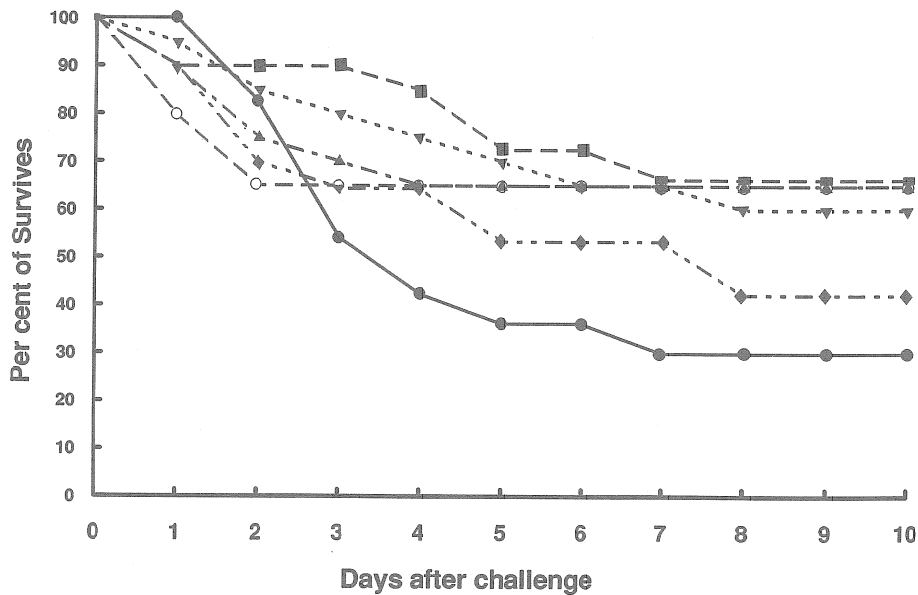


Fig. 2. Effect of the different vaccine preparations of *Vibrio* sp. NU-1. Prawns were immersed in ten per cent vaccine solution for ten minutes.
 ◆, whole vaccine; ▼, cell-free vaccine; ○, cell vaccine; ■, Ultrasonicated vaccine; ▲, heat-killed vaccine; ●, control

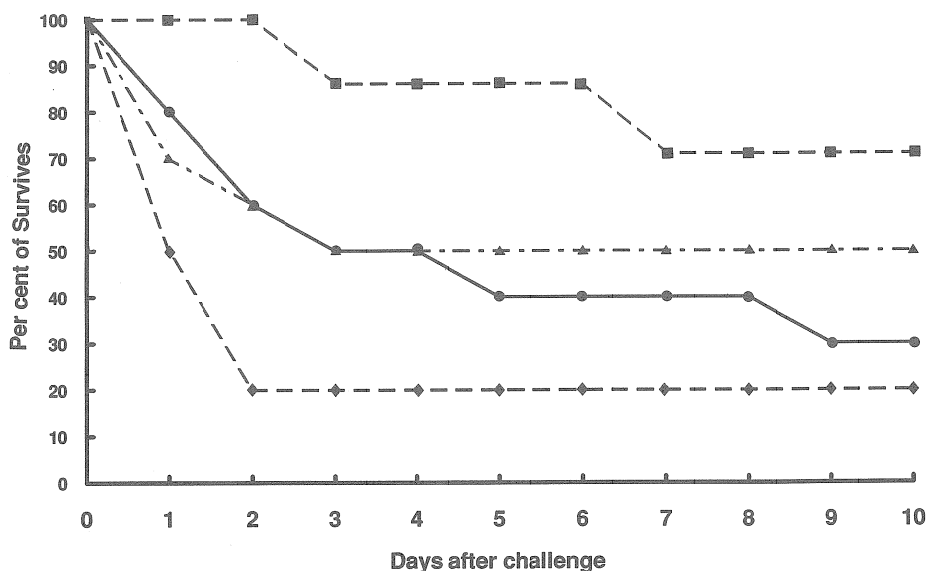


Fig. 3. Effect of different vibrio vaccines. Prawns immersed in one per cent vaccine solution for one hour.

▲, *V. anguillarum* V-36 vaccine; ◆, *Vibrio* sp. YK-2 vaccine; ■, *Vibrio* sp. NU-1 vaccine; ●, control

の差異は図3に示すとおりである。生菌攻撃後10日後の最終生残率は、NU-1株ワクチンに浸漬した群では71%、V-36株ワクチン投与区では50%およびYK-2株ワクチン投与区では20%であった。ワクチンを投与していない対照区では30%であった。斃死した全ての個体からピブリオ病原菌がほぼ純粋に分離された。攻撃に用いた菌数は供試エビ1尾あたり 8.1×10^3 細胞であった。

3.3 経口ワクチンの有効性

経口ワクチンの有効性の差異を図4に示した。生菌攻撃後10日後の最終生残率は、ワクチン投与区と対照区でいずれも22.2%であった。斃死した全ての個体からピブリオ病原菌がほぼ純粋に分離された。攻撃に用いた菌数は供試エビ1尾あたり 2.6×10^3 細胞であった。

4 考察

ワクチンの製法による有効性の差異については、菌体破壊ワクチン、菌体ワクチン、加熱死菌ワクチンおよび上澄みワクチンではいずれも有効性が認められた。しかし、ホルマリン不活化ワクチンでエビを10分間浸漬したところ、前報¹⁾と同様に有効性はほとんど認められなかった。この

ことから、10%ワクチンで10分間エビを浸漬する場合は、前四者のワクチンを用いる必要があることが明らかとなった。また、加熱死菌ワクチンの有効性が高かったことから、ワクチンとしての有効成分は耐熱性の成分であると考えられる。アユのピブリオ病に対する *V. anguillarum* の加熱死菌ワクチンが経口投与方法³⁾や噴霧法⁴⁾の免疫原として有効であることが知られているが、クルマエビのピブリオ病ワクチンの場合も同様であることが明らかとなった。菌体破壊ワクチンや菌体ワクチンの有効性が高かったことから、ワクチンの有効成分は菌体自身にもあることが明らかとなった。また、上澄みワクチンの有効性も高かったことから、菌体の自己融解成分や菌体外酵素が培養液中に産生され、これらが有効成分として作用するのではないかと考えられる。このような培養液中にも免疫原性が見られる現象はアユのピブリオ病ワクチンでも報告されている⁵⁾。これらの結果から、培養菌液の耐熱性成分、菌体成分および培養液成分からワクチンとしての有効成分を抽出して、より有効性の高いワクチンを今後開発する必要がある。

経口ワクチンを投与して、生菌攻撃を行ったところワクチン投与区の最終生残率は対照区のそれと差のないことから、経口ワクチンの有効性はほとんどないと考えられる。

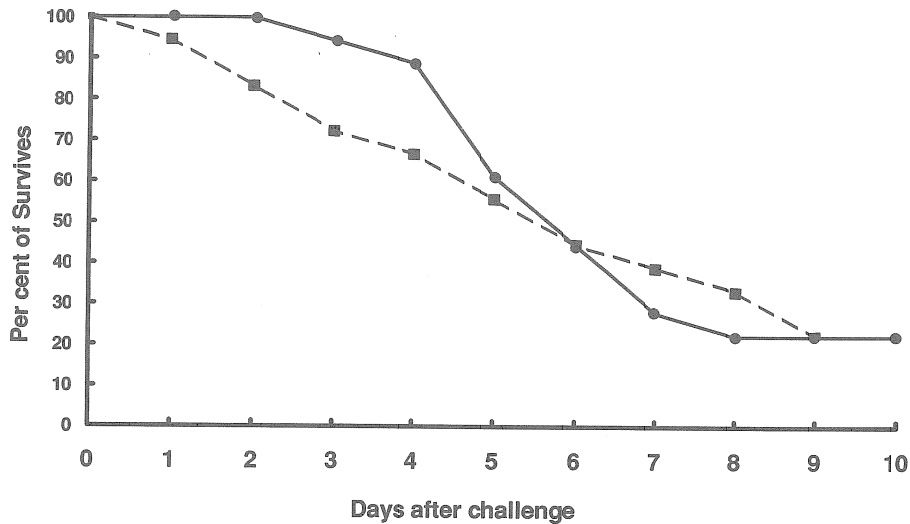


Fig. 4. Efficacy of the oral vaccination. Prawns were fed 0.5g wet-packed cells of NU-1 / kg prawn / day for 14 days.
 ■, orally vaccinated; ●, control

アユのピブリオ病に対する経口ワクチンの有効性は川合ら³⁾によって明らかにされている。すなわち、人為感染試験に対しては、アユ体重1kgあたり1日にピブリオ菌体を湿菌量にして0.4gを30日間連続投与した場合に、感染防御効果がみられているが、自然感染試験に対しては、アユ体重1kgあたり1日に0.1gを14日間投与した場合に、感染予防効果が観察されている。著者らの実験では、人為感染試験に対するワクチンの投与量はエビ体重1kgあたり1日に0.5gで14日間であり、川合らの人為感染試験の場合と比較して約半分の投与量であることから、全体の投与量が少ないために、ワクチン投与による明らかな予防効果がみられなかったことも考えられる。今後、投与量を増加させてワクチンの効果を判定する必要がある。しかし、一般に十分な予防効果を獲得するためには、経口ワクチンは浸漬法ワクチンと比較すると大量の培養液を要する⁶⁾ことから、実用化は困難ではないかと考えられる。

McKay ら⁷⁾は crayfish *Parachanna bicamatus* に *Salmonella typhirium* の死菌体を注射によって免疫したのち、病原性 *Pseudomonas* sp. で人為感染による攻撃を行なった場合に、感染予防効果がみられたことから、crayfish のような無脊椎動物では脊椎動物ほど免疫反応が特異的でなく、比較的広い範囲の病原体に対しても感染予防効果をもつ

ではないかとしている。そこで、著者らはアユのピブリオ病原菌である *Vibrio anguillarum* (A型) とクルマエビの病原菌で色素産生性の *Vibrio* sp. を用いてワクチンを作製して、それぞれから1%ワクチンを調整してクルマエビに投与した後、人為感染実験を行った。その結果、クルマエビのピブリオ病原菌で作製したワクチンを投与したエビの生残率が71%と最も高かったが、色素産生性 *Vibrio* sp. ワクチンを投与したエビでは対照区の生残率と差異は見られず、有効性は確認できなかった。このことから、色素産生性 *Vibrio* sp. ワクチンはエビに有効なワクチン効果を賦与しないと考えられる。*Vibrio anguillarum* で作製したワクチンを投与したエビの生残率は50%と、クルマエビのピブリオ病原菌で作製したワクチン投与区と対照区との中間的な生残率を示したことから、本ワクチンは若干の交差感染防御効果を誘導できるのではないかと考えられる。このような、ワクチンによる交差感染防御性はワクチンを構成する菌体の免疫抗原の共通抗原に由来するのか、あるいはエビの抗原認識機構が脊椎動物ほど特異的でないことに起因するのかは明らかではない。しかし、McKay ら⁷⁾の主張のように、交差防御性がエビ類の抗原認識に対する特異性の低さに起因するとすれば、ワクチン作製に用いる抗原は病因となる当該病原菌だけではなく、もっと広い範囲でよ

り有効性の高い抗原を用いればよいことを意味する。このことは、エビのワクチンの開発には重要な知見であると考えられ、エビの生体防御機構の詳細な検討が必要であることを示唆している。

以上の結果から、10%ワクチンとしては菌体破壊ワクチン、菌体ワクチン、加熱死菌ワクチンおよび上澄みワクチンの有効性が高いことが明らかとなった。しかし、経口ワクチンの有効性は全く認められないことから、今後経口ワクチンに適したワクチンの開発や免疫賦活剤の投与試験が必要である。また、他種のビブリオ属細菌で作製したワクチンをエビに投与して、ビブリオ病原菌による攻撃実験を行ったところ、弱い交差感染防御性が *V. anguillarum* ワクチンに認められた。このことから、今後より有効性の高いワクチンの開発を検討する際には、当該病原菌だけではなく、さらに広い範囲の菌種について検討する必要があるものと考えられる。

文 献

- 1) 伊丹利明・閻 愚・高橋幸則：水産大研報，**40**，83-87(1992).
- 2) T. Itami, Y. Takahashi and Y. Nakamura: *J. Aquatic Animal Health*, **1**, 238-242 (1989).
- 3) 川合研児：高知大学農学部紀要，**44**，1-80 (1985).
- 4) 伊丹利明・楠田理一：日水誌，**46**，699-703 (1980).
- 5) 伊丹利明・楠田理一：日水誌，**46**，533-536 (1980).
- 6) M. T. Horne and A. E. Ellis: Strategies of Fish Vaccination, in "Fish Vaccination" (ed. by A. E. Ellis), Academic Press, London, 1988, pp. 55-66.
- 7) D. McKay and C. R. Jenkin: *Immunology*, **17**，127-137 (1969).