

コイにおける *Edwardsiella tarda* に対する免疫反応-I 不活化ワクチンと生菌ワクチンによる能動免疫効果

島田 真央・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

Immune Responses to *Edwardsiella tarda* in Koi-I Studies on Active Immunization with Formalin-killed Bacterin and Live Bacteria of *E. tarda* in Koi

Mao SHIMADA, Teruo MIYAZAKI*

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

Abstract

We performed active immunization by intramuscular injections with formalin-killed bacterin and live bacteria of *E. tarda* in koi *Cyprinus carpio*, and examined the specific antibody titer and the effectiveness by challenge with virulent bacteria. The mean titer of serum antibody was 214 in koi (n=5) vaccinated by bacterin, and 512 in koi (n=5) vaccinated by live bacteria with low virulence, indicating the successful immunization. After challenge with virulent bacteria, survival ratio was 32 % in koi (n=19) vaccinated with bacterin whereas 70% in the control (n=20), resulted in no effectiveness. On the other hand survival ratio was 94 % in koi (n=16) vaccinated with live bacteria whereas 27% in the control (n=15), resulted in definite effectiveness of immunization (RPS=91.8%). These results determined that the vaccination using live bacteria with low-virulence induced the definitely effective immunization in koi.

Key Words: *Edwardsiella tarda*, active immunization, formalin-killed bacterin, live bacteria, koi

緒 言

Edwardsiella tarda (以下 *E. tarda* とする) は養殖のニホンウナギ, ヒラメ, マダイ, テラピア等にパラコロ病あるいはエドワジエラ症を引き起こす病原細菌である¹⁻⁶⁾。そのうち, ニホンウナギとヒラメの *E. tarda* 感染症は, 侵入細菌に対して好中球が反応する化膿性炎を主病徴とするのが特徴である。いずれの魚種でも養殖場で発生すると, 短期間に大量斃死が起こることは少ないが, 高水温期に長期間にわたって死亡が継続するため, 累積死亡率が高くなる⁶⁾。そのため, 養殖産業にお

いて重大な疾病の一つとなっている。エドワジエラ症の防疫対策としては, 大部分を抗菌性医薬品等に頼っているのが現状である。しかし, これら抗菌性医薬品等の使用は従来から指摘されているように多剤耐性菌の増加を促進し, 魚病対策を困難にしてきた⁷⁾。さらに, 近年では消費者の食の安全性に対する意識が高まり, 食品衛生の観点から魚体内への薬剤残留が食品衛生上の観点から問題となる事が多く, 薬剤に頼らない, 免疫法などによる有効な予防対策が求められている。

E. tarda ホルマリン不活化ワクチンおよび *E. tarda* 由来 Lipopolysaccharide の注射による能動免疫に

よって好中球の貪食能が高まることから⁸⁾、免疫効果が期待されたことがあった。しかしながら、馬久地ら⁹⁾は、ヒラメのエドワジエラ症に対するホルマリン不活化ワクチンについての研究を行い、免疫を行うことにより抗体価の上昇は見られるものの、エドワジエラ症に対する明瞭な防御効果は認められなかったとしている。

本研究では、免疫効果の薄いホルマリン不活化ワクチンにかわるワクチンとして生菌ワクチンを開発し、その免疫効果を比較検討した。本研究では、コイを用いた。*E. tarda* はコイに自然感染を起こすことはなく、コイは自然抗体を持つことがないことから、免疫実験に用いる利点は大きい。また、福村¹⁰⁾ (2008)によれば、実験的にコイは*E. tarda* に対して感受性を示し、斃死に至ること、*E. tarda* を接種することにより膿瘍の形成と膿瘍内の好中球による食菌および細胞内細菌増殖など*E. tarda* 感染症の病理学的特徴が再現されることが報告されている。この事実から、コイを*E. tarda* 感染症の実験モデルとすることは妥当といえる。

本研究では、*E. tarda* 培養株をホルマリン処理して作製した不活化ワクチンおよび弱病原性化した*E. tarda* 生菌ワクチンを筋肉内接種することにより、コイに能動免疫を施し、*E. tarda* 生菌で攻撃実験を行って、免疫効果を検討した。

供試細菌

三重県下ヒラメ養殖場で発生した腹水貯留、脱肛等が認められた典型的なエドワジエラ症のヒラメ病魚の腎臓から Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地 (日水) を用いて分離培養し、1コロニーを選抜して菌株を得た。分離菌株が*E. tarda* であるとは抗*E. tarda*-IgY (太陽化学) を用いて、凝集反応により判定した。

ホルマリン不活化ワクチンの作製には、分離培養した菌株を用いた。また、生菌ワクチンの作製には、選抜して得た菌株を Heart Infusion (HI) 寒天培地 (日水) で繰りかえし継代培養を重ねることにより弱毒化した株を、弱病原性株として本実験に供した。なお、弱病原性株は 10^7 CFU/mL に調整した細菌懸濁液をコイの筋肉内に体重の0.5%量となるように接種した時、斃死率は0%であることを確認した。

供試魚

実験には、三重県下養鯉場および、山口県下関市の独立行政法人水産大学校から分与をうけたコイ (*Cyprinus carpio*) 当歳魚を供した。実験中の飼育水温は25℃に設定した。

1 a. ホルマリン不活化ワクチンの作製と能動免疫実験

BHI 液体培地を用いて、*E. tarda* を25℃で培養した。培養72時間後、ホルマリン (0.5 v/v 添加) により不活化させた。その後 $3000 \times g \cdot 15$ 分間遠心分離を行い、沈殿物を滅菌生理食塩水で1回洗浄し、沈殿物を滅菌生理食塩水に再懸濁し分光高度計 (日立) を用いて菌数を調製した菌体懸濁液をワクチンとして実験に供した。100 L 容量のパンライト水槽に平均体重20gのコイを免疫区20尾、対照区20尾に分けて収容した。免疫区のコイには、滅菌生理食塩水を用いて 5×10^6 CFU/mL に調整したワクチンを、体重の0.5%量となるように尾部の筋肉内に接種した。その10日後、ブースターとして、同様にワクチンを追加接種した。対照区のコイには、滅菌生理食塩水のみを同様に注射した。最初のワクチン接種から21日目に、 5×10^7 CFU/mL に調整した*E. tarda* 生菌懸濁液を体重の0.5%量となるように尾部の筋肉内に接種することで攻撃実験を行った。能動免疫の有効性については、生菌攻撃後に発生した斃死・瀕死魚数をもとに、有効率 (%) (RPS = (1 - ワクチン投与区の死亡率 / ワクチン非投与区の死亡率) \times 100) を用いて評価した。

1 b. ホルマリン不活化ワクチンを用いて能動免疫を施したコイにおける特異抗体価測定

100 L 容量のパンライト水槽に、平均体重60gのコイを5尾収容し、滅菌生理食塩水を用いて 5×10^6 CFU/mL に調整したワクチンを、体重の0.5%量となるように尾部の筋肉内に接種した。その10日後、ブースターとして、同様にワクチンを追加接種した。最初のワクチン接種後21日目に、コイの尾静脈より、1尾あたり0.3 mL ずつ採血を行った。採取した血液は室温で1時間静置し、さらに4℃で一晩静置した後、 $3000 \times g \cdot 10$ 分間遠心分離を行って血清を得た。96穴マイクロタイタープレート (CORNING 社) を用いた血清の2

倍希釈法で、凝集反応を顕微鏡観察することによって、血清内特異抗体価を算定した。なお、血清の希釈には滅菌生理食塩水を用いた。

2 a. 生菌ワクチンの作製と能動免疫実験

弱病原性化 *E. tarda* を HI 液体培地を用いて 25 °C で培養した。培養 48 時間後、 $3000 \times g \cdot 15$ 分間遠心分離を行ない、沈殿物を滅菌生理食塩水に再懸濁し分光高度計（日立）を用いて菌数を調製した細菌懸濁液を生菌ワクチンとして実験に供した。100 L 容量のパンライト水槽に平均体重 30 g のコイを能動免疫区 16 尾、対照区 15 尾に分けて収容した。能動免疫区のコイには、滅菌生理食塩水を用いて 5×10^6 CFU/mL に調製した生菌ワクチンを、体重の 0.5 % 量となるように尾部の筋肉内に接種した。その 10 日後、ブースターとして、 3×10^6 CFU/mL の生菌ワクチンを同量追加接種した。対照区のコイには、滅菌生理食塩水のみを同様に注射した。

最初のワクチン接種から 21 日目に、 5×10^7 CFU/mL 生菌懸濁液を体重の 0.5 % 量となるように尾部に筋肉内注射することで攻撃実験を行った。細菌接種後 11 日目まで観察を行った。また、生菌ワクチンによる能動免疫の有効性については、有効率 RPS を用いて評価した。

2 b. *E. tarda* 生菌ワクチンを用いて能動免疫を施したコイにおける特異抗体価測定

100 L 容量のパンライト水槽に、平均体重 20 g のコイを 5 尾収容し、滅菌生理食塩水を用いて 7×10^6 CFU/mL に調製した生菌ワクチンを、体重の 0.5 % 量となるように尾部の筋肉内に接種した。その 6 日後、ブースターとして 5×10^7 CFU/mL の生菌ワクチンを同量追加接種した。

最初のワクチン接種後 27 日目に、採材し、特異抗体価測定した。特異抗体価測定方法は、ホルマリン不活化ワクチンの実験と同様である。

結 果

1. ホルマリン不活化ワクチンによる能動免疫実験

血清中の特異抗体価は、個体差がみられ、5 尾の結果を平均して 214 となり、ホルマリン不活化ワクチンを用いた能動免疫で抗 *E. tarda* 抗体が産生されたと判断された（表 1）。

表 1 *E. tarda* ホルマリン不活化ワクチンを用いて能動免疫をおこなったコイにおける血清内特異抗体価

コイ No.	抗体価
1	32
2	256
3	16
4	512
5	256

ホルマリン不活化ワクチンによる能動免疫実験では、対照区では 20 尾中 14 尾のコイが生残し、生残率は 70 % となった。能動免疫区では 20 尾中 6 尾のコイが生残し、生残率は 32 % となった。能動免疫区のコイでは対照区よりも生残率が低くなり、*E. tarda* 感染症に対する免疫効果は認められなかった（図 1）。

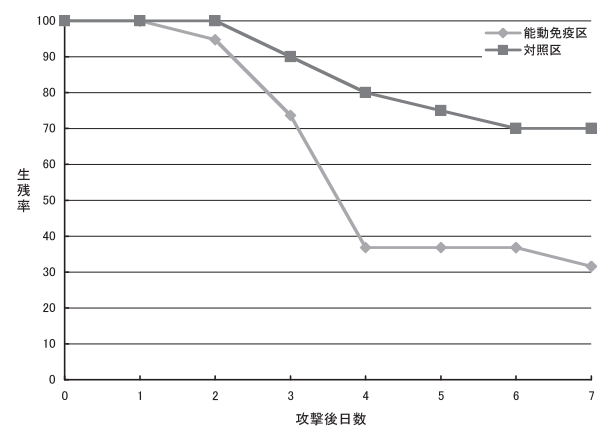


図 1. *E. tarda* ホルマリン不活化ワクチンによる能動免疫の効果

2. 弱病原性化生菌ワクチンによる能動免疫実験

弱病原性化生菌ワクチンで免疫したコイの血清中の特異抗体価は、5 尾全てで 512 となり、生菌ワクチンを用いて能動免疫を行ったことにより高濃度の抗 *E. tarda* 抗体が産生されていた（表 2）。

表2 *E. tarda* 生菌ワクチンを用いて能動免疫を行ったコイにおける血清内特異抗体価

コイ No.	抗体価
1	512
2	512
3	512
4	512
5	512

弱病原性化生菌ワクチンによる能動免疫実験では、対照区では15尾中4尾のコイが生残し、生残率は27%となった。能動免疫区では16尾中15尾のコイが生残し、生残率は94%となった。有効率RPSは計算の結果91.8%となった。能動免疫区のコイでは対照区よりも生残率が有意に高くなっており、弱病原性化生菌ワクチンを用いて能動免疫を行うことにより、*E. tarda* 感染症に対する免疫効果が得られたと判断された(図2)。

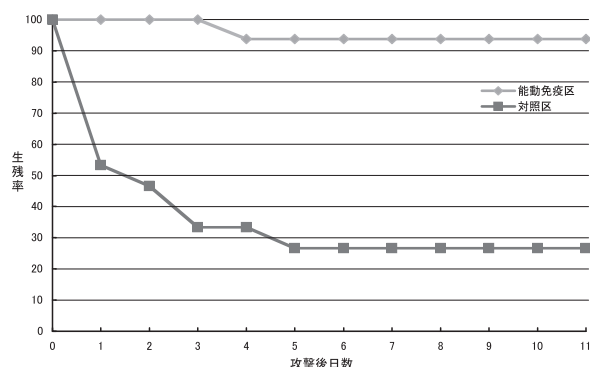


図2. *E. tarda* 生菌ワクチンによる能動免疫の効果

考 察

E. tarda ホルマリン不活化ワクチンを用いた能動免疫について、抗体価の上昇がみられるものの、能動免疫区のコイでは対照区のコイより生残率が低くなり、ホルマリン不活化ワクチンを用いた能動免疫では、*E. tarda* 感染症に対する感染防御効果は期待できないことが確認された。福村¹⁰⁾も同様の結果を得ており、今回の実験においても、このことが確認された。また、馬久地ら⁹⁾は、ヒラメのエドワジエラ症に対してホルマリン不活化ワクチンを用いた能動免疫実験を行い、抗体価の上昇は見られるものの、エドワジエラ症に対する

明瞭な防御効果は認めていない。ホルマリン不活化ワクチンを用いた能動免疫の無効性については、つぎのように考えられる。本来 *E. tarda* は好中球の貪食・殺菌作用に対して抵抗性を持ち、かつ好中球内で増殖できるという特性を持つ¹⁻⁵⁾。また、*E. tarda* ホルマリン不活化ワクチンの注射により能動免疫したニホンウナギの好中球の貪食能が高まるということが *in vitro* 実験で確認されている⁸⁾。これらの事実を考え合わせると、ホルマリン不活化ワクチンによる免疫作用で貪食能が活性化した好中球により *E. tarda* が活発に貪食されるが、殺菌されず、逆に好中球内で増殖した *E. tarda* が全身伝播し、感染魚を斃死に至らせると考えられた。

他方、弱病原性化した細菌から作製した生菌ワクチンを用いた能動免疫では、免疫区のコイでは非免疫対照区のコイより生残率が高くなった。生菌ワクチンを用いて能動免疫を行うことで、*E. tarda* 感染症に対して感染防御効果が得られることが確認された。この理由のひとつに、生菌ワクチンの接種により、高濃度の抗 *E. tarda* 抗体が産生されたことがあげられるが、詳細は今後の検討をまたねばならない。アメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) に感染する同属の *E. ictaluri* でもホルマリン不活化ワクチンおよび生菌ワクチンを用いた免疫の研究がなされているが、ホルマリン不活化ワクチンによる免疫では有効な感染防御は得られていない。他方、生菌ワクチンでは非常に有効な感染防御効果が得られている¹¹⁻¹³⁾。感染防御効果は、体液性免疫に関わる特異抗体産生のみでなく、マクロファージの殺菌活性を高めるなど細胞性免疫も誘導されるためであると考えられている¹²⁻¹³⁾。また、セラピアのエドワジエラ症に対する弱毒化変異株 *E. tarda* を用いた生菌ワクチンの研究においても、生菌ワクチンによる能動免疫効果が確認され、その原因として生菌ワクチンの強い細胞性免疫誘導が考えられている¹⁴⁾。

以上の実験結果より、*E. tarda* ホルマリン不活化ワクチンを用いた能動免疫では、*E. tarda* 感染症に対する免疫効果は期待できないが、*E. tarda* 生菌ワクチンを用いて能動免疫を行うことで、*E. tarda* 感染症に対しての免疫効果が得られることが明らかとなった。今後、生菌ワクチンで能動免疫したコイにおける好中球の *E. tarda* に対する反応を検討し、感染防御機構を解明したい。

文 献

- 1) 宮崎照雄, 江草周三 (1976) ニホンウナギの *Edwardsiella tarda* 感染症の病理組織学的研究-I. 自然感染-化膿性造血組織炎型. 魚病研究 **11**: 33-39
- 2) 宮崎照雄, 江草周三 (1976) ニホンウナギの *Edwardsiella tarda* 感染症の病理組織学的研究-II. 自然感染-化膿性肝炎型. 魚病研究 **11**: 65-77
- 3) 宮崎照雄, 江草周三 (1976) ニホンウナギの *Edwardsiella tarda* 感染症の病理組織学的研究-III. 自然感染-種ウナギ. 魚病研究 **11**: 127-131
- 4) MIYAZAKI T., and KAIGE N. (1985) Comparative histopathology of Edwardsiellosis in fishes. Fish Pathol. **20**: 219-227
- 5) 窪田三朗, 宮崎照雄, 江草周三 (1982) 魚病アトラス (上巻) 新水産新聞社, 東京, pp, 46-54
- 6) 金井欣也, 田脇誠一, 内田洋祐 (1988) ヒラメ養殖における *Edwardsiella tarda* の分布. 魚病研究 **23**: 41-47
- 7) AOKI T. and KITAO T. (1981) Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from fish culture ponds. Fish Pathol. **15**: 277-281
- 8) SALATI F., IKEDA Y. and KUSUDA R. (1987) Effect of *Edwardsiella tarda* lipopolysaccharide immunization on phagocytosis in the eel. Nippon Suisan Gakkaishi **52**: 811-816
- 9) 馬久地隆幸, 清川智之, 本多数充, 中井敏博, 室賀清邦 (1995) ヒラメのエドワジエラ症に対する予防免疫の試み. 魚病研究 **30**: 251-256
- 10) 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. 三重大学大学院生物資源学研究科修士論文
- 11) THUNE R.L., HAWKE J.P., FERNAANDEZ H.D., LAWRENCE M.L. and MOORE M.M. (1997) Immunization with bacterial agents: Edwardsiellosis. Fish Vaccinology (ed. DUDDING R. et al), Karger, New York, 125-134
- 12) SHOEMAKER C.A. and KLESIUS P.H. (1997) Protective immunity against enteric septicemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), following controlled exposure to *Edwardsiella ictaluri*. J. Fish Dis. **20**: 101-108.
- 13) SHOEMAKER C.A. KLESIUS P.H., and EVANS J.J. (2002) In Ovo methods for utilizing the modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine against enteric septicemia in channel catfish. Aquaculture **203**: 221-227.
- 14) IGARASHU A. and IIDA T. (2002) A vaccination trial using live cells of *Edwardsiella tarda* in tilapia. Fish Pathol. **37**: 145-148