

抗ウイルス鶏卵抗体（IgY）による受動免疫効果に関する研究-I コイにおける抗コイヘルペスウイルス IgY の受動免疫効果

矢田 裕美・安田 雅大・宮崎 照雄*

三重大学大学院生物資源学研究科 生物圏生命科学専攻 水圏生物生産学講座 水族病理学研究室

Studies on Passive Immunization with Anti viral IgY-I Passive Immunization with Anti Koi Herpesvirus IgY in Koi

Hiromi YATA, Masahiro YASUDA and Teruo MIYAZAKI*

Laboratory of Fish Pathology, Graduate School of Bioresources, Mie University

Abstract

Koi herpesvirus (KHV) disease causes mass mortalities in the world, however there is no ways to treat this disease. We tried passive immunization by intramuscular injections with anti KHV-IgY (Immunoglobulin Yolk=Egg yolk antibody) in order to protect koi from KHV infection. Injected IgY containing anti KHV-IgY was absorbed into the blood serum at high concentration in day 1 after three injections, which was maintained to day 14. The immunized fish were challenged by immersion with cultured KHV in day 1 and were protected from KHV infection at 95% RPS. The results indicate that passive immunization using anti KHV-IgY is effective to protect koi from KHV.

Key Words: passive immunization, egg yolk antibody, koi herpesvirus, anti KHV-IgY

緒言

魚類養殖において、細菌感染症はもとよりウイルス感染症も大きな減耗要因にあげられる。鶏卵抗体（IgY）を用いた細菌感染症の予防対策はこれまでに報告されているが¹⁻³⁾、IgYを用いた魚類におけるウイルス病予防の報告はまだ無い。コイの最重要疾病であるコイヘルペスウイルス（KHV）病は、KHVが鰓薄板の呼吸上皮細胞に感染し、そこで増殖したKHVが鰓薄板毛細血管に入り、ウイルス血症を起こし、腎臓造血組織、脾臓脾細胞、肝臓肝細胞、心臓心筋細胞、脳神経細胞に感染して、感染細胞を壊死させることで、感染魚を斃死させる⁴⁻⁵⁾。能動免疫によるKHV

の感染防御はリポソームワクチンの経口投与で効果が確認されている⁶⁾。このリポソームワクチンは大量のKHVが必要となるが、KHVの大量培養法は確立していない。本研究では大量生産が可能な抗KHV鶏卵抗体を用いた受動免疫法の可能性を検討した。

材料および方法

供試魚

本実験には新潟県下養鯉場および三重県下養鯉場から分与を受けたニシキゴイ *Cyprinus carpio* 当歳魚を供した。

2013年6月20日受理

〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577

* for correspondence (miyazaki@bio.mie-u.ac.jp)

KHV

本実験には、茨城県霞ヶ浦で発生した KHV 病自然発病魚から分離した KHV (IKC 03 株) を東京海洋大学福田穎穂教授より分与を受け、培養したものをを用いた。KHV は、Hedrick ら⁷⁾の方法に従い KF-1 細胞で培養し、経鰓感染法により人為的に感染させた魚の鰓から分離した。KHV の分離は、鰓の 10 倍量 (g/g) の MEM-5 (5% 仔牛血清, 7.5% NaHCO₃, 0.5% L-グルタミン添加 Eagle's minimum essential 培地) を加え、十分に摩砕した後、3000 xg・15 分間遠心分離後、上清をメンブレンフィルター 450 nm (Advantec) で濾過滅菌し、これを KHV 懸濁液とした。

抗 KHV-IgY

KHV 感染症防衛実験に使用した抗 KHV-IgY の作製は、株式会社ゲン・コーポレーションに依頼し、雌鶏に KHV を接種し、卵から得られた抗 KHV-IgY 含有 IgY 粉末製剤を実験に供した。IgY 純度は 66.3%、特異抗体価は 8000/mg であった。

2% IgY 水溶液を筋肉内注射したコイの血清中総 IgY 濃度の測定

平均体重 88 g のニシキゴイをコンテナに 5 尾収容した。滅菌生理食塩水を用いて 2% IgY 水溶液を作製し、1 尾当たり 0.3 mL を 1 mL のシリンジ (テルモ, 日本) と 26 G の注射針 (テルモ, 日本) を用いて 3 日間筋肉内注射により投与した。3 日間で投与した IgY 量は 1 尾当たり 10.8 mg と算出された。

投与後 1, 3, 5, 7, 14 日後に尾静脈より 1 回につき 0.3 mL 採血した。血清は、以下の方法で得た。20 ppm キナルジンで麻酔を施したニシキゴイの尾静脈より 1 尾あたり 0.3 mL ずつ 1 mL のシリンジと 21 G の注射針を用いて採血を行い、採取した血液は室温で 1 時間静置し、4°C で 3 時間静置した後、3,000 xg, 15 分間遠心分離を行なって血清を得た。得られた血清は総 IgY 濃度を測定するまで -20°C で保存したのち、IgY を ELISA 法により測定した。

2% IgY 水溶液を筋肉内注射したコイの受動免疫効果の検討

抗 KHV-IgY 受動免疫区と非投与対照区を設け、

平均体重 26 g のニシキゴイを各区 30 尾ずつ収容した。

抗 KHV-IgY 受動免疫区には、菌生理食塩水を用いて 2% 抗 KHV-IgY 水溶液を作製し、1 尾当たり 0.18 mL を 1 mL のシリンジと 26 G の注射針を用いて 3 日間筋肉内注射によって投与した。非投与対照区には生理食塩水を注射した。1 尾当たりの抗 KHV-IgY 総投与量は 7.16 mg と算出された。抗 KHV-IgY 投与翌日に KHV で攻撃実験を行った。安田の修士論文⁸⁾に従い、半数致死量の濃度となるように希釈した KHV 懸濁液 5 L に受動免疫した 30 尾のコイを 1 時間浸漬し、その後コンテナ水槽に収容して、斃死状況を毎日観察した。対照区は、ウイルス液を含まない水を用いて、同様に処理した。

なお、抗 KHV-IgY の有効性については有効率 (%) ($1 - (\text{IgY 受動免疫区の死亡率} / \text{抗 KHV-IgY 非投与区の死亡率}) \times 100$) で求めた。

2% IgY 水溶液を経口投与したコイの血清中総 IgY 濃度の測定

平均体重 50 g のニシキゴイをコンテナに 5 尾収容した。滅菌生理食塩水を用いて 2% IgY 水溶液を作製し、1 尾当たり 0.3 mL を 3 日間経口挿管により投与した。3 日間で投与した IgY 量は 1 尾当たり 10.8 mg と算出された。投与後 1, 3, 5, 7, 14 日後に尾静脈より 0.3 mL 採血した。採取した血液は室温で 1 時間静置し、4°C で 3 時間静置した後、3,000 xg・15 分間遠心分離を行って血清を得た。血清中総 IgY 濃度を ELISA 法により測定した。

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) 法による総 IgY 濃度の測定

血清中総 IgY 量を測定には Chichen IgG ELISA Quantitation Kit (Bethly Laboratories, inc) を用いた。固相抗原となる goat anti-Chichen IgG-Fc (1 μg/mL) (AbD serotec) 50 μL にグリセリン 50 μL を添加したものを 0.05 M Na-carbonate buffer pH 9.6 にて 100 倍希釈し、96 穴のマイクロプレート (Immulon® 2 HB) に 100 μL ずつ入れ、4°C で一晩固相化した。

その後 PBS-T (PBS に 0.05% Tween-20 を添加) 200 μL (以下洗浄は全て 200 μL で行った)

で1回洗浄し、3% BSA PBS-T (PBS-T に3% bovine serum albumin (Sigma) を添加) を1well 当たり 150 μ L 入れた後、25 $^{\circ}$ C にて1時間ブロッキングした。PBS-T で3回洗浄し、検出可能範囲まで PBS-T にて段階希釈した各検体を 100 μ L ずつ入れ、25 $^{\circ}$ C にて1時間反応させた。なお、Blank well には PBS-T を1well 当たり 100 μ L ずつ入れた。

その後 PBS-T で4回洗浄し、PBS-T にて20,000倍希釈した goat anti-chicken IgG HRP 標識抗体 (HRP goat anti-chicken IgG (H+L)) (Zymed) を、1well 当たり 100 μ L ずつ入れた後、25 $^{\circ}$ C にて1時間反応させた。

PBS-T にて5回洗浄を行い、発色基質 (O-Phenylenediamine Tablets (Sigma) 1 tablet, 0.2 M Na_2HPO_4 12.5 mL, 0.1 M Citric acid 12.5 mL, 30% H_2O_2 5 μ L) を用時調製して、1well 当たり 100 μ L 入れた後、アルミホイルで遮光して25 $^{\circ}$ C にて20分間発色反応させた。

3 N H_2SO_4 を1well 当たり 100 μ L ずつ入れて発色を停止させ、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Model 680) 490 nm, 630 nm の波長にて吸光度を測定した。

Reference Serum より得られた標準曲線から総 IgY 濃度を求めた。

結 果

2% IgY 水溶液を筋肉内注射したコイの血清中総 IgY 濃度の推移

2% IgY 水溶液を筋肉内注射したコイの血液中に取り込まれた総 IgY 濃度を測定した (図1)。血清中総 IgY 量は、IgY 投与後1日目で550.7~1002.0 μ g/mL, 平均808.5 μ g/mL であった。IgY 投与後3日目では608.7~971.0 μ g/mL, 平均741.0 μ g/mL となり1日目から3日目にかけて総 IgY 濃度が増加した。これは筋肉中に残留していた IgY が後から血液中に溶け出したためと考えられる。その後は IgY 投与後5日目で358.1~866.3 μ g/mL, 平均591.4 μ g/mL となった。血清中 IgY 濃度は減少していたが、IgY 投与後7日目で335.0~681.5 μ g/mL, 平均456.5 μ g/mL、投与後14日目で125.3~201.5 μ g/mL, 平均173.5 μ g/mL の IgY が残存していた。

2% 抗 KHV-IgY を筋肉内注射したコイの受動免疫効果の検討

感染防御実験の結果、非 IgY 投与対照区では10日目に1尾が死亡、その後も連日死亡し、23日目には合計17尾、27日目には合計20尾が死亡に至った。攻撃一ヶ月後の累積死亡率は66.7%となった。一方、抗 KHV-IgY 受動免疫区では24日目に1尾が死亡に至ったが、残りの29尾は

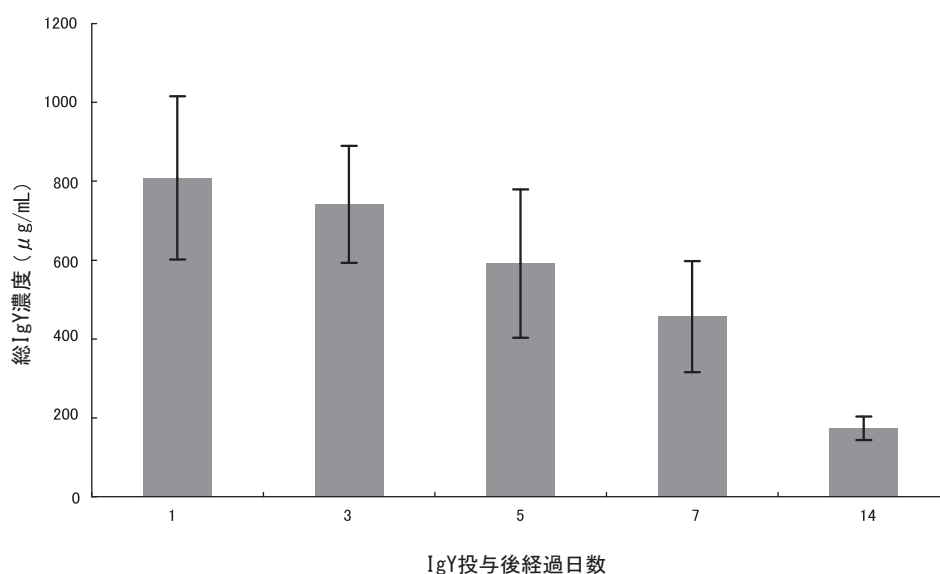


図1. 2% IgY 水溶液の筋肉内注射による血清中総 IgY 濃度 (平均値±標準偏差)

生存し、最終的な累積死亡率は 3.3 % となった (図 2)。その結果、有効率は 95.05 % で、抗 KHV-IgY 受動免疫区と非投与対照区で有意な差が見られた。

2 % IgY 水溶液を経口投与したコイの血清中総 IgY 濃度の推移

2 % IgY 水溶液を経口挿管で投与したコイの血液中に取り込まれた総 IgY 濃度を測定した (図 3)。血清中総 IgY 濃度は、IgY 投与後 1 日目で 0.3192 ~ 0.9466 $\mu\text{g/mL}$ 、平均 0.5360 $\mu\text{g/mL}$ であった。その後、IgY 投与後 3 日目で 0.1916 ~ 0.5336 $\mu\text{g/mL}$ 、平均 0.3369 $\mu\text{g/mL}$ 、IgY 投与後 5 日目で 0.1828 ~ 0.3373 $\mu\text{g/mL}$ 、平均 0.2616 $\mu\text{g/mL}$ とな

り、全ての個体で総 IgY 濃度の減少が見られた。IgY 投与後 7 日目では 0.1616 ~ 0.3323 $\mu\text{g/mL}$ 、平均 0.2342 $\mu\text{g/mL}$ と投与後 1 日目の半量以下となり、投与後 14 日目には 0.0674 ~ 0.1448 $\mu\text{g/mL}$ 、平均 0.1165 $\mu\text{g/mL}$ とさらに減少していた。

考 察

抗 KHV-IgY 含有 IgY を用いた受動免疫による KHV 感染防御のためには、KHV の感染様式^{4,5)} を勘案すれば、抗 KHV-IgY を筋肉内注射あるいは経口投与により血清中に取り込ませることが必須となる。そこでコイに IgY を筋肉内注射し、血清中への吸収量および残存期間を測定することにした。投

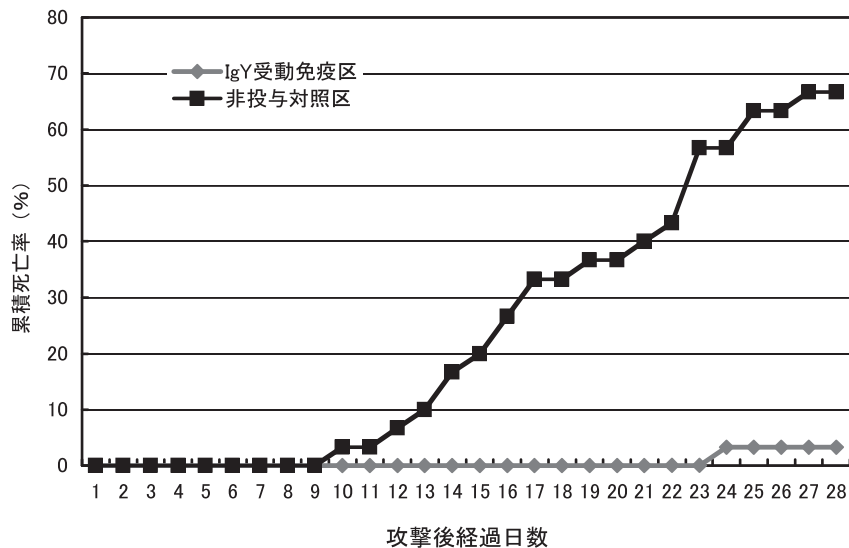


図 2. 抗 KHV-IgY による受動免疫効果。コイヘルペスウイルス感染防御実験における累積死亡率

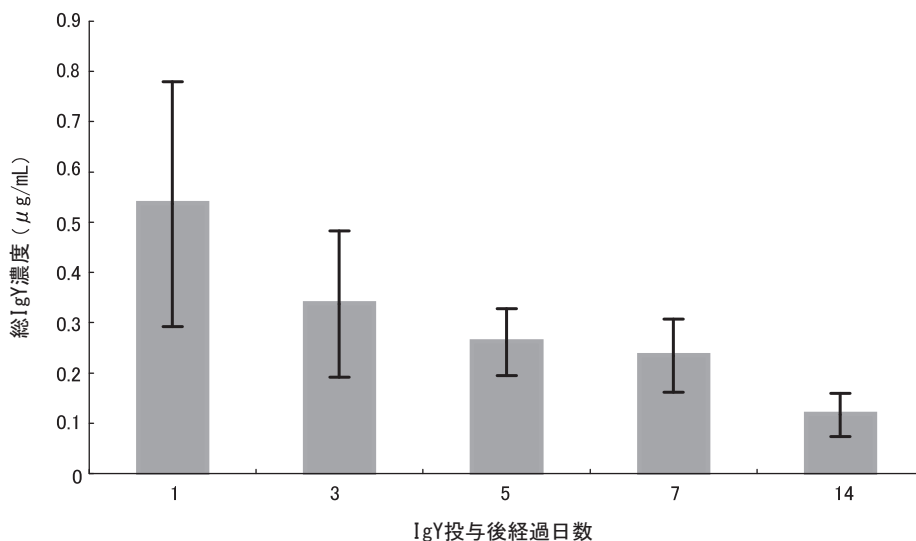


図 3. 2 % IgY 水溶液の経口投与による血清中総 IgY 濃度の測定 (平均値 ± 標準偏差)

与実験の結果、総投与量 12.27 mg/100 g 魚体重で投与した場合、1 日目の血液中総 IgY 濃度は平均 809 $\mu\text{g/mL}$ となり、その後血液中総 IgY 量は経時的に減少するが、IgY 投与後 7 日目で平均 456.5 $\mu\text{g/mL}$ 、投与後 14 日目で平均 173.5 $\mu\text{g/mL}$ の IgY が残存していることが確認された。この投与実験から、注射法により IgY が高濃度で体内に取り込まれることが実証された。この投与実験結果に基づき、コイの重要疾病であるコイヘルペスウイルス病対策に抗 KHV-IgY の受動免疫が効果的かどうかを検討した。抗 KHV-IgY 含有 IgY の筋肉内注射で受動免疫を施したコイに対してコイヘルペスウイルスの攻撃を行い、斃死状況を観察した。その結果、受動免疫区のコイでは累積死亡率は 3.3 % となり、非投与対照区の累積死亡率 66.7 % と比較して生残率が高くなった（有効率 95.05 %）。このことから、筋肉内注射による抗 KHV-IgY の投与は、コイヘルペスウイルスの有効な感染防御を可能にすると実証された。1 尾ずつ抗 KHV-IgY を注射する必要があるものの、1 尾当たりの単価が高い錦鯉などの高級魚において注射法は利用可能であると考えられる。

反面、1 尾ずつ注射することは時間と手間がかかり、多量の魚を飼育している養殖場において一尾ずつ注射することは現実的ではない。投与法をより簡便で安全な経口投与法に変えて IgY の吸収実験を試みた。実験では消化管に確実に規定量の IgY を確実に入れるため、魚の口からゾンデを挿管し、腸管へ直接 IgY 水溶液を流し込む経口挿管法を選択した。その結果、IgY 総投与量 21.6 mg/100 g 魚体重で投与した場合、投与後 1 日目の血清中総 IgY は平均 0.5360 $\mu\text{g/mL}$ でしかなく、経口投与法では IgY の血液中への取り込みは注射法の約 1000 分の 1 にとどまることが確認された。この結果は、抗 KHV-IgY の経口投与では、KHV の感染防御に有効な血清濃度を得ることは不可能であることを示している。

以上の研究結果から、コイヘルペスウイルス病の対策に抗 KHV-IgY を用いた受動免疫が有効であることが実証できた。

文 献

- 1) LEE S.B., MINE Y., and STEVENSON R.M. (2000) Effects of hen egg yolk immunoglobulin in passive protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri*. J. Agric. Food Chem., **48** : 110-115
- 2) ARASTEH N., AMINIRISSEHEI A-H., YOUSIF A. N., and ALBRIGHT L. J., DURANCE TD (2004) Passive immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with chicken egg yolk immunoglobulins (IgY). Aquaculture, **231** : 23-36
- 3) 福村加奈子 (2008) コイにおける *Edwardsiella tarda* 感染症に対する抗 *E. tarda*-IgY の受動免疫効果. 三重大学修士論文
- 4) MIYAZAKI T., KUZUYA Y., YASUMOTO S., YASUDA M, and KOBAYASHI T. (2008) Histopathological and ultrastructural features of koi herpesvirus (KHV) -infected carp *Cyprinus carpio*, and the morphology and morphogenesis of KHV. Dis. Aquat. Org. **80** : 1-11
- 5) 宮崎照雄 魚病アトラス・下巻 水産新潮社 (2007)
- 6) YASUMOTO S., KUZUYA Y., YASUDA M., YOSHIMURA T., and MIYAZAKI T. (2006) Oral immunization of common carp with liposome vaccine fusing koi herpesvirus antigen. Fish pathol. **41** : 141-145
- 7) HEDRICK R.P.O., GILAD O., YUN S., and SPANGENBERG J.V. (2000) A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of a common carp. J. Aquat. Anim. Health. **12** : 44-57
- 8) 安田雅大 (2008) コイヘルペスウイルス病に対する抗 KHV-IgY の受動免疫効果. 三重大学修士論文