

ウイルス性神経壊死症経口ワクチンの 実用化技術開発試験*

堅 田 昌 英

目 的

海産魚養殖におけるウイルス病にはイリドウイルス病、ウイルス性腹水症およびウイルス性出血性敗血症等があるが、ウイルス性神経壊死症 (Viral Nervous Necrosis : VNN) は発生頻度、宿主域の広さおよび被害量の点で現在、最も恐れられている疾病の一つである¹⁾。本疾病は主に仔稚魚期に発生するため治療は困難であると考えられ、予防が疾病対策の課題となる。ハタ科魚類では幼魚期以降にも本疾病が多発することから、防除法としてワクチネーションの可能性が示唆されている^{2,3)}。注射ワクチンがイリドウイルス病の対策用として開発・市販され、室内実験では高い予防効果が認められている⁴⁾が、コスト的に高く多大な労力を必要とする。こうした背景から、海産魚の養殖現場では、配合飼料に混合して投与することのできる経口ワクチンの

開発が期待されている。

そこで本研究では、ベータノダウイルス抗原を発現した酵母を配合飼料に添加してVNN経口ワクチンを作製し、インダイ稚魚に投与した場合の防除効果について検討した。

材料および方法

供試魚 近畿大学水産研究所から8月2日に分与(38日齢)されたインダイを用いた。

経口ワクチンの作製 酵母は、ベータノダウイルス感染防御抗原を提示したものを用いた。酵母の培養に使用した培地の種類とその組成を表1に示す。培養は以下の手順に従って行った。凍結乾燥した粉末状の酵母を活性化するために、酵母の粉末をYPD液体培地に懸濁した。懸濁液をYPD寒天培地に1ml塗抹し、30℃で24時間培養してコロニーを

表1 酵母の培養に用いた培地の種類およびその組成

培地の種類	培地の組成	添加量
YPD 培地 (前培養用)	酵母エキス	10 g
	ペプトン	20 g
	D(+)-グルコース	20 g
	寒天末 (寒天培地にする場合)	20 g
	蒸留水	1,000 ml
SD-W+2 %カザミノ酸培地 (本培養用)	酵母ニトロゲンベースアミノ酸不含	7 g
	D(+)-グルコース	20 g
	L-ロイシン	30 mg
	L-ヒスチジン塩酸塩一水和物	20 mg
	アデニン硫酸塩無水	20 mg
	ウラシル	20 mg
	カザミノ酸“ダイゴ”	20 g
蒸留水	1,000 ml	

*経口ワクチンの実用化技術開発試験費による

確認した。YPD 寒天培地上のコロニー 1 白金耳を 10 ml の YPD 液体培地に懸濁し、30 °C で一晩振盪培養して前培養液とした。前培養液 4 ml を 200 ml の SD-W+2 % カザミノ酸培地に移し、30 °C で 24 時間振盪培養（本培養）してワクチン原液とした。酵母の不活化と配合飼料への添加は、以下の手順に従って行った。ワクチン原液を 3,000 rpm、5 分間遠心分離した後、上清を除去して 50 ml の PBS(-) に懸濁した。懸濁液に 0.3 % の濃度になるようにホルマリン原液を添加し、4 °C で一晩放置した。翌日、不活化処理した懸濁液に適量の PBS(-) を加え、3,000 rpm、5 分間遠心分離して上清を除去する操作を 3 回繰り返してホルマリン成分を除去した。その後、遠心分離された酵母を 3 倍量の蒸留水に懸濁し、配合飼料に添加して経口ワクチンとした。

試験区の設定および経口ワクチンの投与 試験区の設定および経口ワクチンの投与は、図 1 の通りにした。試験は 200 l アルテミア孵化水槽（水量 150 l）を用い、各区 50 尾ずつ収容して行った。経口ワクチン投与量は、50 ~ 59 日齢までは 3.0 g / 区・日、70 ~ 79 日齢までは 6.0 g / 区・日とした。なお、試験期間中、換水率は 58 回転 / 日とし、水温はヒーターで加温を行って 28 °C を維持した。

感染実験 攻撃試験用のベータノダウイルスは RGNNV 型（マハタ由来；NS05RG-01）を使用し

た。注射感染実験は、経口ワクチン投与終了 20 日後（図 1 の矢印部分）に、1 尾当たり 0.1 ml ずつのウイルス原液を腹腔内へ注射して行った。実験期間中は配合飼料を朝・夕 2 回給餌し、換水率は 58 回転 / 日（水槽水量 150 l）、水温を 28 °C に加温しながら 3 週間経過を観察した。

効果判定としての PCR

リアルタイム PCR によって攻撃試験 4 日後のインダイ眼球中のベータノダウイルス量を定量することで、経口ワクチンの投与による影響を調べた。

攻撃試験 4 日後に、1 区、3 区および 5 区から供試インダイを 5 尾ずつ採取し、眼球を取り出した。RNA 抽出および DNase 処理は常法に従って行った。

各 DNase 処理済み RNA 抽出液に対し、常法に従ってゲノムコンタミネーションがないことを確認した。その後、各サンプルに常法に従って逆転写反応液を加え、42 °C 15 分間、95 °C 2 分間の逆転写反応を行い、cDNA を得た。

各 cDNA につき、常法に従ってリアルタイム PCR 反応液を加え、95.0 °C 10 秒間の初期変性の後、PCR 反応を 95.0 °C 5 秒間、62.0 °C 20 秒間で 45 サイクルまで行った。

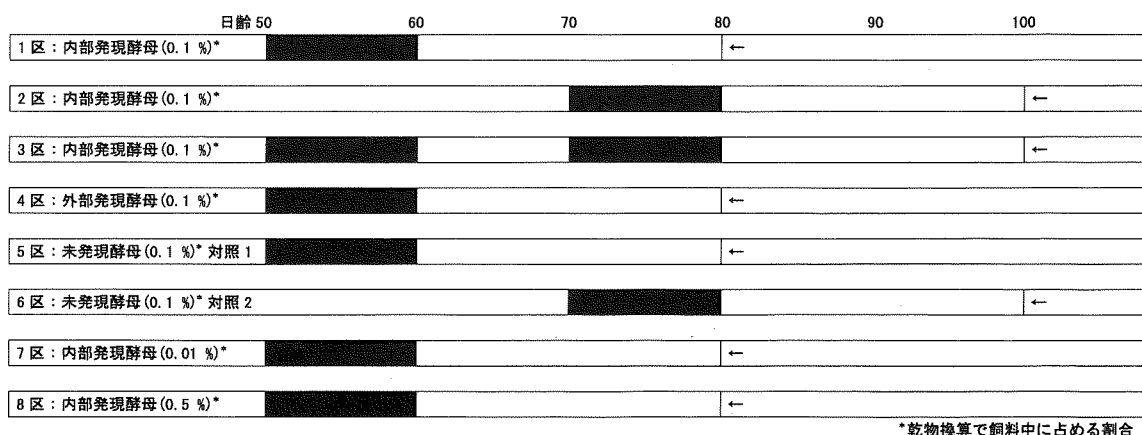


図 1 試験区の設定と試験スケジュール
（黒塗り部分はワクチン投与期間，矢印は攻撃試験日を示す）

結果および考察

シマアジに対してはベータノダウイルスによる感染実験が成立することが示されている⁵⁾が、イシダイを用いた今回の攻撃試験の結果、ワクチン投与区とコントロール区(5区および6区)はともに全く死亡が見られず、両者に差は認められなかった。更に、感染実験期間中の供試イシダイの摂餌状況も良好であった。今回、イシダイ由来のベータノダウイルスを入手することができず、マハタ由来株を感染実験に用いたため、本ウイルス液は供試イシダイに対して病原性を示さなかった可能性が考えられる。

また、最も差が出やすいと思われた1区、3区および5区から5サンプルずつ採取してリアルタイムPCRに供したが、差は認められなかった。従って、今回の試験に用いた経口ワクチンは、眼球中のウイルス量を有意に低下させる働きはしないものと思われる。

文 献

- 1) 室賀清邦 (1995) : 海産魚介類の仔稚におけるウイルス性および細菌性疾病. 魚病研究, **30**, 71-85.
- 2) Tanaka, S., K. Mori, M. Arimoto, T. Iwamoto and T. Nakai (2001) : Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *J. Fish Dis.*, **24**, 15-22.
- 3) Yuasa, K., I. Koesharyani, D. Roza, K. Mori, M. Katata and T. Nakai (2002) : Immune response of humpback grouper, *Cromleptes altivelis* (Valenciennes) injected with the recombinant coat protein of betanodavirus. *J. Fish Dis.*, **25**, 53-56.
- 4) Nakajima, K., Y. Maeno, J. Kurita and Y. Inui (1997) : Vaccination against red sea bream

iridoviral disease in red sea bream. *Fish Pathol.*, **32**, 205-209.

- 5) Arimoto, M., K. Mori, T. Nakai, K. Muroga and I. Furusawa (1993) : Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider) . *J. Fish Dis.*, **16**, 461-469.