

# 経口ワクチンの実用化技術開発試験\*

堅田昌英・竹内照文

## 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、ウイルス性神経壊死症およびウイルス性出血性敗血症等があるが、中でもイリドウイルス病は感染魚種が多く、対策に苦慮している。イリドウイルス病の対策には注射ワクチンが開発・市販され、室内実験では高い予防効果が認められている<sup>1)</sup>が、注射によるワクチネーションは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、イリドウイルス抗原を表層提示した酵母を配合飼料に添加して経口ワクチンを作製し、マ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：近畿大学水産養殖種苗センターすさみ事業場から10月14日に購入（28日齢）したマダイを用いた。

供試酵母：イリドウイルス抗原を表層提示した酵母を用いた。

酵母の培養：使用した培地の種類とその組成を表1に示す。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1 ml塗抹し、30℃で24時間培養してコロニーを確認した。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℃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℃で24時間振盪培養（本培養）してワクチン原液とし

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

た。

酵母の不活化と配合飼料への添加：ワクチン原液を3,000rpmで5分間遠心分離した後、上清を除去して50ml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℃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、3,000rpm、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て湿重量で配合飼料の15%になるように添加して経口ワクチンとした。

ワクチネーション：1トン水槽5面（1～5区）にそれぞれ2,000尾ずつのマダイを収容して行った。この間、水温は20～24℃で推移し、流水飼育で配合飼料を飽食給餌した。飼育期間中の換水率は28～42日齢までは5.2回転/日、43～80日齢までは8.6回転/日、81日齢以降は10回転/日とした。なお、水温が低下して摂餌状態が低下しないようにするた

め、44日齢にあたる10月30日からヒーターにより加温した。

攻撃ウイルス：財団法人 阪大微生物病研究会観音寺研究所から分与されたイリドウイルスを用いた。このイリドウイルスはカンパチ脾臓の乳剤を0.45 $\mu$ mフィルターで濾液後、GF細胞で培養したウイルス液である。

第1回目試験：試験設定を図1に示す。1区は30～36日齢まで、2区は40～46日齢まで、3区は50～56日齢まで、4区は60～66日齢までワクチンを投与し、5区はコントロール区とした。なお、ワクチン投与量は30日齢のマダイ2,000尾に対する適量を基本にし、10g/日・区で統一した。その後、78日齢になったマダイを1区、2区、3区および5区から20尾ずつ取り上げ（平均全長63mm、平均体重4.8g）、感染力価 $10^{4.6}$ TCID<sub>50</sub>/mlのウイルス液を1尾当たり0.1mlずつ筋肉注射し、60ℓ角形水槽へ収容した。その後、配合飼料を朝・夕2回給餌し、水温を25℃

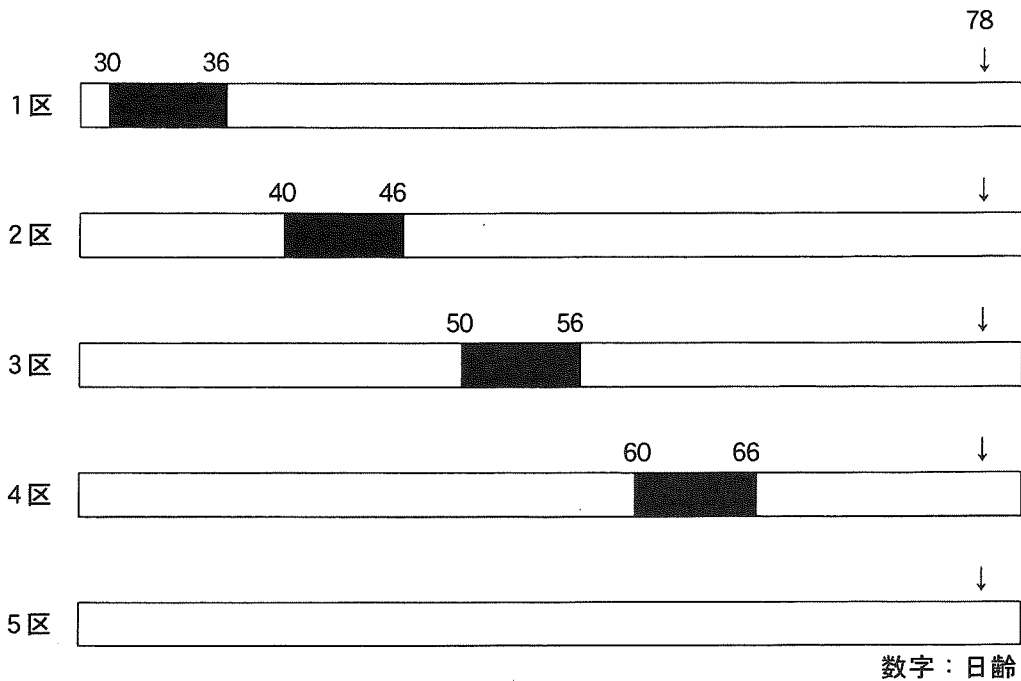


図1 第1回目試験の設定

■ ワクチン投与      ↓ 攻撃 (注射)

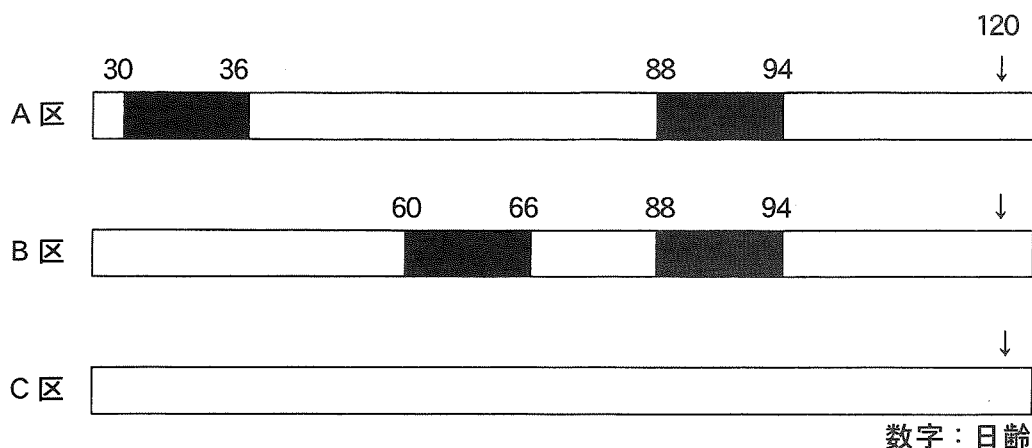


図2 第2回目試験の設定

■ ワクチン投与      ↓ 攻撃（浸漬）

以上に加温しながら換水率4.8回転/日で2週間経過を観察した。

第2回目試験：試験設定を図2に示す。1区のワクチン投与区に88～94日齢まで再びワクチンを与えたA区、4区のワクチン投与区に88～94日齢まで再びワクチンを与えたB区、ワクチンを全く与えないC区をコントロール区とした。なお、ワクチン投与量は第1回目試験の時と同様に10g/日・区とした。攻撃試験は、120日齢になったマダイを各区から20尾ずつ取り上げ（平均全長82mm，平均体重10.8g），満水にした60ℓ角形水槽に収容した後，感染力価 $10^{4.3}$ TCID<sub>50</sub>/mlのウイルス液60mlを混合して実施した。浸漬攻撃は，止水にして水温25℃で1時間行っ

た。その後の飼育は配合飼料を朝・夕2回給餌し，水温を25℃以上に加温しながら換水率4.8回転/日で5週間経過を観察した。

### 結果および考察

マダイは入荷した当初，輸送ストレスによると思われる死亡が見られたものの，40日齢前後には安定し始め，その後は特に目立った死亡や疾病の発生は見られなかった。また，摂餌状況は入荷した当初から良好で，経口ワクチン投与中も残餌が出ることはなかった。

第1回目試験の攻撃による累積死亡率の推移を図3に示す。なお，死亡魚は全てギムザ染色法でイリ

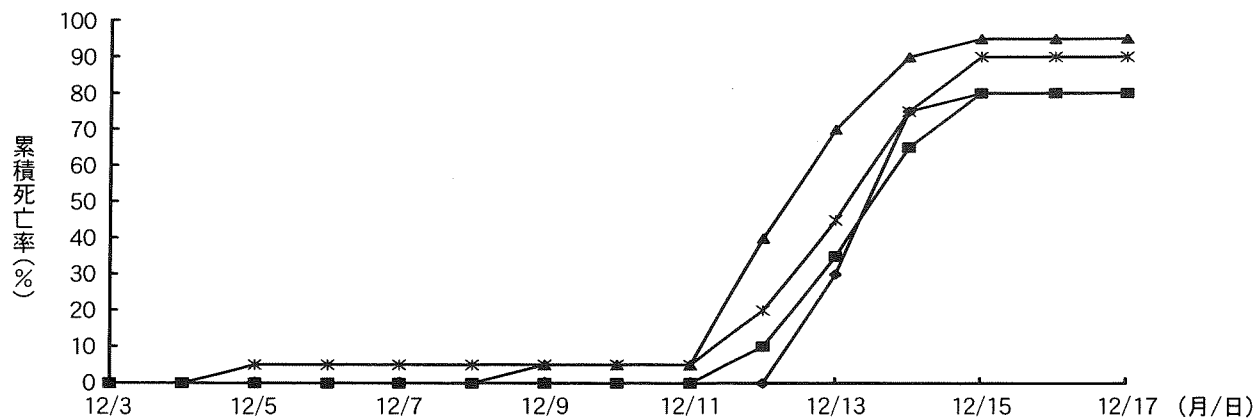


図3 第1回目試験の攻撃による累積死亡率  
◆ 1区    ■ 2区    ▲ 3区    \* 5区

ドウイルス病による死亡であることを確認した。各区とも攻撃後10日前後から急激な死亡が始まり、2週間後の累積死亡率は1区および2区が80%、3区は95%、5区は90%にまで達してワクチン投与区とコントロール区との間で差は見られなかった。経口ワクチンの効果が見られなかったのは、1度のワクチン投与（1週間の連続投与）だけではイリドウイルスを防除するには不十分であったのではないかと推察される。

第2回目試験の攻撃による累積死亡率を図4に示す。ワクチン投与区およびコントロール区ともに少

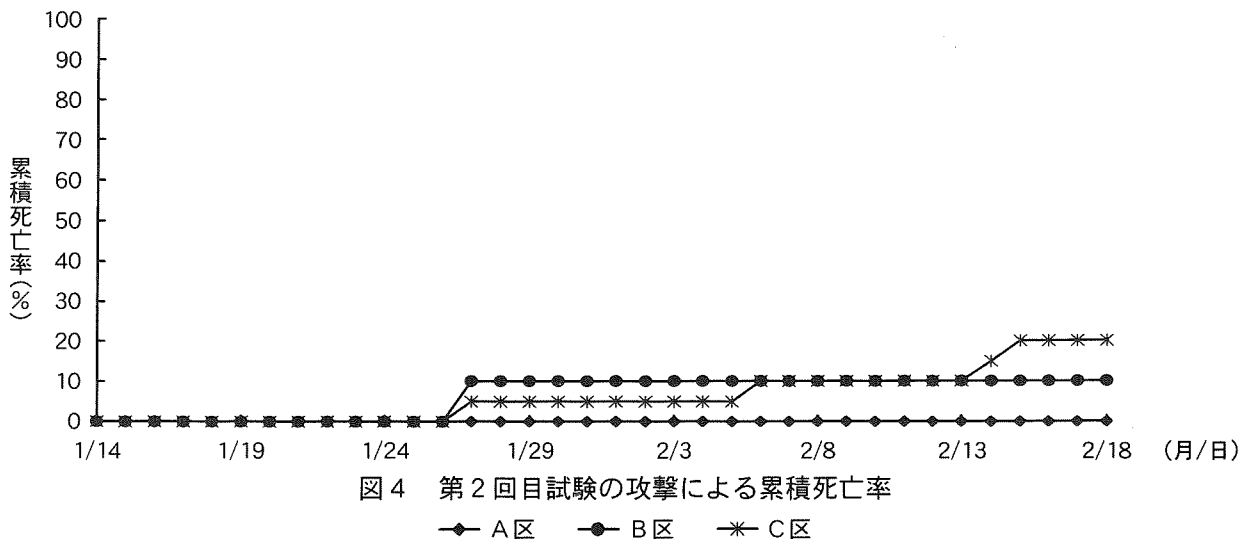


図4 第2回目試験の攻撃による累積死亡率  
◆ A区 ● B区 \* C区

るが効果が上がるのではないかとと思われる。

一方、第2回目試験の攻撃5週間後、生残魚の脾臓をギムザ染色法によって検査したが、イリドウイルス病の感染は認められなかった。また、少数見られた死亡魚はイリドウイルス病に感染していたものの、攻撃実験期間中の水温を25℃以上で維持したにも関わらず、コントロール区の累積死亡率が20%までしか上がらなかった。今回の浸漬攻撃のウイルス感染力価は、使用したウイルス液の感染力価と海水による希釈率から $10^{1.3} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ と計算される。田中ら<sup>2)</sup>は $10^{0.9} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ という低いウイルス感染力価で平均体重9gのマダイ稚魚を1.5時間浸漬することにより、20日間の累積死亡率が80%に達したことを報告している。本報告では、ウイルス感染力価

数しか死亡が見られず、最終的な累積死亡率はA区が0%、B区は10%、C区が20%であった。 $\chi^2$ 検定により解析した結果、A区の累積死亡率はコントロール区と比較して有意 ( $P < 0.01$ ) に低かった。これは経口ワクチンを2回投与したブースター効果が、わずかであるが現れているためであると考えられる。また、 $\chi^2$ 検定によりA区の累積死亡率はB区よりも有意 ( $P < 0.01$ ) に低かったことから、今回の試験に用いた経口ワクチンは、30日齢という早い段階から1週間連続投与し、その後、更に1週間連続のブースター投与をすることで、わずかではあ

は充分であったが、浸漬時間が1時間と短かったことが、累積死亡率の低くなった一因と考えられる。

## 文 献

- 1) 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.
- 2) 田中真二・青木秀夫・清水康弘・今西禎雄・岡本至 (1996): 養殖マダイのイリドウイルス感染症の発生条件と対策について。三重県水産技術センター研究報告, 第6号, 55-61.