

ヒラメのエドワジエラ症に対する予防免疫の試み

馬久地隆幸*¹・清川智之*²・本多数充*³・
中井敏博*³・室賀清邦*³

(1995年6月28日受付)

Vaccination Trials in the Japanese Flounder against Edwardsiellosis

Takayuki Mekuchi*¹, Tomoyuki Kiyokawa*², Kazumitsu Honda*³,
Toshihiro Nakai*³ and Kiyokuni Muroga*³

*¹Hiroshima Prefectural Fisheries Experiment Station, Ondo, Hiroshima 737-12, Japan

*²Shimane Prefectural Fish Farming Center, Nishinoshima, Shimane 684-02, Japan

*³Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University,
Higashihiroshima 739, Japan

(Received June 28, 1995)

The Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) were vaccinated with formalin-killed cells (FKC) of *Edwardsiella tarda* by intramuscular injection, immersion and oral administration. Fish were also immunized by injection with diluted extracellular products (ECP) and intracellular components (ICC) of the bacterium, both of which were found lethal to flounder. As a result, mean serum agglutinating antibody titers against FKC rose in all the immunized fish groups except those vaccinated by immersion with FKC. When the immunized and control fish were challenged by injection and immersion with live cells, death was delayed in most of the immunized groups. However, clear protection was not observed in any group immunized either with FKC, ECP or ICC.

Key words: Japanese flounder, *Edwardsiella tarda*, edwardsiellosis, vaccination, relative percent survival (RPS)

Edwardsiella tarda を原因とするヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) のエドワジエラ症は高水温期を中心に長期間にわたって被害をもたらす。薬剤の治療効果も一時的である場合が多く、現在ヒラメ養殖における最も被害の大きい疾病となっている (安永ら, 1982; 金井, 1993; 松岡・室賀, 1993)。本症の予防法として低密度飼育等の飼育条件の改善が挙げられているが (水野, 1993), その効果は一般的にあまり顕著なものではない。本研究では、ヒラメのエドワジエラ症に対する有効な免疫方法を開発するため、*E. tarda* のホルマリン死菌および粗毒素による免疫を行い、感染実験によってそれらの防御効果を調べた。

材料および方法

供試魚および供試菌株

実験は島根県栽培漁業センター (以下島根と略す) および広島県水産試験場 (以下広島) において、Table 1 に示したような材料魚および条件下で行った。実験にはヒラメ病魚由来の *E. tarda* NUF251 株を魚体通過により病原性を高めて使用した。

ホルマリン死菌 (FKC) ワクチン作製方法

ホルマリンを 0.5% 添加した滅菌 0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.0, 以下 PBS と略す) に普通寒天培地で 25°C, 48 時間培養した NUF251 株を懸濁し、25°C で 48 時間静置して不活化した。不活化菌体を遠心分離 (12,000×g, 20 分) し上清を捨て、沈澱に滅菌 PBS を加えて菌体濃度が 10 mg/ml となるように調整し、ホルマ

*¹ 広島県水産試験場

*² 島根県栽培漁業センター

*³ 広島大学生物生産学部

Table 1. Experimental conditions: experimental method, water temperature and observation period after challenge

Station	Experiment	Water temperature range (°C)	Observation after challenge (day)
Shimane Prefectural Fish Farming Center	Immunization with FK C* ¹		
	Injection and immersion	21.4-23.8	15
Hiroshima Prefectural Fisheries Experiment Station	Oral administration	20.5-22.5	20
	Immunization with FK C		
	Injection and immersion	24.5-26.8	30
	Challenge with ECP* ² , ICC* ³	22.0-23.0	6
	Immunization with ECP, ICC	23.6-24.4	14

*¹FKC: Formalin-killed cells of *E. tarda*, *²ECP: Extracellular products of *E. tarda*, *³ICC: Intracellular components of *E. tarda*.

リン死菌（以下 FK C と略す）ワクチン原液とした。なお、ワクチン原液は生菌が残っていないことを普通寒天培地を用いた培養試験により確認し、実験に供した。

菌体外産生物質 (ECP) および菌体成分 (ICC) の調製方法

セロファンを載せた普通寒天培地（ベトリ皿直径 9 cm）に NUF251 株をコンラージ棒で均一に塗布し、25°C で 96 時間培養した。培地 1 枚当たり 2 ml の滅菌 PBS を加えて菌体を回収し、遠心分離（12,000×g, 20 分）を行った後、上清をメンブランフィルター（孔径 0.45 μm）で濾過し、菌体外産生物質（以下 ECP とする）の原液とした。遠心分離後の沈澱を滅菌 PBS で 3 回遠心洗浄（12,000×g, 20 分）した後、50 mg/ml の濃度に調整し、超音波処理して菌体を破砕した。さらに、これを遠心分離し、得られた上清をメンブランフィルター（0.45 μm）で濾過し菌体成分（以下 ICC）の原液とした。

FKC ワクチンによる免疫方法

注射免疫: 供試魚 1 尾あたり 0.05 ml の FK C ワクチンを筋肉内に注射し、10 日後に同量を追加接種した。なお、FKC ワクチンは島根では原液を、広島では 5 倍希釈液を用いたため、1 尾当りの 1 回の注射抗原量はそれぞれ 0.5 mg, 0.1 mg となった。対照区の魚にはワクチンの代わりに滅菌生理食塩水を注射した。なお、注射免疫には島根で平均体重 3.7 g の魚を 60 尾（対照区 100 尾）、広島で平均体重 7.1 g の魚を 80 尾（対照区 80 尾）それぞれ供した。

浸漬免疫: 抗原濃度が 0.01 mg/ml となるように FK C ワクチンを添加した 10 l の海水に、1 回に 20 尾の供試魚を収容してエアレーションを行いながら 30 分間浸漬した。また、10 日後に同様の処理で追加免疫を行った。対

照区ではワクチンを添加していない海水で同様の処理を行った。供試尾数は島根では各 100 尾 (3.7 g)、広島では 80 尾 (7.1 g) とした。

経口免疫: 抗原濃度が 20 mg/ml の FK C のワクチン液 12 ml を 40 g の配合飼料にスプレーで均一に噴霧し、ワクチンを浸透させるため 4°C で 1~2 時間静置した後、120 尾の供試魚（平均体重 24.6 g）に与えた。すなわち投与抗原量は計算上 1 日 1 尾当たり 2 mg とし、供試魚の摂餌に偏りが無いように、また、残餌が生じないように留意して 20 日間経口投与を行った。対照区の魚にはワクチン処理していない通常の配合飼料を同様に投与した。

ECP および ICC の致死毒性試験

調整した ECP および ICC 原液を PBS で 2³, 2⁴, 2⁵, 2⁶, 2⁷ 倍の 5 段階に希釈し、それぞれの濃度の粗毒素液を 0.05 ml ずつ各 15 尾（平均体重 3.2 g）の筋肉内に注射した。対照魚には同量の生理食塩水を筋肉内に注射した。

粗毒素による免疫

ECP および ICC 原液を 2⁷ 倍に希釈し、それぞれを 0.05 ml ずつ 40 尾（平均体重 5.1 g）の魚に筋肉内に注射した。その 12 日後に同様の処理により追加免疫を行った。なお、対照として滅菌生理食塩水および FK C (0.1 mg/fish) を同量それぞれ 40 尾ずつの筋肉内に注射した。

免疫効果判定のための攻撃試験

FKC 注射免疫魚、FKC 浸漬免疫魚、粗毒素注射免疫魚およびそれらの対照魚に対し、追加免疫の 2 週間後にそれぞれ筋肉内注射および浸漬（毒素免疫については注射のみ）の 2 通りの攻撃を行った。一方、FKC 経口免疫区およびその対照区についてはワクチン投与終了後 5 日目に筋肉内注射攻撃および経口攻撃を行った。

攻撃方法および攻撃後の飼育方法等は前報(馬久地ら, 1995)と同様とした。なお, 各実験時の水温および攻撃後の観察期間は Table 1 に, 各区の攻撃量(濃度)は Table 2, 3, および 4 に示した。攻撃に供した尾数は原則として各区 15 尾ないし 20 尾としたが, それぞれの実験区の実際の尾数は各表に示した。

観察期間中の死亡魚および終了後の生残魚の腎臓から *E. tarda* の再分離を試み, *E. tarda* 感染による死亡を確認するとともに生残魚における保菌状況を調べた。免疫有効率(RPS)は次式により求めた。

$$\text{免疫有効率 (RPS)} = (1 - \text{免疫区の死亡率} / \text{対照区の死亡率}) \times 100 (\%)$$

なお, 死亡魚のうち *E. tarda* が再分離されなかった魚の数を攻撃に供した尾数および死亡尾数から除いて死亡率を求め, 免疫有効率を計算した (Table 2, 3 および 4)。ただし, それぞれの *E. tarda* 陰性の死亡数を表中に示した。また, 攻撃試験時に各免疫魚および対照魚 10~15 尾の尾柄部より採血を行い, 試験区毎に血清をプールしてマイクロタイター法により NUF251 株の FKc に対する抗体価を測定した。

結 果

ホルマリン死菌免疫による防御効果

ホルマリン死菌ワクチンによる免疫魚および対照魚に

おける生菌攻撃後の死亡率, 免疫有効率および 50% 致死日数を注射免疫 (Table 2), 浸漬免疫 (Table 3), および経口免疫 (Table 4) の結果に分けて示した。

注射免疫: 島根では, 注射攻撃後の免疫区で対照区に比べ死亡魚の出現が若干遅れる傾向が認められたが, 有効率は最低攻撃量区 (2.3×10^1 CFU/fish) でも 21% 以下と低かった。広島では, 免疫有効率は 79% ないし 100% と高かったが, 対照区の死亡率は高濃度攻撃区でも 33% と低かった。

浸漬法により攻撃した場合, 免疫区に死亡の遅れが見られたが, 広島での 2.4×10^6 CFU/ml 攻撃区の有効率が 58% であった以外は有効率は 0 ないし 9% と低かった。

浸漬免疫: 浸漬免疫魚に注射攻撃を行ったところ, 島根では免疫魚と対照魚の間に死亡率においても平均死亡日数においてもまったく差は見られなかった。広島では 5.9×10^1 CFU/fish 攻撃した時の免疫区の死亡率は対照区に比べ低かったものの, 有効率は 22% に止まった。

浸漬攻撃した場合, 島根では差がなかったが, 広島では免疫区における死亡の遅れが認められ, 有効率は 2.4×10^7 CFU/ml 攻撃区で 28%, 10^6 CFU/ml 攻撃区で 34% であった。

経口免疫: 経口免疫魚を注射攻撃したところ, 8×10^3 および 10^2 CFU/fish 攻撃区の有効率はそれぞれ 43% および 71% であった。

Table 2. Mortality in live cell challenge test in flounder immunized by injection with *E. tarda* (NUF251) FKc

Challenge method	Station	Fish	Challenge dose (CFU/fish or ml)	Mortality (%) (dead/tested)	Note*1	RPS*2 (%)	Time to 50% mortality (day)	
Injection	Shimane	Immunized	2.3×10^3	89 (8/ 9)	1	11	9	
			2.3×10^2	90 (9/10)		10	10	
			2.3×10^1	70 (7/10)		21	10	
		Control	2.3×10^3	100 (19/19)	1		6	
			2.3×10^2	100 (19/19)	1		7	
			2.3×10^1	89 (16/18)	2		10	
	Hiroshima	Immunized	5.9×10^1	7 (1/14)	1	79	—	
			5.9×10^0	0 (0/15)		100	—	
		Control	5.9×10^1	33 (4/12)	3		—	
			5.9×10^0	37 (1/15)			—	
	Immersion	Shimane	Immunized	5.7×10^7	100 (8/ 8)	2	0	9
				5.7×10^7	100 (19/19)	1		7
Hiroshima		Immunized	2.4×10^7	67 (10/15)		9	25	
			2.4×10^6	17 (2/12)	3	58	—	
		Control	2.4×10^7	73 (11/15)			17	
			2.4×10^6	40 (6/15)			—	

*1 Number of dead fish from which *E. tarda* was not re-isolated. This number was excluded in the calculations of mortality. *2 RPS=Relative percent survival=(1-mortality in immunized group/mortality in control group)×100%.

Table 3. Mortality in live cell challenge test in flounder immunized by immersion with *E. tarda* (NUF251) FKFC

Challenge method	Station	Fish	Challenge dose (CFU/fish or ml)	Mortality (%) (dead/tested)	Note*1	RPS*2 (%)	Time to 50% mortality (day)
Injection	Shimane	Immunized	2.3×10^3	100 (20/20)		0	6
			2.3×10^2	95 (19/20)		0	9
			2.3×10^1	83 (15/18)	2	0	10
		Control	2.3×10^3	100 (20/20)			7
			2.3×10^2	95 (18/19)	1		10
			2.3×10^1	79 (15/19)	1		12
	Hiroshima	Immunized	5.9×10^1	47 (7/15)		22	—
			5.9×10^0	13 (2/15)		0	—
		Control	5.9×10^1	60 (9/15)			23
			5.9×10^0	13 (2/15)			—
Immersion	Shimane	Immunized	5.7×10^7	100 (19/19)	1	0	7
		Control	5.7×10^7	100 (20/20)			7
	Hiroshima	Immunized	2.4×10^7	67 (10/15)		28	18
			2.4×10^6	31 (4/13)	2	34	—
		control	2.4×10^7	93 (14/15)			10
			2.4×10^6	47 (7/15)			—

*1 Number of dead fish from which *E. tarda* was not re-isolated. This number was excluded in the calculations of mortality. *2 RPS=Relative percent survival.

Table 4. Mortality in live cell challenge test in flounder immunized by oral administration with *E. tarda* (NUF251) FKFC

Challenge method	Station	Fish	Challenge dose (CFU/fish or ml)	Mortality (%) (dead/tested)	Note*1	RPS*2 (%)	Time to 50% mortality (day)
Injection	Shimane	Immunized	8.0×10^3	53 (8/15)		43	18
			8.0×10^2	27 (4/15)		71	—
			8.0×10^1	7 (1/15)		0	—
		Control	8.0×10^3	93 (14/15)			11
			8.0×10^2	92 (12/13)	2		14
			8.0×10^1	7 (1/15)			—
Oral	Shimane	Immunized	8.0×10^8	33 (5/15)		0	—
			8.0×10^7	8 (1/13)	2	43	—
			8.0×10^6	7 (1/14)	1	12	—
		Control	8.0×10^8	31 (4/13)	3		—
			8.0×10^7	14 (2/14)	1		—
			8.0×10^6	8 (1/13)	2		—

*1 Number of dead fish from which *E. tarda* was not re-isolated. This number was excluded in the calculations of mortality. *2 RPS=Relative percent survival.

経口攻撃した場合は、 8.0×10^7 CFU/fish 攻撃区において有効率は43%であったが、それ以外の攻撃区では死亡率に差はほとんど認められなかった。

ホルマリン死菌免疫による血中抗体価の上昇

免疫処理2週間後の血中抗体価は、注射免疫区では島根が 2^9 、広島が 2^{11} 、経口免疫区で 2^7 と、それぞれ抗体価

が上昇したが、浸漬免疫区の抗体価は島根、広島ともに対照区と同程度の $2^3 \sim 2^4$ であった。

生残魚の保菌状況

実験終了時に生残魚の *E. tarda* 保菌状況を調べた結果、島根では注射および浸漬免疫区の保菌率は67% (2/3) 以上、経口免疫区での保菌率は1区を除き55% (6/

Table 5. Mortality of flounder intramuscularly injected with diluted ECP*¹ or ICC*²

Injection dose (dilution)	Death after Injection						Mortality (%) (dead/tested)
	1	2	3	4	5	6 (day)	
ECP	×2 ⁻³	0	7	0	0	0	47 (7/15)
	×2 ⁻⁴	0	3	0	1	0	27 (4/15)
	×2 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0 (0/15)
	×2 ⁻⁶	0	0	0	0	0	0 (0/15)
	×2 ⁻⁷	0	0	0	0	0	0 (0/15)
ICC	×2 ⁻³	0	9	3	2	0	93 (14/15)
	×2 ⁻⁴	1	0	11	1	0	87 (13/15)
	×2 ⁻⁵	0	1	1	4	0	40 (6/15)
	×2 ⁻⁶	0	1	0	1	0	13 (2/15)
	×2 ⁻⁷	0	0	0	0	0	0 (0/14)
Control (PBS)	0	0	0	0	0	0	0 (0/15)

*¹ECP: Extracellular products of *E. tarda* NUF251 (25°C·96 h culture). *²ICC: Intracellular components of *E. tarda* NUF251 (25°C·96 h culture).

Table 6. Mortality in live cell challenge test*¹ in flounder immunized with ECP, ICC and FK of *E. tarda* (NUF251)

Immunogen	Challenge dose (CFU/fish)	Mortality (%) (dead/ tested)	RPS* ² (%)	Time to 50% mortality (day)
ECP* ³	6.8×10 ²	100 (15/15)	0	7
	6.8×10 ¹	60 (9/15)	0	13
ICC* ⁴	6.8×10 ²	87 (13/15)	13	7
	6.8×10 ¹	60 (9/15)	0	13
FKC* ⁵	6.8×10 ²	87 (13/15)	13	8
	6.8×10 ¹	60 (9/15)	0	12
Control	6.8×10 ²	100 (15/15)		6
	6.8×10 ¹	67 (10/15)		10

*¹Immunized fish were challenged by intramuscular injection, *²RPS: Relative percent survival, *³ECP: Extracellular products (25°C·96 h culture), *⁴ICC: Intracellular components (25°C·96 h culture), *⁵FKC: Formalin-killed cells.

11) 以上であった。一方広島では保菌率は低く、最高でも 50% (3/6) であった。

疫区の凝集抗体価は 2⁶ (ICC 区), 2⁷ (ECP 区) および 2⁸ (FKC 区) と対照区に比べいずれも高かった。

ECP および ICC の致死毒性

粗毒素接種魚の死亡経過を Table 5 に示した。ECP 接種区では最高濃度 2³ 倍希釈区で約半数 (7/15) の魚が死亡したが、2⁵ 倍希釈区より低濃度区では 6 日間の観察期間中に死亡は認められなかった。一方、ICC 接種区では 2⁷ 倍希釈区を除いた全ての区で死亡魚が出現した。

ECP および ICC 免疫による防御効果

ECP, ICC および FKC で免疫した魚に生菌注射攻撃した結果を Table 6 に示した。いずれの免疫区においても対照区より死亡がやや遅れて生じる傾向が見られたが、有効率はいずれも 13% 以下と低かった。なお、各免

考 察

E. tarda はウナギのパラコロ病の原因菌として古くから知られており (Wakabayashi and Egusa, 1973), 本病に対する予防免疫の試みもなされている。Song and Kou (1981) は浸漬免疫の有効性を報じているが, Salati *et al.* (1987) は *E. tarda* の FKC および LPS で注射免疫したウナギにおいて血清抗体価は上昇し, 食作用も高められるものの防御効果は極めて低いことを報告している。また, ヒラメのエドワジェラ症に対する予防免疫につい

* 森 重信・西村 真・金井欣也 (1992): ヒラメのエドワジェラ症に対する注射および浸漬ワクチンの有効性. 平成 4 年度日本魚病学会春季大会 講演要旨 p. 25.

て、森ら(1992)*は注射免疫ではある程度防御能が高められるものの浸漬免疫の効果は認められなかったとしている。

今回のわれわれの実験では、FKCを用いた注射、浸漬および経口免疫法のいずれによってもある程度防御能が高められるものの、その効果は実用化をめざすためには極めて不十分なものであった。

また、本研究で使用した *E. tarda* NUF251 株の菌体外産生物質 (EPC) および菌体成分 (ICC) にヒラメに対する致死毒性が認められたため、それらの粗毒素液を希釈したものを抗原として注射免疫を行ったが、やはり不十分な防御効果しか認められなかった。なお、予備実験でホルマリンを用いて本毒素のトキシド化を試みたが、毒性の低下が認められなかったため、本試験では致死量以下の毒素液を免疫原として用いた。

ウナギでは *E. tarda* が好中球等の食作用に対して抵抗性を有することが示され (飯田ら, 1993; Iida and Wakabayashi, 1993), ヒラメにおいても病理組織学的な観察結果から本菌が食細胞中で増殖することが確認されている (Miyazaki and Kaige, 1985)。すなわち、ワクチン投与によりヒラメの体内で抗体が産生され、食細胞による *E. tarda* の取り込みが促進されたとしても、最終的には食細胞による殺菌作用に抵抗力を示し生き残ることが考えられる。攻撃後長期間にわたってヒラメの死亡が認められ、試験終了時の生残魚の一部が *E. tarda* を保菌していたという本実験の結果はこの考え方を支持するように思われる。

謝 辞

本研究は日本水産資源保護協会の委託研究「魚類免疫の研究 (ヒラメのエドワジエラ症の予防免疫に関する研究)」(平成 4, 5 年度) により広島県水産試験場, 島根県

栽培漁業センターおよび広島大学生物生産学部の共同研究として実施されたものである。

文 献

- 飯田貴次・三浦 薫・若林久嗣・小林正典 (1993): アクリジン・オレンジ染色によるウナギ好中球内殺菌活性の測定. 魚病研究, 28, 49-50.
- Iida, T. and H. Wakabayashi (1993): Resistance of *Edwardsiella tarda* to opsonophagocytosis of eel neutrophils. *Fish Pathol.*, 28, 191-192.
- 金井欣也 (1993): ヒラメの細菌性疾病. 韓国魚病学会誌, 6, 197-204.
- 松岡 学・室賀清邦 (1993): 愛媛県下の養殖海産魚における細菌性疾病発生の歴史 (1966-1992 年). 広大生物生産学部紀要, 32, 109-118.
- 馬久地隆幸・清川智之・本多数充・中井敏博・室賀清邦 (1995): ヒラメにおける *Edwardsiella tarda* の感染実験. 魚病研究, 30, 247-250.
- Miyazaki, T. and N. Kaige (1985): Comparative histopathology of edwardsiellosis in fishes. *Fish Pathol.*, 20, 219-227.
- 水野芳嗣 (1993): 現場における養殖ヒラメの疾病対策. 韓国魚病学会誌, 6, 219-231.
- Salati, F., Y. Ikeda and R. Kusuda (1987): Effect of *Edwardsiella tarda* lipopolysaccharide immunization on phagocytosis in the eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 201-204.
- Song, Y.-L. and G.-H. Kou (1981): The immunoresponse of eel (*Anguilla japonica*) against *Edwardsiella anguillimortifera* as studied by the immersion method. *Fish Pathol.*, 15, 249-255.
- Wakabayashi, H. and S. Egusa (1973): *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel disease. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 39, 931-936.
- 安永統男・小川七朗・畑井喜司雄 (1982): 数種の海産魚から分離された病原性 *Edwardsiella tarda* の性状について. 長崎水試研報, No. 8, 57-65.