

クルマエビのビブリオ病に対するワクチンの研究—I

ワクチンの濃度による有効性の差異ならびにワクチンの持続性^{*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* — I

Effect of Vaccine Concentration and Duration of Vaccination Efficacy

Toshiaki Itami^{*2}, Yu Yan^{*3}, and Yukinori Takahashi^{*2}

Serious damage of cultured kuruma prawn *Penaeus japonicus* was caused by the outbreaks of vibriosis in Japan. As a counter measurement against this disease, we have demonstrated that the formalin-killed *Vibrio* sp. culture were effective for control of vibriosis when administered by injection, immersion and spray techniques. In this study, effect of vaccine concentration and duration of vaccination efficacy were investigated in immersion type vibrio vaccine for kuruma prawns.

To examine the adequate concentration for immersion type vaccine, 10, 1, 0.5 and 0.1 % vaccine solution were administered to kuruma prawns, and then artificially challenged two weeks after vaccination. The most effective vaccination condition was to immerse the prawns in 1 % vaccine for five hours with aeration. The duration of vaccination efficacy was indicated to be at most 50 days after dipping prawns in 1 % vaccine solution for five hours. This condition of dipping prawns was demonstrated to be safe and less stress.

1 緒 言

クルマエビのビブリオ病は、1985年に発症が報告¹⁻³⁾されて以来、クルマエビ養殖に大きな被害を与えている。

著者らは、本疾病に対する予防対策として、ワクチンを開発し、その有効性を明らかにした⁴⁾。すなわち、ビブリオ病原菌を25℃で24時間培養し、ホルマリンで不活化したワクチンを注射法、浸漬法およびスプレー法のいずれの方

水産大学校研究業績第1362号，1991年8月13日受付。

Contribution from Shimonoseki University of Fisheries, No. 1362. Received Aug. 13, 1991.

*1 平成3年度日本水産学会中国四国支部例会(1991年5月，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, Yan Tai, Shandong, China).

法で投与しても顕著な感染予防効果が認められることを示した。さらに、ワクチンを投与したクルマエビ血液成分にはクルマエビの未感作血球を活性化する因子が含まれることを明らかにし、無脊椎動物におけるワクチンの作用機作の一端を示した。

一方、魚類におけるワクチンの投与方法としては浸漬法が一般的に認められているが、前報⁴⁾では1%に希釈したワクチンに供試エビを1時間浸漬する方法だけについて検討しており、これ以外の浸漬ワクチンの投与条件については明らかにされていない。

そこで、本報では浸漬法でワクチンを投与する場合のワクチン濃度および浸漬時間の差異がワクチンの有効性におよぼす影響について検討するとともに、ワクチン効果の持続性について検討した。

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、市販の配合餌料を体重の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 ワクチン濃度による有効性の差異

クルマエビのビブリオ病原菌 NU-1 株を用いて、前報⁴⁾と同様にワクチン原液を作製した。まず、このワクチン原液を1、0.5および0.1%となるように海水で希釈して供試エビを5時間エアレーションしながら浸漬した。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10~13尾とした。

次に、同ワクチン原液を海水で希釈して10%ワクチン液とし、これに供試エビを10分間あるいは10秒間浸漬した区を設けた。陽性対照として、1%ワクチン液に供試エビを1時間浸漬した区を設け、ワクチン無投与区を対照区とした。供試エビは各区16~19尾とした。

2.3 ワクチン効果の持続性

前述のクルマエビのビブリオ病ワクチン原液を1%に希釈して供試エビを5時間エアレーションしながら浸漬した。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10~13尾とした。

2.4 有効性の判定法

ワクチン濃度による有効性の差異の実験(2.2)においてはワクチンを投与してから2週間後に、ワクチン効果の持続性(2.3)では50日後に、それぞれクルマエビのビブリオ病原菌を用いて前報⁴⁾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、斃死エビからの菌の分離を試みた。

3 結果

3.1 ワクチン濃度による有効性の差異

ワクチンを投与した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。ワクチンを投与したのち、人為感染実験開始までの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。

まず、1、0.5および0.1%ワクチンを投与した場合の有効性の差異はFig. 1に示すとおりである。生菌攻撃を行ったところ、ワクチンを投与した区の攻撃10日後の最終生残率は、1%ワクチン投与区では50%、0.5%ワクチン投与区では15%および0.1%ワクチン投与区では20%であった。一方、ワクチンを投与していない対照区では攻撃開始後6日で全供試エビが斃死した。攻撃に用いた菌数は供試エビ1尾あたり 5.6×10^3 細胞であった。全ての斃死エビからほぼ純粋にビブリオ病原菌が分離された。

次に、1%および10%ワクチンを投与した供試エビの生残率の差異はFig. 2に示すとおりである。攻撃後10日の最終生残率は、1%ワクチン液に1時間浸漬したエビでは69%、10%液に10分浸漬した区では43%、10%液に10秒浸漬した区では55%であった。ワクチンを投与していない対照区では44%であった。なお、攻撃に用いた菌数は供試エビ1尾あたり 7.0×10^3 細胞であった。また、全ての斃死エビからほぼ純粋にビブリオ病原菌が分離された。

3.2 ワクチン効果の持続性

ワクチン投与50日のワクチンの有効性の差異をFig. 3に示した。生菌攻撃後10日の最終生残率は、ワクチン投与区と対照区でそれぞれ80%および60%であった。なお、攻撃に用いた菌数は供試エビ1尾あたり 6.7×10^3 細胞であった。

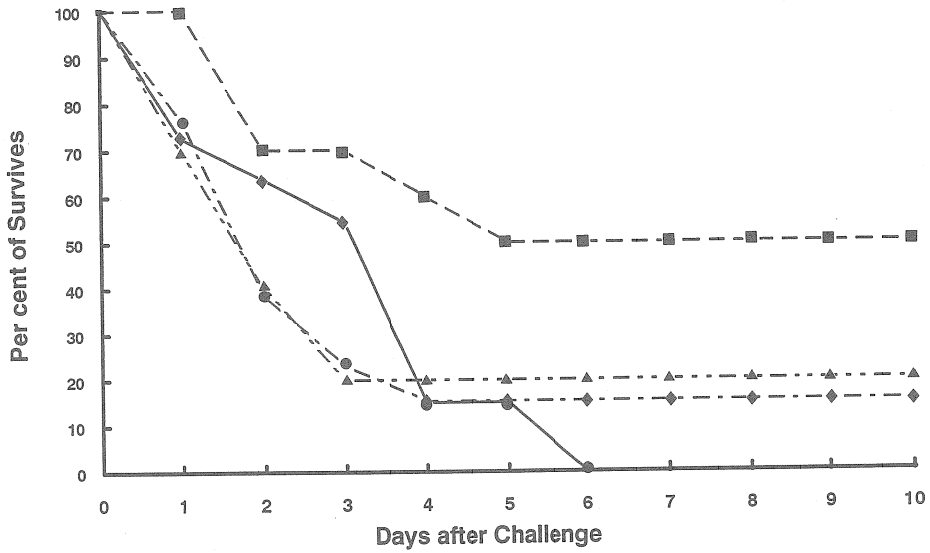


Fig. 1. Effect of lower concentration of vaccine solution for immersion technique. Prawns were immersed in one of each vaccine for five hours.
 —■—: 1 %, —◆—: 0.5%, —▲—: 0.1%, —●—: control

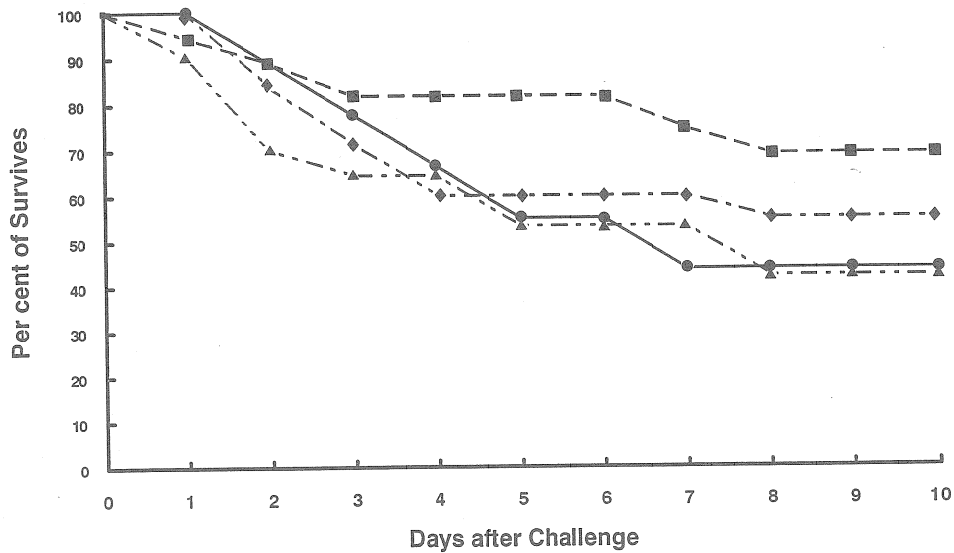


Fig. 2. Effect of higher concentration of vaccine solution for immersion technique.
 —■—: in 1 % vaccine for 1hour, —▲—: in 10 % vaccine for 10 minutes, —◆—: in 10 % vaccine for 10 seconds, —●—: control

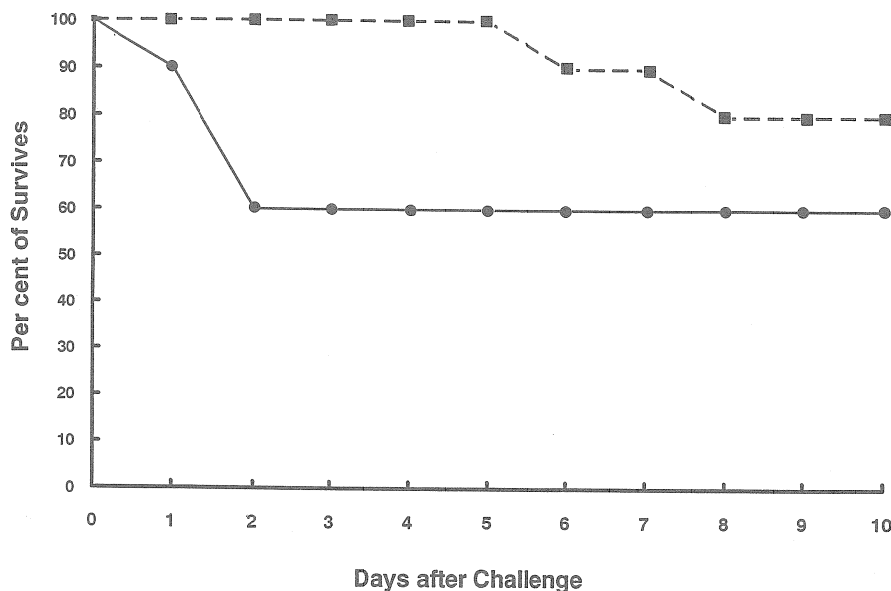


Fig. 3. Duration of vaccination efficacy. Vaccinated prawns were challenged 50 days after vaccination.

—■—: vaccinated group, —●—: non-vaccinated control

4 考 察

著者らは前報⁴⁾において、クルマエビのピブリオ病に対するワクチンを開発し、その有効性を明らかにした。すなわち、クルマエビのピブリオ病原菌を液体培地で24時間25℃で培養した培養菌液に、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菌液ワクチンを作製し、これの0.1mlを第6腹節の筋肉に注射した場合、あるいは1%となるように希釈したワクチン液に1時間エビを浸漬した場合、さらにはワクチン原液をエビ体表面全体に噴霧器で噴霧した場合のいずれにおいても、ピブリオ病原菌の強毒株による人為感染試験に対して予防効果を示した。このことから、クルマエビのピブリオ病に対してワクチンによる予防対策が可能であることが示唆された。しかし、実用性を考慮した詳細な投与条件の検討がなされていないことから、本報では浸漬法を用いた場合のワクチン濃度による有効性の差異について検討を行うとともに、ワクチンの予防効果の持続性についても検討した。

まず、ワクチン濃度による有効性の差異について検討し

たところ、1%あるいは10%ワクチン投与区のいずれの区においてもワクチン投与による斃死は見られず、また供試エビの摂餌活動や遊泳状態に異常がないことから、本法による投与方法はエビに与えるストレスが小さいものと考えられる。ワクチン濃度を1、0.5および0.1%に調整したワクチン液に供試エビを5時間浸漬したのちに生菌攻撃を行ったところ、1%ワクチン液に浸漬した区の最終生残率が最も高く、明らかな有効性が認められた。しかし、0.1および0.5%液に浸漬した区では生残率は低く、有効性は低いと考えられた。このことから、浸漬時間を5時間とした場合でも、少なくとも1%濃度のワクチンを使用する必要があると思われる。このような長時間浸漬によってもクルマエビに与えるストレスがほとんどないことと前報⁴⁾の結果から、浸漬法ワクチンの場合、1%ワクチンを用いてエビを1～5時間浸漬する方法が適当であると考えられる。無脊椎動物におけるこのようなワクチン濃度による有効性の差異を検討した報告はみられないが、著者らがアユのピブリオ病に対するワクチンの濃度による有効性の差異について検討した結果⁵⁾、浸漬時間を5時間とした場合、

0.3%以上の濃度のワクチンを用いる必要がある事を報告した。ワクチンを投与した動物種も、またワクチン作製に用いた菌種も異なるので、直接の比較はできないが、ワクチン投与による予防効果を得るためには、いずれの場合もある一定以上の濃度のワクチンを投与する必要があり、これ以下であるとその有効性は著しく低下することが明らかとなった。このことは、無脊椎動物においても脊椎動物と同様に、免疫反応を誘導するためには一定以上の抗原量が必要であることを示唆していると考えられる。

次に、10%ワクチンに10分間浸漬した区を攻撃したのちの最終生残率は、対照区と全く差がなく、有効性はみられなかった。また、同ワクチンに10秒浸漬した区では対照区よりやや高いものの、1%液に1時間浸漬した区より低く、その有効性は明らかではなかった。この有効性が低い原因については明らかではないが、脊椎動物でも一度に大量の抗原によって生体が感作された場合、免疫寛容が成立して抗体を産生しなくなることが知られており⁶⁾、このような現象がエビでも生じたのではないかと考えられる。また、著者らは $10^9 \sim 10^{10}$ 個のピブリオ死菌体をエビ体内に注射した場合、エビが斃死する現象を観察している。これは大量の菌体が体内に侵入すると、カプトガニ血球に見られるようなグラム陰性菌のリポポリサッカライド(LPS)に反応する血液凝固因子⁷⁾がエビの血球に存在し、これが過剰反応を起こして血液に凝固を誘導し、エビを斃死させるのではないかと考えられる。このことから、エビに大量の菌体抗原を一度に投与した場合は“免疫反応”が誘導されるよりは、むしろ血球の過剰反応を起こさせ、少なくとも正常な免疫応答を阻害するのではないかと推察される。今後10%以上の高濃度ワクチンがクルマエビの器官や血球に与える生理的影響について検討するとともに、10%以上の濃度で短時間処理のできるワクチンの製法および有効性についても検討する必要がある。

ワクチン効果の持続性については、ワクチンを投与して50日後に生菌による攻撃実験を行ったところ、ワクチン投与区と対照区との最終生残率に顕著な差が見られなかったことから、ワクチン効果の持続性は長くとも50日程度ではないかと考えられる。しかし、対照区では攻撃後1日目から斃死が見られたのに対して、ワクチン投与区では6日後と対照区より5日遅れて斃死し始めたことから、本ワクチンは投与後50日ではクルマエビの斃死を阻止することはでき

ないが、延命的な効果があったのではないと思われる。そこで、今後ワクチン効果をさらに持続させるためには、追加免疫の方法として、エビの取り揚げを必要とする浸漬法ワクチンよりも、餌料に混合した経口法によるワクチン投与や免疫賦活剤の投与について検討する必要があると思われる。

以上のように、クルマエビのピブリオ病に対するワクチンとしては、液体培養したピブリオ病原菌をホルマリンで不活化したのち、1%に希釈してエビを1~5時間浸漬した場合に高い有効性がみられ、この効果の持続性は50日程度であろうと考えられた。また、この投与条件はエビに与えるストレスもほとんどなく、安全性も高いことが明らかとなった。

本研究では、10%ワクチンの有効性が明らかにされなかったことから、今後有効性の高い高濃度ワクチンの開発が必要であるとともに、有効性を長時間持続させるための経口ワクチンや免疫賦活剤の投与などについても検討する考えである。また、免疫生物学的見地から、クルマエビでみられたワクチン投与後の感染防御能は、脊椎動物で明らかにされている特異的免疫応答によるものであるかどうかを、細胞性および液性レベルで検討する必要がある。

文 献

- 1) 高橋幸則・下山泰正・桃山和夫：日水誌，51，721-730 (1985).
- 2) Y. Takahashi, T. Itami, A. Nakagawa, H. Nishimura and T. Abe: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 51, 1639-1643 (1985).
- 3) 江草周三・高橋幸則・伊丹利明・桃山和夫：魚病研究，23，59-65 (1988).
- 4) T. Itami, Y. Takahashi and Y. Nakamura: *J. Aquatic Animal Health*, 1, 238-242 (1989).
- 5) R. Kusuda, K. Kawai and T. Itami: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 46, 1053 (1980).
- 6) 飯田広夫：免疫の科学 (大原 達編)，文永堂，東京，1977，pp. 128-131.
- 7) 中村 伸・岩永貞昭：蛋白質 核酸 酵素，23，277-290 (1978).