

浸漬ワクチンによる滑走細菌症の防除に関する研究

加藤文仁

Studies on Control of Gliding Bacterial Disease by Immersion-vaccination

Fumihito Kato

目次

緒言	240
第1部 BCG 接種用管針を用いた人為感染法の検討	242
材料および方法	242
結果	243
考察	244
第2部 浸漬ワクチン有効性の検討	246
2-1 FKC-R2 の有効性の検討	246
材料および方法	246
実験 I マダイにおける有効性の検討	247
実験 II マダイにおいて防御効果が得られるまでの日数の検討	247
実験 III マダイにおける追加免疫効果の検討	248
実験 IV ヒラメにおける有効性の検討	248
結果	249
実験 I マダイにおける有効性の検討	249
実験 II マダイにおいて防御効果が得られるまでの日数の検討	250
実験 III マダイにおける追加免疫効果の検討	251
実験 IV ヒラメにおける有効性の検討	252
考察	253

2-2	FKC-R2 と FKC-GF の比較	255
	材料および方法	255
	結果	255
	考察	258
2-3	野外分離株で作製した FKC の比較	260
	材料および方法	260
	結果	261
	考察	262
第3部	野外分離株の比較	263
3-1	人為感染による毒性比較	263
	材料および方法	263
	結果および考察	264
3-2	性状試験による表現形質の比較	266
	材料および方法	266
	結果	267
	考察	267
3-3	SDS-PAGE 法による全菌体タンパク質の比較	270
	材料および方法	270
	結果および考察	270
3-4	DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる DNA 相同性の比較	272
	材料および方法	272
	結果および考察	272
3-5	16S rDNA 塩基配列の比較	275
	材料および方法	275
	結果および考察	275
	総括	278

Summary	280
謝辞	283
文献	284

緒言

1960年代に始まった人工種苗生産によってマダイ *Pagrus major* の養殖は西日本を中心に急速に広まり、1997年には年間生産量8万トンに達した(Kumai 2002)が、同時に養殖場では自家汚染の進行と、魚病被害の拡大による多大な損害に悩まされることになった。海産魚の滑走細菌症もマダイ養殖の発展とともに顕在化した疾病の1つで、1970年代の報告(Hikida et al. 1979, 増村・若林 1977)以来、現在に至るまでマダイの種苗生産に大きな損害を与え続けている。また国内のマダイ種苗生産においては、生産技術の進歩により、春期に採卵される従来の種苗に加え、12~1月に採卵される早期生産種苗、また10~11月に採卵される秋期生産種苗など、養殖業者の需要に合わせて生産することが可能になった(宮下・瀬岡 2005)。その結果、従来春期から初夏に発生するとされてきた種苗生産期における滑走細菌症(畑井 2006b, Wakabayashi 2004)は、近年は秋期から初夏までの間に散発的に発生し、流行期が長期化していると言える。近畿大学水産研究所白浜実験場だけでも、例年総生産尾数の数%から10%が本疾病によって失われ、被害額は500万円前後に上るとみられる。本疾病の被害は、1985年頃から養殖生産量が急激に増加したヒラメ *Paralichthys olivaceus* (村田 2000b)においても報告され(Baxa et al. 1986, Baxa et al. 1987b)、さらにその後インダイ、トラフグ、ブリ等にも感染が認められるようになった(Bernerdet 1998, 宮崎ら 1975, Wakabayashi et al. 1986)。また、本疾病は当初日本の海産養殖魚に限定されていたが、近年はヨーロッパ、オーストラリア、アメリカなどのスズキ目およびカレイ目魚類からも報告されており、世界規模で被害を与えている(Alsina and Blanch 1993, Bernerdet et al. 1990, Bernerdet et al. 1994, Chen et al. 1995, Handler et al. 1997, MacVicar and White 1979, Soltani et al. 1994)。

原因菌 *Tenacibaculum maritimum* (Suzuki et al. 2001)(syn. *Flexibacter maritimus* Wakabayashi et al. 1986) は強いタンパク質分解活性を持ち、罹病魚は鰭の崩壊および欠損、体表のびらんや壊死を呈するため(Alsina and Blanch 1993, Baxa et al. 1986, Bernerdet 1998, 畑井 2006b, 増村・若林 1977, Wakabayashi 2004)、他の細菌による二次感染が誘発されて(Bernerdet 1998, 畑井 2006a, 木村・楠田 1983)、さらに被害が大きくなることが多い。本疾病の治療にはニフルスチレン酸ナトリウムによる薬浴が極めて有効であり(Baxa et al. 1988, Bernerdet 1998, 金井 1996, Tabone 1996)、かつてはマダイに対しても投薬されていた。しかし現在はスズキ目魚類への使用が禁止されているため(農林水産省 2006)、本症に対して使用可能な薬浴剤が存在しない。次善の策としてその他の抗菌剤の経口投与が行われているが、罹病魚は摂餌が不活発であり、また罹病魚中の *T. maritimum* は主に体表患部で増殖している(Baxa et al. 1987a)ため、薬浴剤ほど顕著な

効果は期待できない。そのため、現状では頻繁に病魚を取り上げ、収容密度を下げる等の消極的な処置により疾病の蔓延を防ぐことが主要な対策となっている。またヒラメを含むカレイ目魚類においては現在のところ 50g 以下の魚に限りニフルスチレン酸ナトリウムの薬浴による治療が承認されているが(農林水産省 2006)、欧米ではすでに食用魚に対する使用が全面的に禁止されており(Bernerdet 1998)、食品安全上の観点から今後国内でも使用禁止になる可能性が高い。その上、近年は薬剤の使用記録を残すことが規定され(農林水産省 2006)、養殖魚生産現場の情報開示が求められつつあることから、承認薬剤の投与にも消極的にならざるを得ない。以上述べたように、抗菌剤による滑走細菌症の治療が極めて困難になっていることから、本疾病の対策は治療から予防に移っていく必要があると考えられる。

近年水産用ワクチンはその重要性を増してきており、現在国内では 9 種類のワクチンが承認されている(農林水産省 2006)。カラムナリス病や細菌性冷水病に代表される淡水性の滑走細菌症では、実用化には至っていないものの不活化ワクチンの研究が比較的盛んに行われており、疾病の防除に有効であることが実験的に証明されている(Baudin-Laurencin 1991, Fujihara and Nakatani 1971, Holt et al. 1993, 間野ら 1996, Moore et al. 1990, Obachand Lorenzen 1994, Rahman et al. 2000)。それに対して海産魚の滑走細菌症におけるワクチンに関する研究は、以前はほとんど行われていなかったが(Bernerdet 1998, Wakabayashi 2004)最近になってホルマリン不活化菌体、粗 LPS、菌体外毒素などの注射投与に対する血中免疫応答の上昇がシーバス *Dicentrarchus labrax* (Salati et al. 2005)やヒラメ(河原ら 2001)で報告され、ワクチンによる防除の可能性が示された。またスペインではターボット *Scophthalmus maximus* に対するワクチンが開発され、特許が認められているが(Toranzo et al. 2005)、国内の主要養殖魚に対するワクチンの有効性に関する研究は皆無である。したがって国内で最も本疾病の被害を受けるマダイおよびヒラメに対するワクチンの実用化は、水産養殖にとって極めて重要な課題であり、生産現場からも強く求められている。

本研究では、海産魚の滑走細菌症に対するホルマリン不活化ワクチンの実用化を目的として、以下の検討を行った。第 1 部では研究を進める上で不可欠な、再現性が高く効率的な滑走細菌症の人為感染法を確立するために、BCG 接種用管針を用いた体表への接種法を検討した。第 2 部では *T. maritimum* の基準株 R2 (Wakabayashi et al. 1986) (=NCIMB2154, 以下 R2) から作製したワクチンの有効性の検討、および R2 以外の分離株群から作製したワクチンとの比較を行った。また第 3 部では、野外分離株について人為感染による毒性の比較を行うと共に、分類学的検討を行った。

第1部 BCG 接種用管針を用いた人為感染法の検討

ワクチンの効果を判定するには、自然感染あるいは人為感染後の死亡率を対照区と比較する必要がある。人為感染法としては、注射法(飯田ら 1981, 楠田ら 1981, Nakajima et al. 1997, 佐古 1992a, 佐古 1992b), あるいは浸漬法(Elliott and Shotts 1980, 楠田ら 1981)などが一般的に行われている。しかしながら海産魚の滑走細菌症においては注射法では効果がなく(Alsina and Blanch 1993, Péin and Emery 1993, Wakabayashi et al. 1984), 浸漬法も体表を傷つけなければ、疾病の成立が確実ではないとされている(Handler et al. 1997)。しかしワクチンの効果を判定する場合、高い再現性が求められることから、従来の方法による人為感染は不適当な場合が多い。そこで本節では、効率的な滑走細菌症の人為感染法を確立するために、BCG 接種用管針を用いて体表に *T. maritimum* を接種し、滑走細菌症の再現を試みた。

材料および方法

供試魚

近畿大学水産研究所白浜実験場で生産された平均全長 15.0cm, 平均体重 55.2 g のマダイ 50 尾を供試魚として使用した。

供試菌

70%海水改変サイトファーガ寒天培地(以下 MCA70)で 25°C, 24 時間培養した *T. maritimum* R2 を供試菌として用いた。

試験区および人為感染

200L 容パンライト水槽 4 基に供試魚を 10 尾ずつ収容し、体表接種区 3 基および対照区 1 基をそれぞれ設定した。またこれらとは別に 500L 容パンライト水槽 1 基に供試魚を 30 尾収容し浸漬区とした。体表接種区では、R2 を PBS に懸濁した菌液に BCG 接種用管針(株式会社日本ビーシーサプライ, Fig. 1-1)の先端を数秒間浸した後、供試魚の左体側面を 1 回押圧することによって体表に接種を行った(Fig. 1-2 以下スタンプ接種)。菌懸濁液の濃度はそれぞれ 4.0×10^9 , 2.0×10^{10} , 1.5×10^{11} CFU/mL とした。また対照区では PBS を同様の方法でスタンプ接種した。浸漬区では供試魚を 5.3×10^8 CFU/mL の菌懸濁海水に 20 分間浸漬することによって人為感染を行った。人為感染の翌日から 7 日後まで 1 日 1 回死亡魚を取り上げた。また死亡魚の体表患部を検鏡した後、MCA70 を用

いて患部，肝臓，腎臓からの細菌分離を試みた。

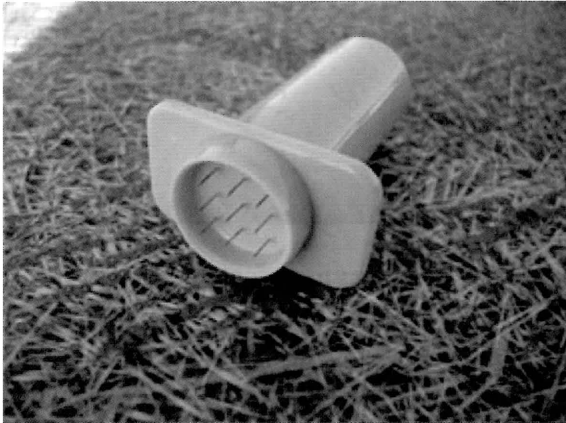


Fig. 1-1. Injector designed for human BCG vaccination

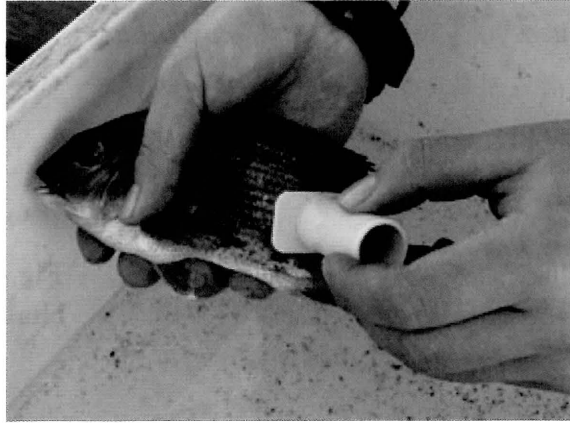


Fig. 1-2. Stamp injection on body surface of red sea bream.

結果

人為感染後の死亡率の推移を Fig. 1-3 に示した。スタンプ接種を行った試験区の累積死亡率は，生菌濃度 4.0×10^9 CFU/mL で攻撃した区では 40%， 2.0×10^{10} および 1.5×10^{11} CFU/mL で攻撃した区ではともに 100%であった。有意水準 5%で χ^2 検定を行ったところ，3つのスタンプ接種区はそれぞれ対照区に対して有意差が認められた。また浸漬攻撃区および対照区の供試魚は滑走細菌症の症状を呈さず，供試魚の死亡は認められなかった。

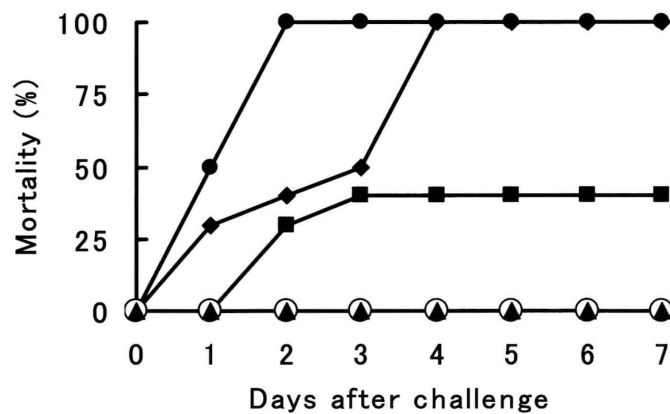


Fig. 1-3. Changes in the mortalities of red sea bream after stamp challenge with *T. maritimum* R2. ■ 4.0×10^9 , ◆ 2.0×10^{10} , ● 1.5×10^{11} , ○ immersion, ▲ control.

スタンプ接種を行ったすべての供試魚の接種部位に潰瘍状の患部が形成され (Fig. 1-4), 顕微鏡下で *T. maritimum* 様の滑走運動をする長桿菌が多数観察された (Fig. 1-5)。また人為感染 1 日後に死亡した供試魚体表から *T. maritimum* が分離された。しかしながら肝臓および腎臓からは *T. maritimum* は分離されなかった。なお, 実験期間中の平均水温は 21.8°C であった。

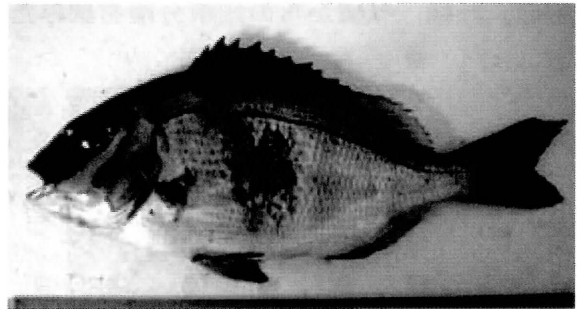


Fig. 1-4. Red sea bream infected by stamp challenge.

考察

スタンプ接種区では供試魚の体表に潰瘍状の患部が形成され, 40~100%の死亡率が認められた。さらに死亡魚の患部から *T. maritimum* が分離され, 滑走細菌症の感染成立が確認された。したがってスタンプ接種によって滑走細菌症の再現が可能であることが明らかとなった。さらに3つのスタンプ接種区において, 最も低濃度 (4.0×10^9 CFU/mL) で攻撃したスタンプ接種区の死亡率は40%にとどまった。また接種菌濃度が高い試験区で早期に死亡する傾向が認められた。この結果は菌懸濁液の濃度を調整することで死亡率のコントロールが可能であることを示唆している。皮下注射によって攻撃した場合, 注射のダメージにより対照区に生菌接種区と同等の死亡率が認められることもあるが (Baxa et al. 1987a), 本実験では PBS を接種した対照区に死亡が認められなかった。したがってスタンプ接種が魚体に与えるダメージは無視できるものと考えられる。

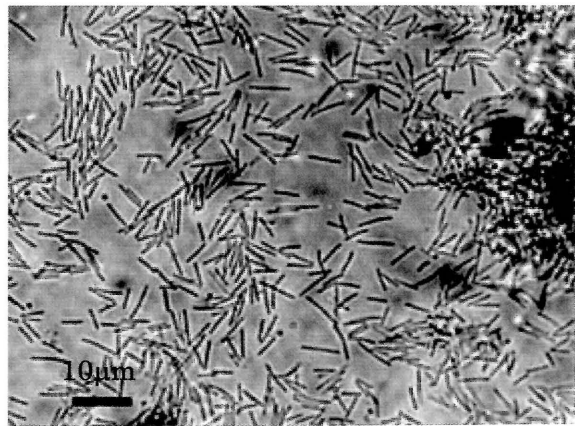


Fig. 1-5. *T. maritimum* in smear of surface lesion of infected red sea bream.

また, 同時に行った浸漬法による攻撃では滑走細菌症を再現することはできなかった。マダイでは滑走細菌症は海水温 16~20°C で発生することが多い (Donald 1981) ことから, 本実験の水温 21.8°C は滑走細菌症の再現適温よりやや高かったと考えられる。またマダイ種苗生産現場では成長とともに被害が収束するが, 供試魚 (平均体重

55.2g) は通常滑走細菌の感染試験に使用されるサイズより大きかったため、浸漬法による感染の成立が困難であった可能性が高い。そのような条件下にも関わらず、本実験ではスタンプ接種によって感染を成立させることができたことから、スタンプ接種は滑走細菌症の人為感染法として浸漬法よりも優れていることが明らかとなった。水温や入手可能な実験魚のサイズは時期によって異なるが、スタンプ接種法により滑走細菌症の人為感染が周年実施可能となった。体表局所に限定した攻撃が可能であることから、ワクチン開発のみならず、病原機構の解明などに広く応用可能な手法である。

水温が低く魚体が小さい場合など、条件によっては浸漬法でも人為感染が成立することから、以下の実験では浸漬法による攻撃も併用した。予備攻撃試験の結果、浸漬法では攻撃強度や再現性が不十分であると判定された場合はスタンプ法を用いた。

第2部 浸漬ワクチン有効性の検討

滑走細菌症は様々な海水魚で発生しているが、国内ではマダイおよびヒラメにおける被害が最も深刻である(畑井 2006b, 金井 1996, 水野 2006, Wakabayashi 2004)。そこで本研究ではこれら2魚種を対象として、浸漬ワクチンによる滑走細菌症の防除を試みた。

ワクチン接種法として注射法が最も有効であることはよく知られているが(Nakanishi 1998, 矢野 1995), 魚類では体表における局所的免疫応答が体内部のそれと独立したものである可能性が示されており(Lobb and Clem 1981, Rombout et al. 1986), 体表局所に感染する *T. maritimum* の場合, 抗原により直接体表を刺激する方法が効果的であると期待される。また, 本疾病が流行する稚魚期においては魚体が小さいため, 注射法は効率的ではない。以上の理由から, 本研究では浸漬法を採用した。

2-1 FKC-R2 の有効性の検討

本節では *T. maritimum* の基準株 R2 から作製した不活化菌体 (以下 FKC-R2) を供試ワクチンとして, 人為感染したマダイにおける滑走細菌症発症予防効果を検討した。加えて, 防御効果が得られるワクチン接種後の日数, および追加免疫の効果についても検討した。さらにヒラメにおいても FKC-R2 の有効性の検討を行った。

材料および方法

供試ワクチン

ワクチンの抗原として, 2001年に東京大学から近畿大学水産研究所白浜実験場に分与され, -80°C で凍結保存されている *T. maritimum* の基準株 R2 を使用した。大きさの異なるアルミバット2枚 ($312 \times 241 \times 35\text{mm}$, $349 \times 274 \times 37\text{mm}$) の小さい方を底皿, 大きい方を蓋として重ね合わせて乾熱滅菌した容器に作製した MCA70 に, 同液体培地で 25°C , 24時間前培養した供試菌体を均一に塗抹した。 25°C , 48時間培養した後, 寒天培地を削らないように注意しながら, 滅菌したスライドガラスで菌体を掻き集めて回収した。この菌体に 1.5%ホルマリン PBS を 10 倍量加え, ガラスホモジナイザーでホモジナイズして均一に懸濁させた後, 4°C , 48時間静置して不活化させた。このホルマリン不活化菌体 (FKC-R2) を洗浄せずに希釈し, ワクチンとして供試した。

実験Ⅰ マダイにおける有効性の検討

供試魚

近畿大学水産研究所白浜実験場で生産された平均全長 4.9cm, 平均体重 1.6 g のマダイ稚魚 120 尾を供試魚として使用した。

試験区およびワクチン接種

500L 容パンライト水槽 2 基に供試魚を 60 尾ずつ収容し, ワクチン接種区および対照区にそれぞれ設定した。ワクチン接種は, 海水に FKC-R2 を湿重量で 20 μ g/mL の濃度で懸濁し, 供試魚を 30 分間浸漬することによって行った。

人為感染

ワクチン接種 1 週間後に, 両区それぞれ 30 尾ずつに 1.6 $\times 10^7$ CFU/mL および 2.2 $\times 10^7$ CFU/mL の 2 段階の生菌濃度で浸漬攻撃を行った。攻撃は MCA70 で 25 $^{\circ}$ C, 約 24 時間培養した R2 を濾過海水に懸濁し, 供試魚を 20 分間浸漬して行った。供試魚はそれぞれ 200L 容パンライト水槽に収容し, 人為感染の翌日から 7 日後まで約 12 時間ごとに死亡魚を取り上げ, 以下の式により有効率を算出した。

$$\text{有効率(\%)} = \left(1 - \frac{\text{FKC投与区の死亡率}}{\text{FKC非投与区の死亡率}}\right) \times 100$$

また死亡魚の体表患部を検鏡した後, 体表患部, 肝臓, 腎臓より MCA70 上に細菌の分離を試みた。

実験Ⅱ マダイにおいて防御効果が得られるまでの日数の検討

供試魚

近畿大学水産研究所白浜実験場で生産された平均全長 8.8cm, 平均体重 14.6 g のマダイ稚魚 200 尾を供試魚として使用した。

試験区およびワクチン接種

200L 容パンライト水槽 4 基に供試魚を 50 尾ずつ収容し, ワクチン接種 3 日後攻撃区, 1 週間後攻撃区, 2 週間後攻撃区, および対照区にそれぞれ設定した。ワクチン接種は, 海水に FKC-R2 を湿重量で 20 μ g/mL の濃度で懸濁し, 供試魚を 30 分間浸漬することによって行った。人為感染を全区同時に実施できるように, 攻撃試験日から逆算してワクチン接種日を決定した。

人為感染

実験 I と同様に培養した R2 を濾過海水で 1.1×10^8 CFU/mL に懸濁し、供試魚を 20 分間浸漬した。実験 I と同様に有効率を算出し、死亡魚については体表患部の顕微鏡観察と *T. maritimum* の分離を試みた。

実験 III マダイにおける追加免疫効果の検討

供試魚

近畿大学水産研究所白浜実験場で生産された平均全長 5.7cm、平均体重 2.5g のマダイ稚魚 120 尾を供試魚として使用した。

試験区およびワクチン接種

500L 容パンライト水槽 4 基に供試魚を 30 尾ずつ収容し、ワクチン接種は攻撃 1 週間前のみ（以下 1 週間前接種区）、2 週間前のみ（以下 2 週間前接種区）、1 および 2 週間前の 2 回（以下 2 回接種区）、および非接種（以下対照区）の 4 設定とした。FKC-R2 の接種は実験 I と同様に行った。接種日は人為感染を全区同時に実施できるように、攻撃試験日から逆算して決定した。

人為感染

実験 I と同様に培養、調製した R2 を濾過海水で 2.4×10^7 CFU/mL に懸濁し、供試魚を 20 分間浸漬した。実験 I と同様に有効率を算出し、死亡魚については体表患部の顕微鏡観察と *T. maritimum* の分離を試みた。

実験 IV ヒラメにおける有効性の検討

供試魚

近畿大学水産研究所白浜実験場で生産された平均全長 5.9cm、平均体重 2.3g のヒラメ稚魚を 120 尾使用した。

試験区およびワクチン接種

200L 容パンライト水槽を用いて実験 II と同様の 4 試験区を設定し、各々 30 尾ずつ供試魚を収容した。ワクチン接種は、海水に FKC-R2 を湿重量で $20 \mu\text{g/mL}$ の濃度で懸濁し、供試魚を 30 分間浸漬することによって行った。

人為感染

R2による予備攻撃では十分な死亡率が得られなかったため、2003年6月に近畿大学水産研究所白浜実験場で飼育されていたヒラメより分離された *T. maritimum* GF0609（以下GF0609）を人為感染に用いた。GF0609を約24時間培養し、濾過海水で 4.5×10^7 CFU/mLに懸濁した菌液中に供試魚を20分間浸漬した。実験Iと同様に有効率を算出し、死亡魚については体表患部の顕微鏡観察と *T. maritimum* の分離を試みた。

結果

実験I マダイにおける有効性の検討

人為感染後の生残率の推移を Fig. 2-1-1 および Fig. 2-1-2 に示した。生菌濃度 1.6×10^7 CFU/mLで浸漬攻撃したグループの最終生残率は、FKC-R2接種区93.3%、対照区60.0%、有効率は83.3%であった。また 2.2×10^7 CFU/mLの生菌濃度で攻撃したグループの最終生残率は、FKC-R2接種区83.3%、対照区53.3%、有効率64.3%であった。有意

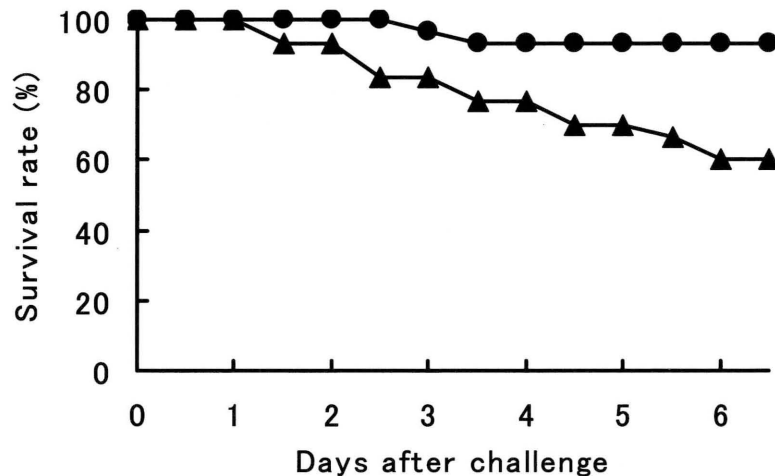


Fig. 2-1-1. Changes in the survival rates of red sea bream immersion-vaccinated with FKC of *T. maritimum* R2, after immersion challenge with the bacterium 1.6×10^7 CFU/ml. ● vaccinated, ▲ control.

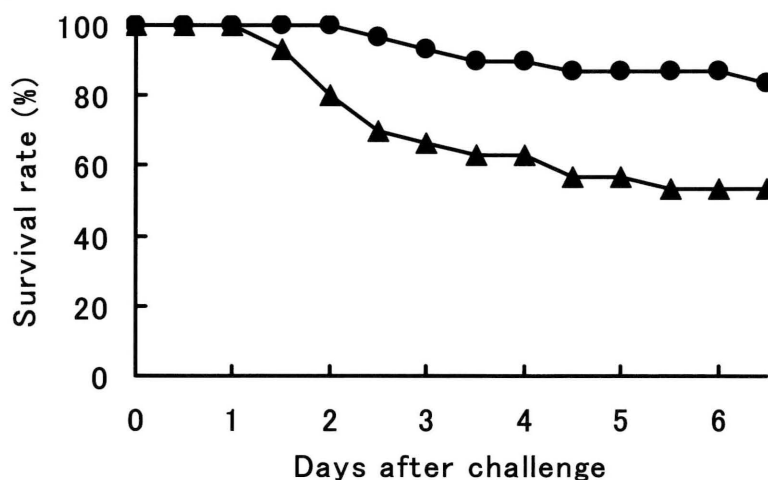


Fig. 2-1-2. Changes in the survival rates of red sea bream immersion-vaccinated with FKC of *T. maritimum* R2, after immersion challenge with the bacterium 2.2×10^7 CFU/ml. ● vaccinated, ▲ control.

水準 5%で χ^2 検定を行ったところ、2つのFKC-R2接種区の最終生残率はそれぞれの対照区に対して有意に高かった。死亡魚には尾柄部体表にスレ様の変色および鱗の融解が認められた (Fig. 2-1-3)。体表患部を検鏡した結果、すべての死亡魚で *T. maritimum* 様の滑走運動をする長桿菌が多数観察された。攻撃後 24 時間以内に死亡した供試魚の体表患部からは *T. maritimum* が分離されたが、36 時間以後に死亡した供試魚からは *T. maritimum* は分離されず、*Vibrio* 属細菌が分離された。肝臓および腎臓からはすべての死亡魚で *T. maritimum* は分離されなかった。なお、実験期間中の平均水温は 20.0°Cであった。

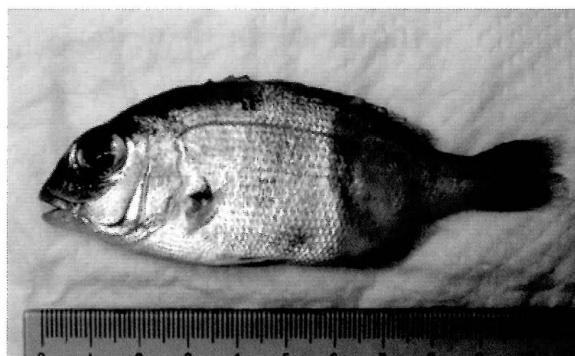


Fig. 2-1-3. Red sea bream infected by immersion challenge.

実験 II マダイにおいて防御効果が得られるまでの日数の検討

人為感染後の生残率の推移を Fig. 2-1-4 に示した。最終生残率は 3 日後攻撃区 4%、1 週間後攻撃区 56%、2 週間後攻撃区 76%、対照区 0%で、有効率は 3 日後攻撃区 4.0%、1

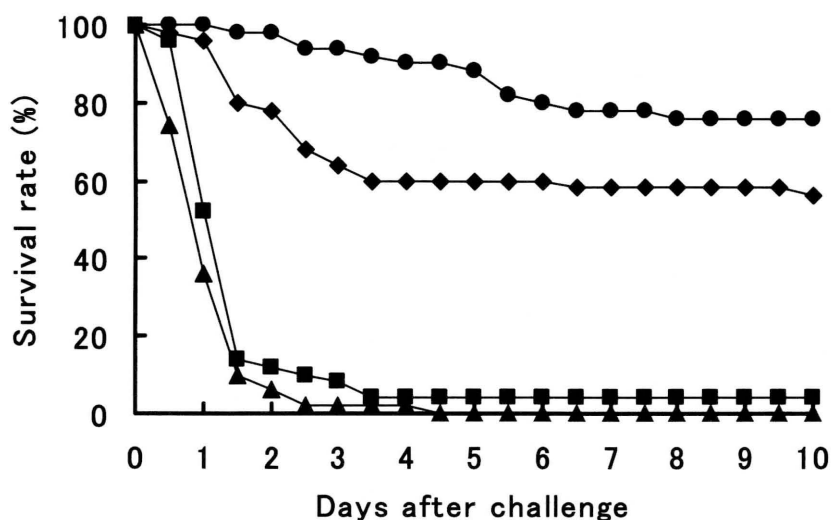


Fig. 2-1-4. Changes in the survival rates of red sea bream immersion-vaccinated with FKC of *T. maritimum* R2, after immersion challenge with the bacterium. ■ vaccinated 3 days before challenge, ◆ vaccinated 1 week before challenge, ● vaccinated 2 weeks before challenge, ▲ control.

週間後攻撃区 56.0%，2週間後攻撃区 76.0%であった。有意水準 5%で χ^2 検定を行ったところ、1週間後攻撃区および2週間後攻撃区の最終生残率は対照区に対して有意に高かった。死亡魚には尾柄部体表にスレ様の変色および鰭の融解が認められた。体表患部を検鏡した結果、すべての死亡魚で *T. maritimum* 様の滑走運動をする長桿菌が多数観察された。攻撃後 24 時間以内に死亡した供試魚の体表患部からは *T. maritimum* が分離されたが、36 時間以後に死亡した供試魚からは *T. maritimum* は分離されず、*Vibrio* 属細菌が分離された。肝臓および腎臓からはすべての死亡魚で *T. maritimum* は分離されなかった。なお、実験期間中の平均水温は 20.3℃であった。

実験 III マダイにおける追加免疫効果の検討

人為感染後の生残率の推移を Fig. 2-1-5 に示した。1週間前接種区 63.3%，2週間前接種区 63.3%，2回接種区 76.7%，対照区 10.0%，有効率は1週間前接種区 59.3%，2週間前接種区 59.3%，2回接種区 74.1%であった。有意水準 5%で χ^2 検定を行ったところ、1週間前接種区、2週間前接種区および2回接種区にそれぞれ対照区に対する有意差が認められた。しかし2回接種区と2つの1回接種区の間には有意差は認められなかった。死亡魚には尾柄部体表にスレ様の変色および鰭の融解が認められた。体表患部を検鏡した結果、すべての死亡魚で *T. maritimum* 様の滑走運動をする長桿菌が多数観察された。攻撃後 24

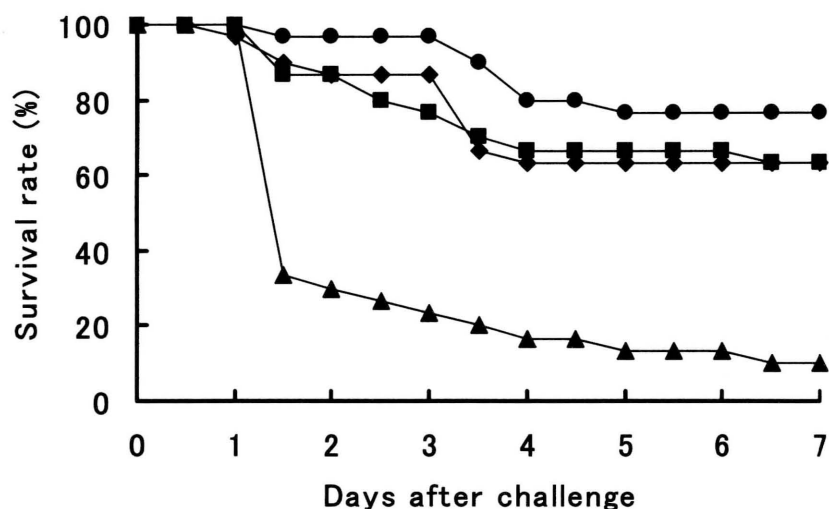


Fig. 2-1-5. Changes in the survival rates of once- and twice-vaccinated red sea bream, after challenge. ■ once- vaccinated 1 week before challenge, ◆ once- vaccinated 2 weeks before challenge, ● twice- vaccinated 1 week and 2 weeks before challenge, ▲ control.

時間以内に死亡した供試魚の体表患部からは *T. maritimum* が分離されたが、36 時間以後に死亡した供試魚からは *T. maritimum* は分離されず、*Vibrio* 属細菌が分離された。肝臓および腎臓からはすべての死亡魚で *T. maritimum* は分離されなかった。なお、実験期間中の平均水温は 20.0℃であった。

実験 IV ヒラメにおける有効性の検討

人為感染後の生残率の推移を Fig. 2-1-6 に示した。最終生残率は 1 週間後攻撃区、3 日後攻撃区およびワクチン非投与区はいずれも 0%，2 週間後攻撃区 16.7%，有効率は 2 週間後攻撃区 16.7%，1 週間後攻撃区および 3 日後攻撃区はともに 0%であった。有意水準 5%で χ^2 検定を行ったところ、試験区間に有意差は認められなかった。死亡魚には尾柄部体表にスレ様の変色および鰭の融解が認められた。体表患部を検鏡した結果、すべての死亡魚で *T. maritimum* 様の滑走運動をする長桿菌が多数観察された。攻撃後 12 時間以内に死亡した供試魚の体表患部からは *T. maritimum* が分離されたが、24 時間以後に死亡した供試魚からは *T. maritimum* は分離されず、*Vibrio* 属細菌が分離された。肝臓および腎臓からはすべての死亡魚で *T. maritimum* は分離されなかった。なお、実験期間中の平均水温は 25.0℃であった。

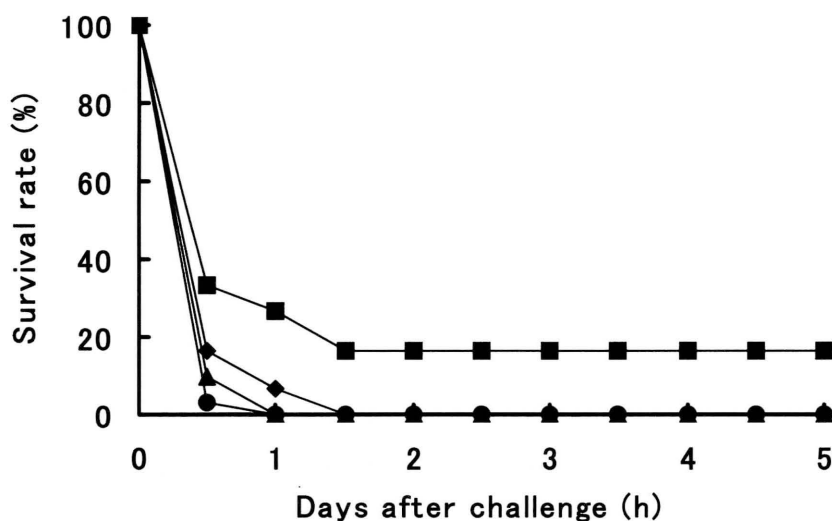


Fig. 2-1-6. Changes in the survival rates of Japanese flounder immersion-vaccinated with FKC of *T. maritimum* R2, after immersion challenge with *T. maritimum* GF0609. ■ vaccinated 3 days before challenge, ◆ vaccinated 1 week before challenge, ● vaccinated 2 weeks before challenge, ▲ control.

考察

本節では滑走細菌症に対する予防効果を検討するために、*T. maritimum* R2 のホルマリン不活化菌体を抗原とした浸漬ワクチンをマダイおよびヒラメに接種し、人為感染でその有効性を検定した。なお、本研究では *T. maritimum* の人為感染には効果が低いとされていた浸漬法^{27,44)}によって人為感染を実施したが、対照区では90%以上の死亡率が認められた。これは $1.6 \times 10^7 \sim 1.1 \times 10^8$ CFU/mL という高濃度の菌液に供試魚を浸漬したためと考えられる。

実験 I では、マダイにおいて FKC-R2 浸漬による防御効果を判定した。 1.6×10^7 CFU/mL および 2.2×10^7 CFU/mL の 2 段階の生菌濃度で浸漬攻撃を行ったところ、有効率はそれぞれ 83.3%, 64.3%であった。実験条件下で有効率が 60%に満たないワクチンは持続期間が短く、野外試験において予防効果が低いと言われている (Donald 1981) ことから、有効率 64.3%以上であったマダイでは、滑走細菌症に対して FKC 浸漬ワクチンが有効であることが示された。

実験 II では、ワクチン接種後の経過日数の相違による影響を検討した。2 週間後攻撃区で有効率 76.0%, 1 週間後攻撃区で 56.0%, 3 日後攻撃区で 4%となった。ワクチン接種後

1 週間目には免疫の効果が現れ、ワクチン接種から人為感染までの期間が長い試験区で有効率が高くなる傾向が認められた。一般的にマダイの養殖用種苗は陸上水槽で全長 1~3cm まで飼育された後、海面の小割り生簀に「沖出し」される(宮下・瀬岡 2005)。滑走細菌症が蔓延するのは主に沖出し数週間後から 6cm 程度に成長するまでである(増村・若林 1977)ことから、ワクチンによって滑走細菌症を防除するためには、少なくとも沖出し1週間前までにワクチンを接種することが望ましい。

実験 III では 2 回接種区を設定し、1 回接種区および対照区と比較することで、追加免疫効果の検討を行った。sea bass を供試魚とした報告では *T. maritimum* ホルマリン不活化菌体に対する血中抗体価は 1 回接種 20 日後の 128 倍に対し 2 回接種 15 日後は 512 倍と顕著なブースター効果が認められている(Salati et al. 2005)。本研究においても 2 回接種区の有効率は 74.1%で、いずれも 59.3%であった 1 回接種区よりも高い結果が得られたことから、2 回以上の免疫によってより高い効果が得られることが確認された。

マダイの滑走細菌症に対する浸漬ワクチンの有効性が明らかとなったが、マダイにおいては沖出し直後から水温が上昇し滑走細菌症が収束するまでの数ヶ月間、ワクチンの効果が持続することが望ましい。今後は浸漬ワクチンによる抗病性の持続期間を明らかにする必要がある。

実験 IV では FKCR2 の有効性をヒラメにおいても検討したが、マダイ由来の R2 による予備攻撃では十分な感染が認められなかった。一方ヒラメ病魚から分離された GF0609 で攻撃した場合、対照区の死亡率が 100%を示したことから、特定の菌株に対する感受性が魚種によって異なることが示唆された。同時に、同一魚種であっても菌株によって毒性が異なることも明らかとなった。GF0609 による攻撃では、2 週間後攻撃区においても有効率 16.7%であり、FKCR2 による感染防御効果が極めて低かった。原因の 1 つとしてワクチンに用いた株と人為感染に使用した株が異なっていたことが疑われたため、次節ではヒラメ分離株で作製したワクチンの有効性を検討した。

2-2 FKC-R2 と FKC-GF の比較

1-1 において、マダイでは有効であった FKC-R2 が GF0609 で攻撃したヒラメでは有効性が認められなかったため、本節では GF0609 で不活化ワクチンを作製し(以下 FKC-GF)、FKC-R2 とともにその有効性をマダイおよびヒラメにおいて検討した。

材料および方法

供試魚

近畿大学水産研究所白浜実験場で生産された平均全長 11.8cm, 平均体重 30.7 g のマダイ 120 尾, 平均全長 18.7cm, 平均体重 63.6 g のヒラメ 120 尾を使用した。

供試ワクチン

1-1 で使用した FKC-R2, およびヒラメ由来株 GF0609 を FKC-R2 と同様の方法で不活化した菌体 (FKC-GF) を供試ワクチンとした。

試験区およびワクチン接種

200L 容パンライト水槽 6 基に供試魚を 10 尾ずつ収容し, 3 基を R2 攻撃区, 3 基を GF0609 攻撃区とした。さらに両区各 1 基を FKC-R2 接種区, FKC-GF 接種区, および対照区に設定した。ワクチン接種は浸漬法によって行い, 浸漬濃度は湿重量で 20 μ g/mL, 浸漬時間は 20 分とした。

人為感染

FKC 接種 10 日後に, MCA70 で 25 $^{\circ}$ C, 約 24 時間培養し, PBS に懸濁した R2 および GF0609 の菌懸濁液を BCG 接種用管針で供試魚体表に接種した。R2 の接種菌液の濃度はマダイにでは 2.2 $\times 10^{10}$ CFU/mL, ヒラメでは 6.6 $\times 10^{10}$ CFU/mL, GF0609 の濃度はマダイでは 3.0 $\times 10^{10}$ CFU/mL, ヒラメでは 6.1 $\times 10^{10}$ CFU/mL であった。人為感染の翌日から 7 日後まで約 12 時間ごとに死亡魚を取り上げ, 有効率を算出した。死亡魚については体表患部の顕微鏡観察後, 体表患部から MCA70 上に *T. maritimum* の分離を試みた。

結果

マダイ

R2 攻撃区の生残率の推移を Fig. 2-2-1 に示した。最終生残率は FKC-R2 接種区では 80%, FKC-GF 接種区では 40%, 対照区では 20%であった。有効率は FKC-R2 接種区では 75%, FKC-GF 接種区では 25%であった。有意水準 5%で χ^2 検定を行ったところ, FKC-R2 接種区の最終生残率は対照区に対して有意に高かった。

GF0609 攻撃区の生残率の推移を Fig. 2-2-1 に示した。最終生残率は FKC-R2 接種区

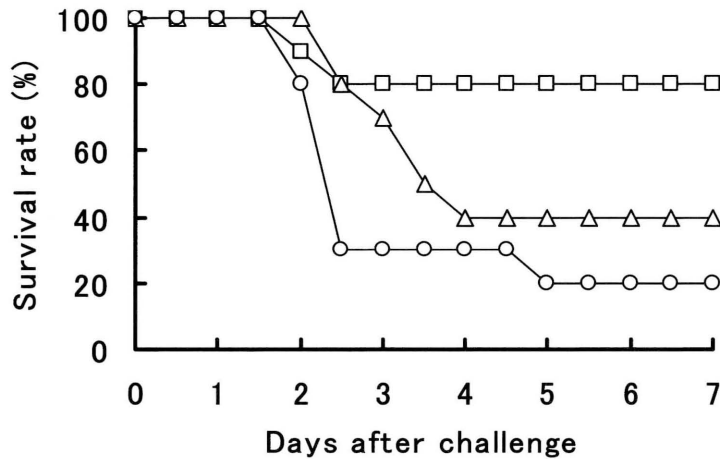


Fig. 2-2-1. Changes in the survival rate of immersion-vaccinated red sea bream after challenge with R2 strain. (□) Vaccinated with FKC-R2, (△) vaccinated with FKC-GF, (○) control.

では 100%, FKC-GF 接種区では 100%, 対照区では 90%であった。この結果からヒラメ由来株 GF0609 はマダイに対して毒性が弱いことが示された。

すべての死亡魚の菌接種部位には潰瘍状の患部が形成され (Fig. 2-2-2), 体表患部を検鏡した結果, *T. maritimum* 様の滑走運動をする長桿菌が多数観察された。また死亡魚からは *T. maritimum* は分離されず, 体表患部からビブリオ属細

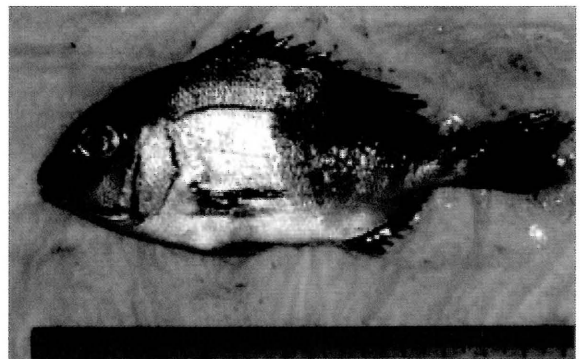


Fig. 2-2-2. Red sea bream infected by stamp challenge.

菌が分離された。なお、実験期間中の平均水温は 21.7°C であった。

ヒラメ

R2 攻撃区の生残率の推移を Fig. 2-2-3 に示した。最終生残率は FKC-R2 接種区では 80%，

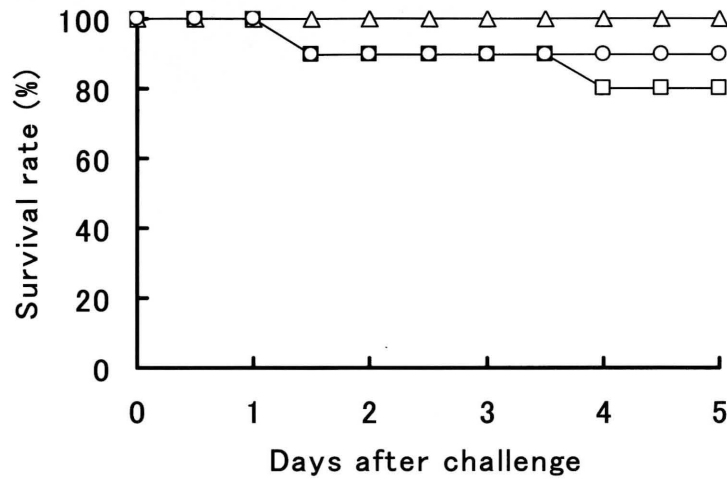


Fig. 2-2-3. Changes in the survival rate of immersion-vaccinated Japanese flounder after challenge with R2 strain. (□) Vaccinated with FKC-R2, (△) vaccinated with FKC-GF, (○) control.

FKC-GF 接種区では 80%，対照区では 100%であった。このことからマダイ由来株 R2 はヒラメに対して毒性が弱いことが確認された。

GF0609 攻撃区の生残率の推移を Fig. 2-2-4 に示した。最終生残率は FKC-R2 接種区では 0%，FKC-GF 接種区では 0%，対照区では 10%であった。

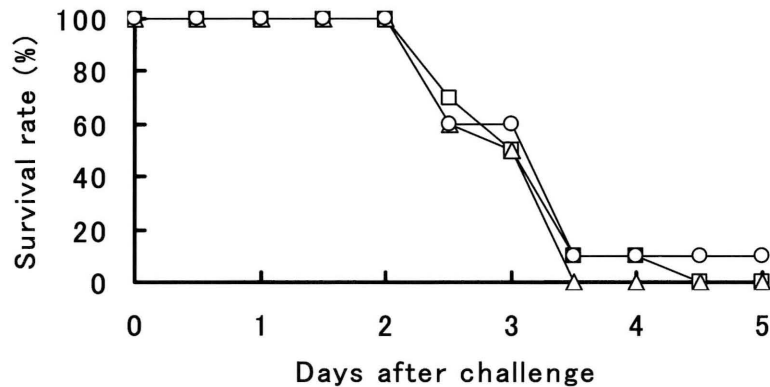


Fig. 2-2-4 Changes in the survival rate of immersion-vaccinated Japanese flounder after challenge with R2 strain. (□) Vaccinated with FKC-R2, (△) vaccinated with FKC-GF, (○) control.

有意水準 5%で χ^2 検定を行ったが、R2 攻撃区、GF0609 攻撃区いずれにおいても試験区間に有意差は認められなかった。そのため有効率は算出していない。

死亡魚の菌接種部位には潰瘍状の患部が形成され (Fig. 2-2-5), 体表患部を鏡した結果, すべての死亡魚で *T. maritimum* 様の滑走運動をする長桿菌が多数観察された。また死亡魚からは *T. maritimum* は分離されず, 体表患部からビブリオ属細菌が分離された。なお, 実験期間中の平均水温は 18.9°Cであった。

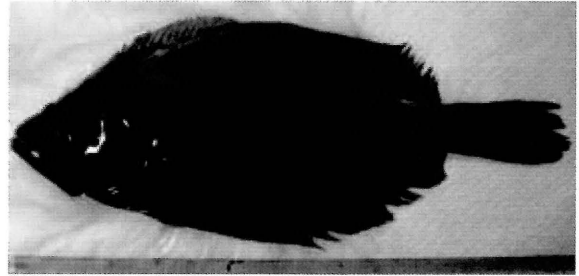


Fig. 2-2-5. Japanese flounder infected by stamp challenge.

考察

前節のヒラメに対する GF0609 攻撃では, いずれの試験区においても有効率 16.7%以下であり, 感染防御効果が認められなかった。原因の 1 つとしてワクチンに用いた株 (R2) と人為感染に使用した株 (GF0609) が異なっていたことが疑われたため, 本節では FKC-R2, FKC-GF 両ワクチンの有効性をマダイおよびヒラメでそれぞれ検討した。攻撃には両魚種ともに R2 および GF0609 の 2 株を用いたが, GF0609 で攻撃したマダイおよび R2 で攻撃したヒラメの生残率は, 対照区でも 80%以上を示した。このことは R2 および GF0609 が異なる種特異的病原因子を持つことを示唆している。

R2 で攻撃したマダイにおいては FKC-R2 接種区で高い有効率 (75%) が得られ, *T. maritimum* の感染に対する浸漬ワクチンの効果が確認された。しかし FKC-GF 接種区の有効率は低く (25%), R2 と GF0609 ではワクチンとしての効果が異なることが明らかとなった。これには R2 および GF0609 の病原因子の違いが影響している可能性が考えられる。

一方 FKC-R2, FKC-GF いずれのワクチンによっても, GF0609 の攻撃によるヒラメの滑走細菌症を抑制することはできなかった。ワクチン株と攻撃株が同じ GF0609 であっても効果は見られず, ヒラメではマダイと異なり FKC 浸漬ワクチンの有効性を確認することができなかった。その理由としては, ホルマリンで不活化した *T. maritimum* のヒラメへの筋肉内接種によって血中抗体価の上昇が認められることから (河原ら 2001), ヒラメでは体内の免疫系と比較して体表の局所免疫が不十分である可能性が考えられる。FKC 接種から人為感染までの期間 (10 日間) が短すぎたため, すなわちヒラメの免疫応答がマダイに

比べて緩やかであることも考えられる。あるいは、GF0609 の病原因子は R2 に比べてホルマリンによる変性を受けやすいのかも知れない。

前節および本節の人為感染試験では、滑走細菌症の典型的な症状を示し、体表患部に *T. maritimum* 様の長桿菌が多数観察されたにも関わらず、*T. maritimum* を培地上に分離できない事例が多数見られた。体表患部には *T. maritimum* の他にも多くの細菌が混在しており、その多くは *T. maritimum* の発育を阻害する(Pazos et al. 1996)。本実験においても体表患部から分離された *Vibrio* 属細菌が *T. maritimum* の発育を阻害した可能性が考えられる。

2-3 野外分離株で作製したFKCの比較

前節ではヒラメだけではなく、マダイにおいてもヒラメ分離株由来ワクチンの防御効果が低いことが示唆された。そこでワクチンの実用化に当たっては多数の野外分離株からFKCを作製し、さらに検討を行う必要があると考えられた。本節では野外分離株14株で作製したFKCの有効性をマダイを供試魚として比較した。

材料および方法

供試魚

近畿大学水産研究所白浜実験場で生産されたマダイ（平均全長 5.4cm，平均体重 3.1g）を 450 尾使用した。

供試ワクチン

1990年から2003年に和歌山県の養殖場において滑走細菌症の症状を呈した罹病魚からMCA70上に分離され、コロニーの色調および形状，顕微鏡観察によって *T. maritimum* と簡易同定されたマダイ由来11株，ヒラメ由来1株，トラフグ由来1株（Table 2-3-1）を供試した。1977年に広島県のマダイ病魚から分離された *T. maritimum* の基準株，R2を加えた14株について，2-1のFKC-R2と同じ方法で不活化し，供試ワクチンとした。

Table 2-3-1. Strains of gliding bacteria used for vaccination.

No.	Strain	Date of isolation	Host fish	Location
1	R2	Jul. 30, 1977	Red sea bream	Hiroshima
2	SM2202s	Feb. 2, 2002	Red sea bream	Shirahama
3	OM2203	Mar. 23, 2002	Red sea bream	Kushimoto
4	SM2325	Mar. 25, 2002	Red sea bream	Shirahama
5	SM3322c	Mar. 22, 2003	Red sea bream	Shirahama
6	OM3510	May 10, 2003	Red sea bream	Kushimoto
7	GF0609	Jun. 9, 2003	Japanese flounder	Shirahama
8	SUT3523	May 23, 2003	Tiger puffer	Susami
9	MC9210	Mar. 25, 1992	Red sea bream	Shirahama
10	MC9226	Jun. 1, 1992	Red sea bream	Shirahama
11	MC9227	Jun. 1, 1992	Red sea bream	Shirahama
12	MG9112	Apr. 19, 1992	Red sea bream	Shirahama
13	MK9035	Jun. 6, 1990	Red sea bream	Shirahama
14	SM2202n	Feb. 2, 2002	Red sea bream	Shirahama

試験区設定およびワクチンの投与

200L 容パンライト水槽 15 基に供試魚を 30 尾ずつ収容した。14 基を FKC 接種区，1 基を対照区に設定した。FKC 接種は浸漬法によって行い，浸漬濃度は湿重量で 20 μ g/mL，浸漬時間は 30 分とした。

人為感染

FKC 接種から 2 週間後に MCA70 で 25 $^{\circ}$ C，約 24 時間培養した R2 を，濾過海水で 4.6 $\times 10^7$ CFU/mL に懸濁し，供試魚を 20 分間浸漬した。人為感染の翌日から 10 日後まで約 12 時間ごとに死亡魚を取り上げ，有効率を算出した。また死亡魚については体表患部の顕微鏡観察後，体表患部，肝臓および腎臓から MCA70 上に *T. maritimum* の分離を試みた。

結果

人為感染後の最終生残率および有効率を Table 2-3-2 に示した。FKC 接種区の最終生残率は 0~90%，有効率は -3.4~89.7% となり，供試株間で有効性に大きなばらつきが見られた。有意水準 5% で χ^2 検定を行ったところ，7 区 (R2, SM2202s, OM2203, SM2325, SM3322c, OM3510, SUT3523, MC9210) の生残率は対照区に対して有意に高かった。特に SM2202s, SM3322c, OM3510 の 3 区では 60% 以上の有効率が得られ，R2 で免疫した区を上回った。体表患部を検鏡した結果，すべての死亡魚で *T. maritimum* 様の滑走

Table 2-3-2. Protection against R2 challenge by 14 types of FKCs in red sea bream.

Strain	No. of challenged fish	χ^2 test	Survival rate (%)	RPS (%)
R2	30	$P < 0.05$	56.7	55.2
SM2202s	30	$P < 0.05$	72.4	71.5
OM2203	28	$P < 0.05$	46.4	44.6
SM2325	30	$P < 0.05$	43.3	41.4
SM3322c	29	$P < 0.05$	75.9	75.0
OM3510	30	$P < 0.05$	90.0	89.7
GF0609	30		36.7	34.5
SUT3523	30	$P < 0.05$	43.3	41.4
MC9210	29		20.0	17.2
MC9226	30		23.3	20.7
MC9227	30		0	-3.4
MG9112	30		3.3	0
MK9035	30		3.3	0
SM2202n	29		13.8	10.8
Control	30		3.3	-

運動をする長桿菌が多数観察された。攻撃後 24 時間以内に死亡した供試魚の体表患部からは *T. maritimum* が分離されたが、36 時間以後に死亡した供試魚からは *T. maritimum* は分離されず、*Vibrio* 属細菌が分離された。肝臓および腎臓からはすべての死亡魚で *T. maritimum* は分離されなかった。なお、実験期間中の平均水温は 19.6°C であった。

考察

本節では野外分離株 13 株および基準株 R2 で作製した FKC をマダイに投与し、R2 の人為感染に対する有効性について検討した。その結果生存率が対照区に対して有意に高かったのは 14 の FKC 接種区中 7 区のみであった。現在、*T. maritimum* には 3 種類の血清型が報告されている (Avendaño-Herrera et al. 2004, Avendaño-Herrera et al. 2005)。血清型との関連性は不明であるが、本実験での有効性のばらつきは免疫原性の差異によるものである可能性が考えられる。SM2202s, SM3322c, OM3510 の 3 区では、人為感染に用いた株 (R2) で免疫した区よりも明らかに高い有効率が得られた。これら 3 株は R2 よりも多量の防御抗原を持っている可能性が考えられる。

以上のことからワクチン実用化のためには、各漁場における原因菌株のタイプについて調査を行い、場合によっては R2 以外の株のワクチンを作製する必要があると思われる。

第3部 野外分離株の比較

第2部でマダイにおいてR2由来の浸漬ワクチンが有効であることが明らかとなったが、弱毒株 GF0609 から調製したワクチンのR2攻撃に対する防御効果は低かった。さらに野外分離株13株でワクチンを調製して比較したところ、株によってR2攻撃に対する防御効果に大きなばらつきが見られた。そこで第3部では、野外分離株の毒性を人為感染によって評価し、ワクチンとしての有効性と比較すると共に、それぞれの株の分類学的検討を行った。

3-1 人為感染による毒性比較

野外分離株を供試菌としてマダイに対する人為感染を行い、死亡率により株間の毒性比較を行った。

材料および方法

供試魚

近畿大学水産研究所白浜実験場で2003年に生産された平均全長15.3cm、平均体重57.0gのマダイを200尾使用した。

供試菌株

2-3で用いた14株を含む20株を用いた (Table 3-1-1)。

試験区設定

200L容ポリカーボネイト水槽20基に供試魚を10尾ずつ収容し、供試菌20株にそれぞれ1基ずつ割当てた。

人為感染

MCA70で25℃、約24時間培養し、PBSで 4.5×10^8 CFU/mLに調製した菌懸濁液をBCG接種用管針で供試魚体表に接種した。人為感染の翌日から7日後まで約24時間ごとに死亡魚を取り上げ、体表患部を検鏡した。実験期間中の平均水温は15.5℃であった。

Table 3-1-1. Strains of gliding bacteria used for infection.

	Strain	Date	Fish host	Location
1	R2	Jul. 30, 1977	Red sea bream	Hiroshima
2	SM2202s	Feb. 2, 2002	Red sea bream	Shirahama
3	OM2203	Mar. 23, 2002	Red sea bream	Oshima
4	SM2325	Mar. 25, 2002	Red sea bream	Shirahama
5	SM3322v	Mar. 22, 2003	Red sea bream	Shirahama
6	SM3322c	Mar. 22, 2003	Red sea bream	Shirahama
7	SM3404	Apr. 4, 2003	Red sea bream	Shirahama
8	SM3509	May 9, 2003	Red sea bream	Shirahama
9	OM3510	May 10, 2003	Red sea bream	Oshima
10	SUT3523	May 23, 2003	Tiger puffer	Susami
11	GF0609	Jun. 9, 2003	Japanese flounder	Shirahama
12	MC9210	Mar. 25, 1992	Red sea bream	Shirahama
13	MC9226	Jun. 1, 1992	Red sea bream	Shirahama
14	MC9227	Jun. 1, 1992	Red sea bream	Shirahama
15	MG9111	Apr. 19, 1991	Red sea bream	Shirahama
16	MG9112	Apr. 19, 1992	Red sea bream	Shirahama
17	MK9004	Mar. 16, 1990	Red sea bream	Shirahama
18	MK9035	Jun. 6, 1990	Red sea bream	Shirahama
19	MS0427		Red sea bream	Shirahama
20	SM2202n	Feb. 2, 2002	Red sea bream	Shirahama

結果および考察

人為感染の結果を Table 3-1-2 に示した。死亡魚の体表患部を検鏡したところ、すべての死亡魚で滑走細菌が確認された。

マダイ由来株 18 株中 9 株で 70%以上の高い死亡率が得られたが、他の 9 株では死亡が認められなかった。滑走細菌症の症状を示すマダイ罹病魚から分離されたにも関わらずマダイに対して病原性を示さなかった株については、強毒株の感染病巣に 2 次的に感染していた、特定の条件下でのみ病原性を発揮する、あるいは保存中に病原性が低下しやすいなどの理由が考えられるが更に検討する必要がある。またトラフグ由来株 (SUT3523) 攻撃区は 80%の死亡率を示したが、ヒラメ由来株 (GF0609) 攻撃区は 20%にとどまった。GF0609 は第 2 部でヒラメに対しては強い毒性を示すことが確認されているので、その他の株についても魚種によって感受性が異なることが考えられる。

2-3 においてワクチンの有効率が 20.7%以下であった株は、本節の攻撃試験においてすべて死亡率 0%であった。このことからマダイに対する弱毒株と強毒株では、病原因子および免疫原性が異なると考えられた。そこでこれらの菌株に対して、以下で詳細な分類学的検討を行った。

Table 3-1-2. Result of experimental infection of gliding bacteria.

	Strain	Dead (fish)	Mortality (%)
1	R2	7	70
2	SM2202s	10	100
3	OM2203	9	90
4	SM2325	9	90
5	SM3322v	9	90
6	SM3322c	10	100
7	SM3404	8	80
8	SM3509	9	90
9	OM3510	9	90
10	SUT3523	8	80
11	GF0609	2	20
12	MC9210	0	0
13	MC9226	0	0
14	MC9227	0	0
15	MG9111	0	0
16	MG9112	0	0
17	MK9004	0	0
18	MK9035	0	0
19	MS0427	0	0
20	SM2202n	0	0

3-2 性状試験による表現形質の比較

野外分離株中に *T. maritimum* 基準株とは病原性および免疫原性の異なる株が認められたため、本節ではそれら 20 株の性状を詳細に比較した。

材料および方法

供試菌株

3-1 と同じ滑走細菌 20 株を用いた。

生理学的性状

改変サイトファーガ培地 (以下 MCA) を基礎培地として海水要求性 (25, 30, 50, 75, 100%) および塩分要求性 (0%, 3%) を、また 100%海水改変サイトファーガ培地を基礎培地として発育温度 (5, 15, 25, 30, 37°C) および発育 pH (4~10) を比較した。

各種培地上での発育

トリプトソーヤ (TSY), BHI, BCP-D, CTA, マッコンキー, 普通寒天およびそれらに 3%NaCl を添加した培地上での発育を比較した。

炭素源利用能

95 種の炭素源利用能によって細菌を同定するマイクロログシステム (バイオログ社) を利用して、各株の単一炭素源利用能を比較した。MCA70 で前培養した供試菌株を 100%人工海水で調整した inoculating fluid (0.02% Gellan Gum, 0.03% Pluronic F-68) に懸濁し、95 種の炭素源が固着された 96 穴 GN2 マイクロプレート (バイオログ社製) に接種し、24 時間培養後、目視によって陰性対照のウェルに比較して強く発色しているウェルの炭素源を検索した。供試した炭素源は Table 3-2-2 に示した 44 種類に、 α -Cyclodextrin, Glycogen, N-Acetyl-D-Glucosamine, L-Arabinose, D-Cellobiose, D-Fructose, L-Fucose, D-Galactose, Gentiobiose, α -D-Glucose, m-Inositol, α -D-Lactose, Lactulose, Maltose, D-Mannose, D-Melibiose, B-Methyl-D-Glucoside, D- Psicose, D-Raffinose, L-Rhamnose, D-Sorbitol, Sucrose, D-Trehalose, Turanose, Xylitol, Cis-Aconitic Acid, Citric Acid, D-Galactonic Acid Lactone, D-Galacturonic Acid, D-Gluconic Acid, D-Glucosaminic Acid, D-Glucuronic Acid, p-Hydroxy Phenylacetic Acid, Itaconic Acid, Malonic Acid, Quinic Acid, D-Saccharic Acid, Succinic Acid, Bromosuccinic Acid, Succinamic Acid,

Glucuronamide, D-Alanine, D-Serine, D,L-Carnitine, γ -Amino Butyric Acid, Inosine, Phenethyl-amine, Putrescine, D,L- α -Glycerol Phosphate, α -D-Glucose-1-Phosphate, D-Glucose-6-Phosphate の 51 種類を合計した計 95 種類である。

結果

生理学的性状および各種培地上での発育

Table 3-2-1 に結果を示した。25%海水 MCA, 3%NaCl 添加 MCA, 5°C, 37°C, 3%NaCl 添加普通寒天において、マダイ由来強毒株, トラフグ由来株, ヒラメ由来株の 11 株（以下強毒株群）とマダイ由来弱毒株 9 株の間（以下弱毒株群）に発育の差が認められた。

炭素源利用能

Table 3-2-2 に結果を示した。表に示さなかった 51 種の炭素源については、供試した 20 株すべてが利用できなかった。強毒株群の内すべての菌株が利用できた炭素源は 18 種、弱毒株群の内すべての菌株が利用できた炭素源も 18 種であった。このうち Acetic Acid, Formic Acid, α -Keto Butyric Acid, D,L-Lactic Acid, Propionic Acid, L-Alanyl-glycine, L-Asparatic Acid, L-Glutamic Acid, Glycyl-L-Asparatic Acid, Glycyl-L-Glutamic Acid, L-Ornithine, L-Threonine の 12 種は両群で共通に利用可能であった。強毒株群のみ利用可能であったのは、D-Arabitol, α -Hydroxybutyric Acid, α -Keto Glutaric Acid, L-Proline, L-Serine, 2-Aminoethanol の 6 種、弱毒株群のみ利用可能であったのは、Tween 80, α -Keto Valeric Acid, Succinic Acid, L-Asparagine, Hydroxy-L-Proline, L-Leucine の 6 種であった。

考察

強毒株群と弱毒株群で多くの性状に差が認められた。生理学的性状では弱毒株群は強毒株群に比較して発育可能温度域が広がった。また、弱毒株群は NaCl のみを添加した MCA で発育可能であり、海水要求性も低かったことから、Na 以外のイオンに対する要求が低いと考えられる。また炭素源の利用能の比較では、強毒株群、弱毒株群ともに 18 種類を利用することができたが、両群共通で利用可能な炭素源は 12 種類であった。マダイに対して強い毒性を示したマダイ由来 9 株とトラフグ由来 1 株は、マダイ由来弱毒株群 9 株とは多くの表現形質で異なっていた。ヒラメ由来の 1 株はマダイに対しては低い毒性しか示

さなかったが、表現形質では強毒株と多くの性状で一致していた。したがってヒラメ由来株を強毒株群として扱った。

Table 3-2-1. Physiological characteristics of 20 *Tenacibaculum* strains.

	Red sea bream (High virulent)								Tiger puffer	Japanese flounder	Red sea bream (Low virulent)									
	R2	SM2202 ^s	OM2203	SM2325	SM3322 ^v	SM3322 ^c	SM3404	SM3509	OM3510	SUT3523	GF0609	MC9210	MC9226	MC9227	MG9111	MG9112	MK9004	MK9035	MS0427	SM2202 ⁿ
Growth in																				
Seawater(%)																				
25												+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+			+	+				+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl (%)																				
0																				
3																				
pH																				
4																				
5																				
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10																				
Temperature																				
5																				
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37																				
Growth on																				
Nutrient Agar																				
3%NaCl Nutrient Agar																				
BCP-D Agar																				
3%NaCl BCP-D Agar																				
CTA Agar																				
3%NaCl CTA Agar																				
TSA																				
3%NaCl TSA																				
BHI Agar																				
3%NaCl BHI Agar																				
MacConkey Agar																				
3%NaCl MacConkey Agar																				

Table 3-2-2. The ability of 20 *Tenacibaculum* strains to use carbon source.

	Red sea bream (High virulent)								Tiger puffer Japanese flounder		Red sea bream (Low virulent)									
	R2	SM2202s	OM2203	SM2325	SM3322v	SM3322c	SM3404	SM3509	OM3510	SUT3523	GF0609	MC9210	MC9226	MC9227	MG9111	MG9112	MK9004	MK9035	MS0427	SM2202n
Dextrin												+								
Tween 40	+	+		+	+	+	+	+			+									
Tween 80													+	+	+	+	+	+	+	+
A-Acetyl-D-Galactosamine																				
Adonitol			+								+	+								
D-Arabitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						+			
i-Erythritol																				
D-Mannitol																+				
Pyruvic Acid Methyl Ester	+			+									+	+	+	+				+
Succinic Acid Mono-Methyl-Ester													+		+	+	+	+		
Acetic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Formic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α -Hydroxybutyric Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+									
β -Hydroxybutyric Acid													+		+					+
γ -Hydroxybutyric Acid		+									+	+	+	+	+	+	+			+
α -Keto Butyric Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α -Keto Glutaric Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α -Keto Valeric Acid												+	+	+	+	+	+	+	+	+
D,L-Lactic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propionic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Succinic Acid												+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Alaninamide			+																	
L-Alanine												+								
L-Alanyl-glycine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Asparagine	+		+									+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Asparatic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Glutamic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycyl-L-Asparatic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycyl-L-Glutamic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Histidine			+			+					+	+								
Hydroxy-L-Proline												+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Leucine												+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Ornithine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Phenylalanine													+	+						
L-Proline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Pyroglutamic Acid												+		+						
L-Serine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Threonine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urocanic Acid												+	+	+						
Uridine												+	+			+				
Thymidine			+									+								
2-Aminoethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+							+		
2,3-Butanediol												+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol													+		+					

3-3 SDS-PAGE 法による全菌体タンパク質の比較

本節では SDS-PAGE 法による全菌体タンパク質の比較を行った。

材料および方法

供試菌株

3-1 と同じ滑走細菌 20 株を用いた。

SDS-PAGE 法

常法に従い 12%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE 法によって、全菌体タンパク質をゲル上に分離した。電気泳動後、CBBR-250 を含んだ染色液で染色し、発現したバンドの位置によって供試菌株を比較した。

結果および考察

SDS-PAGE の結果を Fig. 3-3-1 に示した。強毒株群が *T. maritimum* R2 とほぼ同一のバンドパターンを示した。3-2 の表現形質の結果とあわせて、強毒株群 11 株は *T. maritimum* と同一の分類群であることが示された。しかし弱毒株群のバンドパターンは強毒株群とは異なっており、弱毒株群が *T. maritimum* と別種である可能性が示唆された。また弱毒株群 9 株はほぼ同一のタンパク質組成、表現形質を示しており、単一の分類群であることが示された。

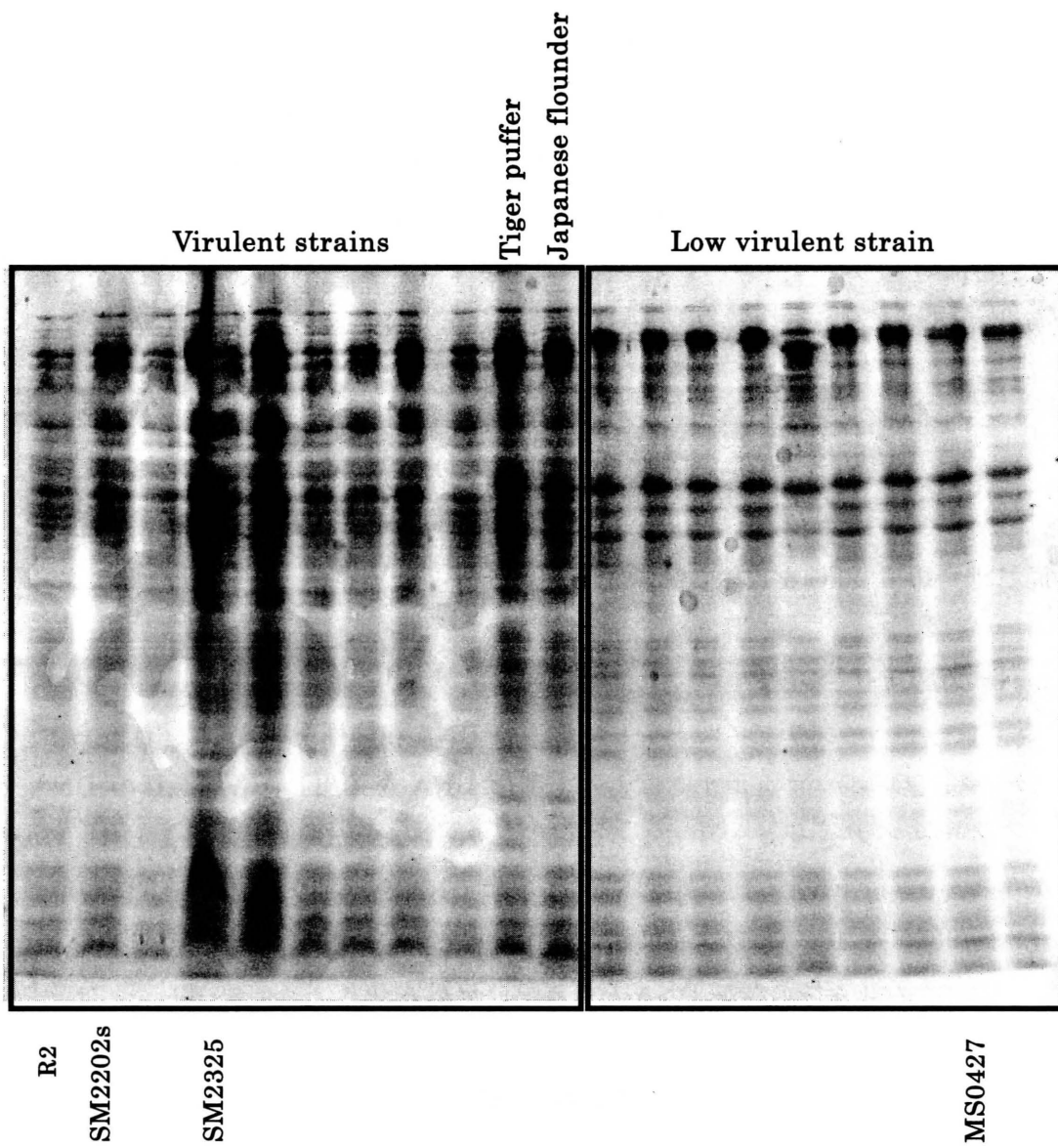


Fig 3-3-1. Whole cell protein profiles of 20 *Tenacibaculum* strains

3-4 DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる DNA 相同性の比較

3-3 では、マダイ由来弱毒株の全菌体タンパク質組成が *T. maritimum* とは大きく異なっていることが明らかとなり、別種であることが強く示唆された。細菌分類学では 70%以上の DNA 相同性を示す株を同種とする種の定義が広く認められていることから (Stackebrandt and Goebel 1994), 本節では種の異同を明らかにするために DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる株間の DNA 相同性を測定した。

材料および方法

供試菌株

3-1 と同じ滑走細菌 20 株を用いた。

DNA-DNA ハイブリダイゼーション

マイクロプレートハイブリダイゼーションにより DNA 相同性を測定した。江崎ら⁵⁸⁾の方法に従い、フェノールクロホルムによって菌体 DNA を抽出し、各標識株の DNA と 37°C でハイブリダイズさせた。すなわち供試菌 20 株および陰性対照として *Vibrio anguillarum* VA-04 (以下 VA-04) の計 21 株の 1 本鎖 DNA をマイクロプレートに固定し、*T. maritimum* 基準株 R2, ヒラメ由来株 GF0609, マダイ由来弱毒株 MK9035 (以下 MK9035), VA-04 の計 4 株の標識 DNA とそれぞれ反応させた。

結果および考察

各標識 DNA に対する DNA 相同性を Fig. 3-4-1~3-4-4 に示した。R2 および GF0609 を標識株とした場合、強毒株はすべて相同性 70%以上であったが、弱毒株との相同性は 21.7~54.2%であった。また、MK9035 を標識株とした場合、強毒株では相同性 23.3~47.3%であったが、弱毒株では 72.2~94.7%であった。また以上 3 株の標識株に対して *Vibrio anguillarum* VA-04 はいずれも 31.1%以下と相同性は低かった。また VA-04 を標識株とした場合、供試菌 20 株はすべて相同性 49%以下であった。

以上の結果から、基準株 R2 を含むマダイ由来強毒株群、トラフグ由来強毒株 SUT3523 およびヒラメ由来弱毒株 GF0609 は *T. maritimum* に属することが確認された。一方、マダイ由来弱毒株群はすべて同一種であったが、*T. maritimum* とは別種であることが明らかになった。また *Vibrio anguillarum* に対していずれの菌株も相同性が低かったことから、

ハイブリダイゼーションの条件に問題はなかったと考えられる。

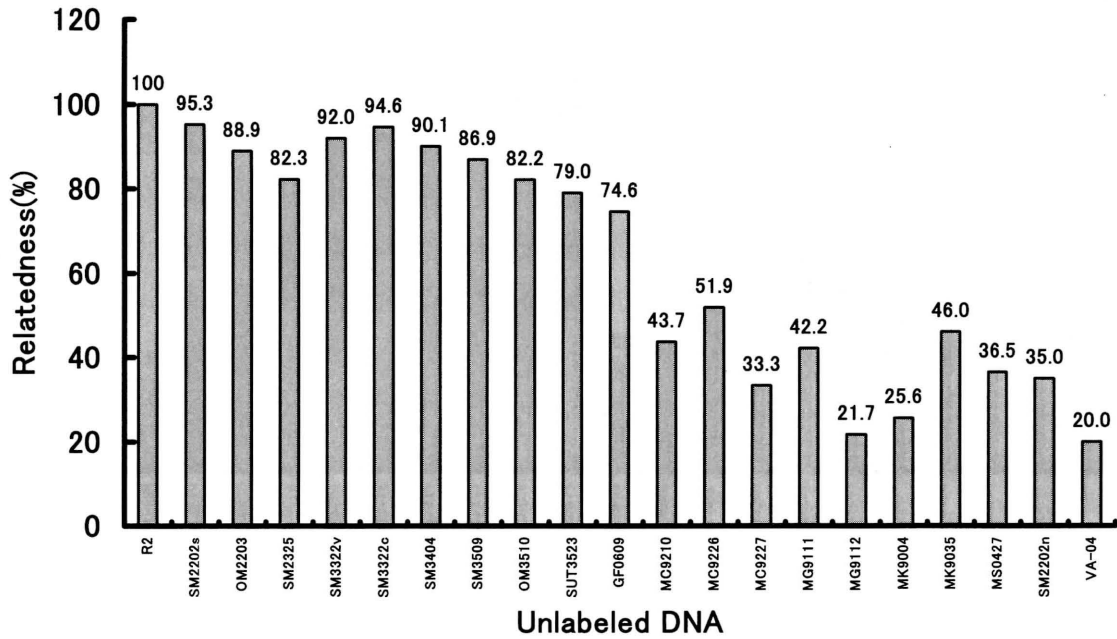


Fig. 3-4-1. DNA relatedness with strain R2.

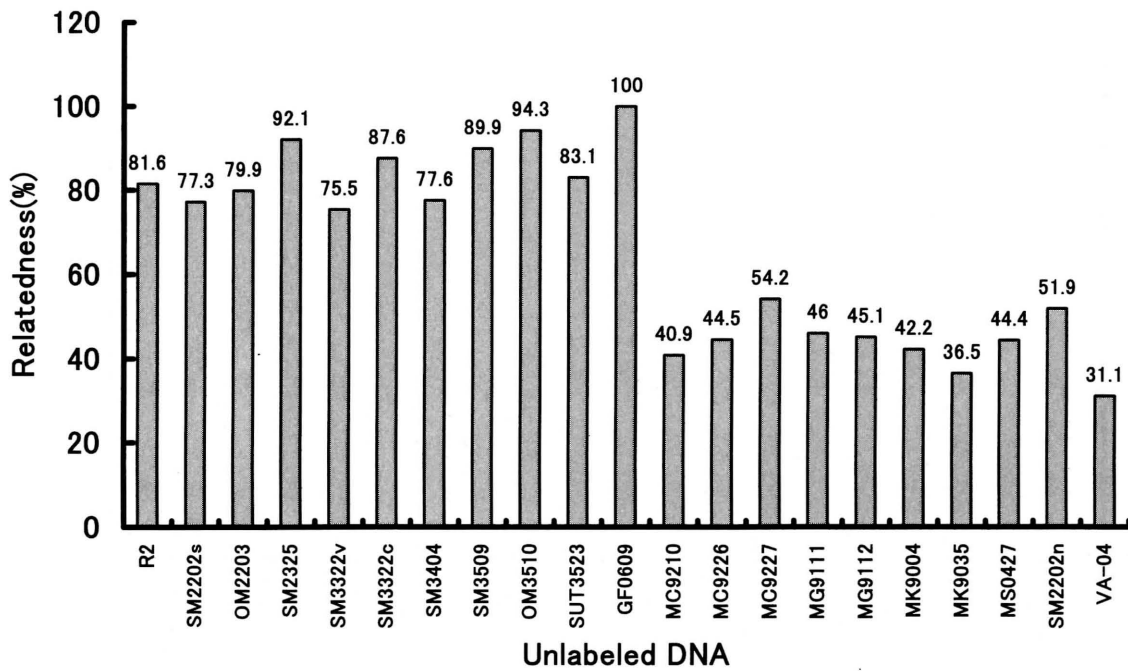


Fig. 3-4-2. DNA relatedness with strain GF0609.

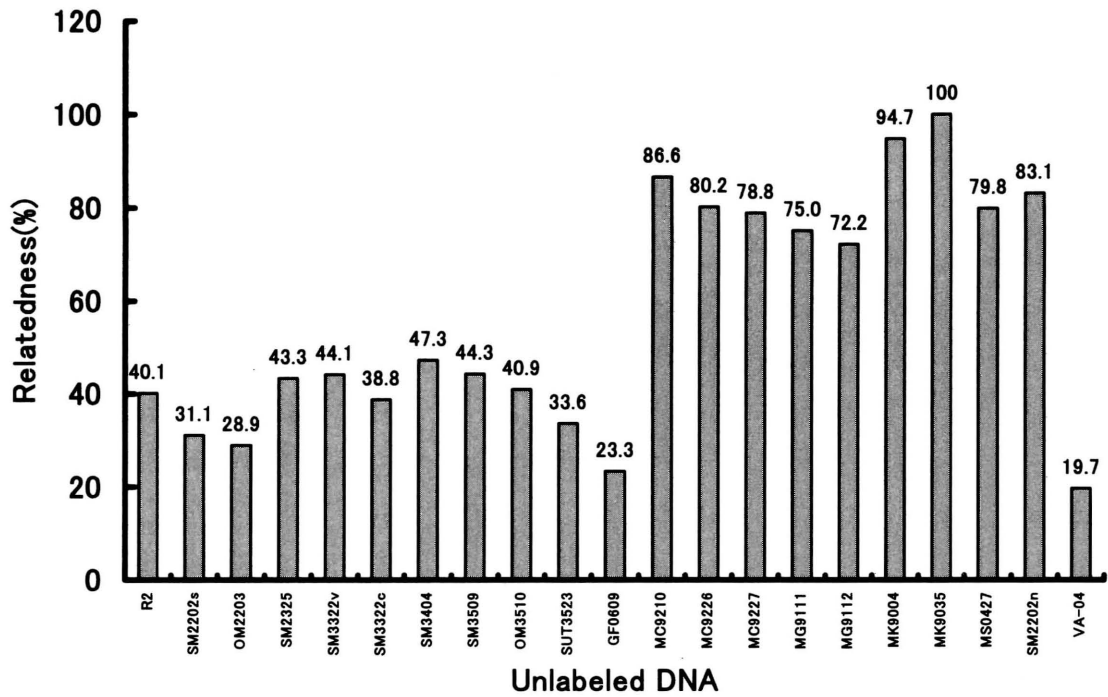


Fig. 3-4-3. DNA relatedness with strain MK9035.

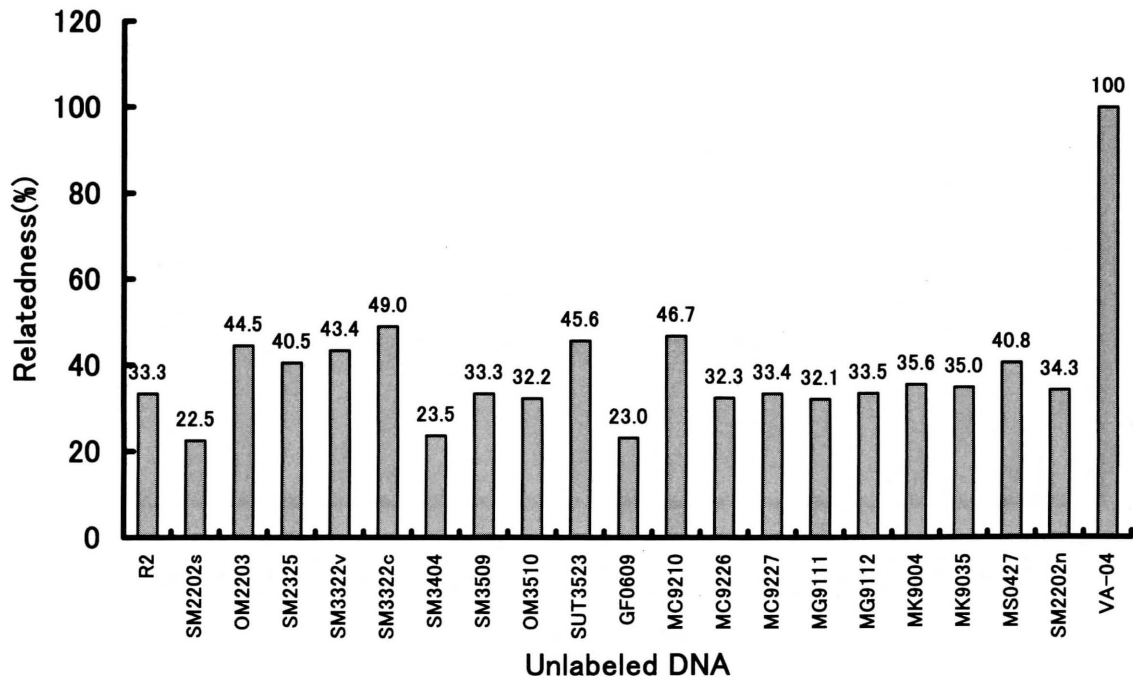


Fig. 3-4-4. DNA relatedness with strain *Vibrio anguillarum* VA-04.

3-5 16S rDNA 塩基配列の比較

DNA相同性の比較によって *T. maritimum* として扱ってきた菌株群に2つの異なる種が含まれることが明らかになったが、マダイ由来弱毒株の種としての位置づけは不明である。そこで本節では強毒株、および弱毒株から1株ずつ代表株を選出し、16S rDNAの塩基配列を解読した。

材料および方法

供試菌株

5-1 で用いた 20 株の内、強毒株群から SM2202s, 弱毒株群から MK9035 をそれぞれ代表株として選出し、供試菌株とした。

16S rDNA 塩基配列の解読

供試菌株の 16S rDNA を常法に従い PCR によって増幅した。PCR に用いたプライマーは以下の通りである。

27f-A(*E.coli* No.8~27) : AGAGTTTGATCATGGCTCAG

1492r-T(*E.coli* No.1513~1492): TACGGTTACCTTGTTACGACTT

16S rDNA 増幅後、CEQ8000 (Beckman Coulter)を用いて塩基配列を解読した。

データベースとの比較

解読した塩基配列を DDBJ(DNA Data Bank of Japan)のデータベースと比較し、類似配列を持つ菌種を選出した。

結果および考察

SM2202s で 444bp, MK9035 で 387bp の塩基配列が解読できた。SM2202s の塩基配列は、

5' -CGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGTAACATTGTAGCTTGCTACAGATGACGACCGGCGCACGGGTGCGTAA
CGCGTAT-AGAATCTGCCTTCTACAGAGGGATAGCCTTTAGAAATGAAGATTAATACCTCATAATACTTTGGAGTGGCAT
CGTTTTAAAGTTAAAGATTTATCGGTAGAAGATGACTATGCGTCCTATTAGCTAGATGGTAAGGTAACGGCTTACCATGG

CAACGATAGGTAGGGGTCTGAGAGGGAGATCCCCCAGACTGGTACTGAGACACGGACCAGA-CTCCTACGGGAGGCAGC
 AGTGAGGAATATTGGGCAATGGAGGCAACTCTGACCCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACTGCCCTATGGGTTGTAACT
 GCTTTTATACAGGAAGAAACGTACCTACGAGTAGGTATTTGACGGTACT-3'

であった。

また MK9035 の塩基配列は

5'-AACACATGCAAGTCGAGGGGTTAACAGGGAAAAGCTTGCTTTTTTGGCTGACGACCGGCGAACGGGTGCGTAACGCGT
 AT-AGAATCTGCCTTGTACAGGAGGATAGCCTTTAGAAATGAAGATTAATACTCCATAATGTTGAGAGATGGCATCATCT
 TTTAATTAAGATTTATCGGTACAAGATGACTATGCGTCCTATTAGCTAGATGGTAAGGTAACGGCTTACCATGGCAACG
 CATAGGTAGGGGTCTGAGAGGATTATCCCCCAGACTGGT-ACTGAGACACGGACCAGA-CTCCTACGGGAGGCAGCAGT
 GAGGAATATTGGTCAATGGAGGCAACTCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACTGCCCTATGGGTTGTA-3'

であった。

解読できた配列と、データベース上の *Tenacibaculum* 属の既知の全種の配列データを用いて系統樹を作製した結果、SM2202s は *T. maritimum* に極めて高い相同性が確認された (Fig. 3-5-1)。しかし MK9035 は *Tenacibaculum* 属細菌と近縁であったものの、同種と考えられる既知の菌種は認められなかった。したがって SM2202s は *T. maritimum* であることが再確認されたが、MK9035 は *Tenacibaculum* 属の新種であると考えられる。既知の *Tenacibaculum* 属細菌全種の基準株を収集し、MK9035 を含むマダイ由来弱毒株群と詳細に比較することで、種レベルでの分類学的位置を明らかにする必要がある。

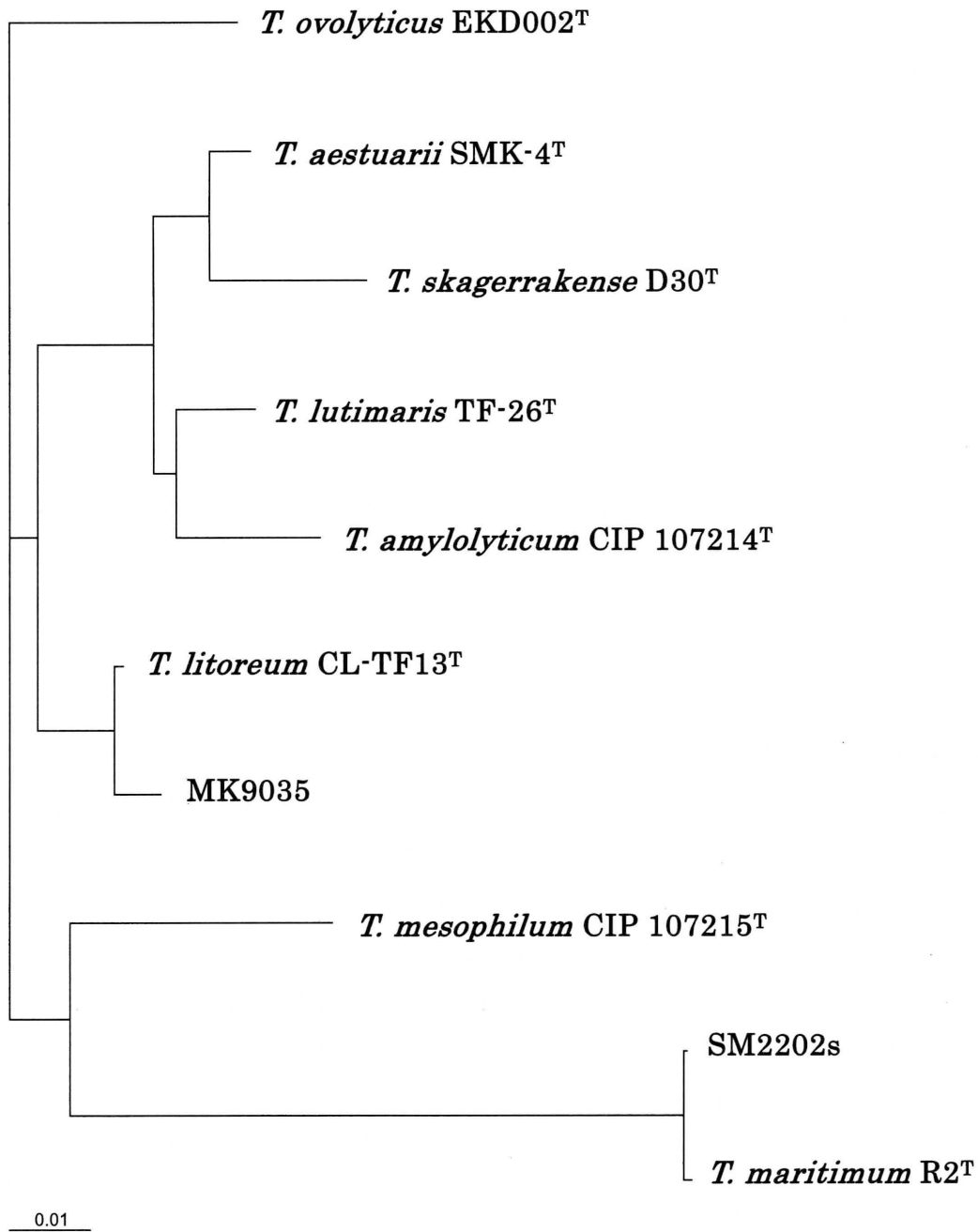


Fig. 3-5-1. Evolutionary relationships in *Tenacibaculum* based on 16S rDNA sequence.

総括

薬事法の改正によって海産魚の滑走細菌症に有効な薬浴剤は使用が制限されている。また安全性を求める消費者の声の高まりもあり、これまでの抗菌剤を中心とした治療から予防への転換が養殖業に求められている。そのような中、薬剤の残留、耐性菌の問題のない水産用ワクチンは近年重要性を増しつつあり、少しずつではあるがその種類を増やしてきている。そこで本研究では海産魚の滑走細菌症の防除を目的として、原因菌 *T. maritimum* からワクチンを作製し、国内では最も被害を受けているマダイおよびヒラメでその効果を検討した。

まずワクチン研究の前段階として効率的で高い再現性のある人為感染法が必要であったため、BCG 接種用管針を用いたスタンプ法と名付けた攻撃法を検討した。その結果、この方法は水温や魚体サイズの影響を受けずに確実かつ高い再現性を持って感染を成立させられることから、滑走細菌症の人為感染法として非常に有効であることが示された。今後滑走細菌症のワクチンの実用化を進めるにあたって、本感染法は重要な手法の1つになると考えられる。

次に *T. maritimum* の基準株 R2 で作製したホルマリン不活化ワクチン FK-C-R2 を用いてマダイの滑走細菌症の防除を試みた。浸漬法で行った一連の実験では、FK-C-R2 接種 1 週間後からその有効性が認められた。また 1 週間後よりも 2 週間後の方が、1 回接種よりも 2 回接種の方が滑走細菌症の防除に有効であった。以上のことから、滑走細菌症の浸漬ワクチンが実用化することができれば、沖出し 1 週間前に 2 回以上免疫することで防除が可能であると期待される。しかしながらヒラメを供試魚とした実験では、人為感染に用いた株がワクチンに用いた R2 と異なっていたためか、十分な効果が得られなかった。その結果を受けて行った FK-C-GF を用いた実験でもヒラメの滑走細菌症を防除することはできなかった。その原因としてはヒラメ固有の免疫反応やワクチン投与方法などが考えられるが、マダイとヒラメでは滑走細菌株に対する感受性が異なっていたことから、両魚種に対する滑走細菌の病原因子が異なっている可能性もある。作製法や投与方法の改善によって有効なワクチンの開発を進める必要がある。

野外分離株についてマダイを用いて人為感染による毒性を比較したところ、ヒラメ由来株だけでなく、マダイ由来株の中にも病原性の弱い株が認められた。分類学的に検討した結果、マダイ由来の弱毒株は *T. maritimum* とは別種であることが確認され、*Tenacibaculum* 属の新種であると推察された。弱毒株群は簡易同定では *T. maritimum* と混同される恐れがあり、効果的な滑走細菌症対策を進める上で障害となりうる。今後マダイ由来弱毒株についてはより詳細な分類学的検討を行うと共に、養殖に与える影響を疫学

的に検討する必要がある。

以上述べたように滑走細菌症の防除を目的として研究を進めてきた。ワクチン実用化のためには野外試験を繰り返し、効果が認められなければならないが、近畿大学水産研究所白浜実験場沖で行った野外試験では、試験期間中の滑走細菌症の病勢が弱かったため、有効性を確認できなかった。また実用化のためにはワクチン有効性の持続期間がある程度求められる。マダイにおいては沖出し後から水温の上昇する初夏までの1～3ヶ月程度持続するのが望ましい。この間の水温と持続期間の関係は詳細に検討する必要がある。また養殖場によって、株の相違が考えられることから、十分に調査を行い、ワクチンとして有効性の高い株でワクチンを作製する必要がある。

上記の様な課題は残されているものの、マダイに対しては浸漬ワクチン実用化の目途がある程度立ったと思われる。既に本ワクチンについては特許を出願し、製薬会社と共同で実用化に向けての研究を開始している。数年の内には製品化してマダイの滑走細菌症防除に役立てられると期待している。

Summary

The aim of this study is to control gliding bacterial disease of marine fish. For this purpose, the following experiments were performed. In the first part of this article, "stamp injection" using an injector designed for human BCG vaccination was examined to establish highly-reproducible and efficient challenge method with the pathogen that was necessary to evaluate effect of vaccination. In the next part, formalin-killed cells (FKCs) were developed from the pathogen *T. maritimum*, and their efficacies as vaccines were examined in red sea bream *Pagrus major* and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. In the last part, the field isolates of *Tenacibaculum* from diseased fish were studied comparatively by experimental infection and taxonomic characterization.

Part 1. Development of artificial infection method with an injector designed for human BCG vaccination

To establish highly-reproducible and efficient challenge infection with *T. maritimum*, stamp injection method was evaluated in red sea bream (55.2g in mean body weight). Stamp injection was performed using an injector, consisting of a hollow plastic cylinder with nine needles, designed for human BCG vaccination. The body surface of the experimental fish was pressed with the cylinder of which the tip of the needles had been soaked in the cell suspension of R2, the type strain of *T. maritimum*, for a few seconds. Stamp injection with three bacterial concentrations and immersion challenge (5.3×10^8 CFU/mL, 20 min) were compared by cumulative mortality during 7 days after challenge. Control fish were stamp injected with PBS. As a result, the mortality of fish which received stamp injection with 4.0×10^9 CFU/mL, 2.0×10^{10} CFU/mL and 1.5×10^{11} CFU/mL were 40, 100 and 100%, respectively. But no fish was killed by immersion challenge and stamp injection with PBS. Ulcerative lesion was observed on the stamped sites of all the dead fish, and *T. maritimum* was recovered from the affected areas of fish died on day 1 post infection. These results indicate that stamp injection method can be utilized for artificial infection of *T. maritimum*.

Part 2. Examinations of immersion-vaccination

2-1 Efficacies of FKCR2

Experiment 1. Evaluation of the efficacy of FKC-R2 in red sea bream

The efficacy of immersion-vaccination of the formalin killed cells prepared from R2 (FKC-R2) against gliding bacterial disease in red sea bream (1.6g) was examined. FKC was prepared from bacterial cells grown on modified Cytophaga agar medium containing 70% sea water for 24h at 25°C by inactivating with 1.5% (v/v) formalin-PBS for 24h at 4°C. The experimental design was consisted of two groups. Each group had 60 fish, which were kept in 500-L tanks. One group was vaccinated with FKC-R2, while the other group received no treatment. Vaccination was performed by immersion in FKC-R2 suspensions in seawater (20 µg wet wt./mL) for 30 min. Immersion challenge (20 min) with R2 was performed one week after vaccination. Thirty fish of each tank were challenged with 1.6×10^7 CFU/ml and the others were done with 2.2×10^7 CFU/ml. Relative percentage survival (RPS) was calculated from cumulative mortality during 7 days after challenge. The survival rates of both vaccinated groups were significantly higher than that of the control ($P < 0.05$). The RPS of the groups challenged with 1.6×10^7 CFU/ml and 2.2×10^7 CFU/ml were 64.3 and 83.3%, respectively.

Experiment 2. Time necessary for development of effective protective immune response after vaccination in red sea bream

A total of 200 fish (14.6g) were divided into 8 tanks, and allocated to 4 groups. Each group had 50 fish, which were kept in 200-L tanks. Three groups were challenged with R2 (1.1×10^8 CFU/mL, 20 min) 3 days, 1 week, and 2 weeks after vaccination, and the other group was non-vaccinated control. Vaccination was performed by immersion in FKC-R2 suspensions in seawater (20 µg wet wt./mL) for 30 min. RPS of the groups challenged after 3 days, 1 week and 2 weeks were 4.0, 56.0 and 76.0% respectively. Survival rates of 1 week and 2 weeks were significant higher than that of control ($P < 0.05$).

Experiment 3. Effects of booster vaccination in red sea bream

A twice-vaccinated group was compared with once-vaccinated groups and control. A total of 120 fish (2.5g) were divided into 4 tanks, and allocated to 4 groups. Three groups were challenged 1 week, 2 weeks, and both 1 and 2 weeks (twice) before

challenge with R2 (2.4×10^7 CFU/mL, 20 min), and the other group was non-vaccinated control. As a result, the survival rates of all the vaccinated groups were significantly higher than that of the control ($P < 0.05$), and twice-vaccinated group showed the highest survival rate.

Experiment 4. Determination of the efficacy in Japanese flounder

The efficacy of immersion-vaccination against gliding bacterial disease in Japanese flounder (2.3g) was examined in the same way as experiment 2. Immersion challenge was performed with the strain GF0609 isolated from Japanese flounder (4.5×10^7 CFU/mL). However, RPS of the group challenged after 2 weeks was only 16.7%, and the others were 0%.

Part 3. Comparative study on the field isolates of the pathogens

R2 and other 19 strains of gliding bacteria isolated from diseased fish were compared for their pathogenicity by stamp challenge method in red sea bream (57.0g). Ten strains among them were highly pathogenic, though the others showed 20% or less mortalities. These two groups can be distinguished by sea water requirement, sodium chloride requirement, growth temperature range and ability to use carbon sources. The whole cell protein profile is different between low virulent strains and virulent strains. In addition, DNA-DNA hybridization with R2 showed more than 70% homology in virulent strains but less than 52% in low virulent strains. DNA homology of the low virulent strains to the strain MK9035, which was one of low virulent strain obtained from red sea bream, were more than 70%. And 16S rDNA sequence of MK9035 was similar to *Tenacibaculum* species but was different from all validated species. From the above results, low virulent strain group is presumed a new species.

謝辞

本研究を行うにあたり，近畿大学大学院教授・水産研究所所長 熊井英水先生，および同研究所副所長・教授 村田 修先生には終始ご指導とご鞭撻を賜り，また本論文のご高閲を頂きました。さらに本論文を取りまとめるにあたって，近畿大学大学院教授 太田博巳先生には終始貴重なご助言とご指導を賜りました。厚く御礼申し上げます。

また実験を行うにあたって近畿大学水産研究所白浜実験場 石丸克也助手には懇篤なるご指導を頂きました。また同水産研究所の教職員，ならびに近畿大学農学部水産学科水産増殖学研究室の学生各位にご協力いただきました。ここに心から感謝の意を表します。

文献

- Alsina, M. and A. R. Blanch (1993) First isolation of *Flexibacter maritimus* from cultivated turbot (*Scophthalmus maximus*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 13, 157-160.
- Avendaño-Herrera, R., B. Magariños, S. Lopez-Romalde, J. L. Romalde and A. E. Toranzo (2004) Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains from marine fishes. *Dis. Aquat. Org.*, 58, 1-8.
- Avendaño-Herrera, R., B. Magariños, M. A. Moriñigo, J. L. Romalde and A. E. Toranzo (2005) A novel O-serotype in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 25, 70-74.
- Baxa, D. V., K. Kawai and R. Kusuda (1986) Characteristics of gliding bacteria isolated from diseased cultured flounder, *Paralichthys olivaceous*. *Fish Pathol.*, 21, 251-258.
- Baxa, D. V., K. Kawai and R. Kusuda (1987a) Experimental infection of *Flexibacter maritimus* in black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*) fry. *Fish Pathol.*, 22, 105-109.
- Baxa, D. V., K. Kawai and R. Kusuda (1987b) Molecular taxonomic classification of gliding bacteria isolated from diseased cultured flounder. *Fish Patol.*, 22, 11-14.
- Baxa, D. V., K. Kawai and R. Kusuda (1988) Chemotherapy of *Flexibacter maritimus* infection. *Rep. Usa Mar. Biol. Inst., Kochi Univ.*, 10, 9-14.
- Bernerdet, J. F. (1998) *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flexibacter* and *Chryseobacterium* infections in cultured marine fish. *Fish Pathol.*, 33, 229-238.
- Bernardet, J. F., A. C. Campbell and J. A. Buswell (1990) *Flexibacter maritimus* is the agent of 'black patch necrosis' in Dover sole in Scotland. *Dis. Aqua. Org.*, 8, 233-237.
- Bernardet, J. F., B. Kerouault and C. Michel (1994) Comparative study on *Flexibacter maritimus* strains isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in France. *Fish Pathol.*, 29, 105-111.
- Chen, M. F., D. Henry-Ford and J. M. Groff (1995) Isolation and characterization of *Flexibacter maritimus* from marine fishes of California. *J. Aquat. Anim. Health*, 7, 318-326.
- Donald, F. A. (1981) Potency testing of fish vaccines. *Dve. Biol. Stand.*, 49, 447-454.
- Elliott, D. G. and E. B. Shotts (1980) Aetiology of an ulcerative disease in goldfish, *Carassius auratus* (L.): experimental induction of the disease. *J. Fish Dis.*, 3, 145-151.
- 江崎孝行, Shatha Adnan, 三宅正美 (1990) 菌種の分類学的類似度を測定する定量的マイクロプレートハイブリダイゼーション法. *日本細菌学雑誌*, 45, 851-857.

- Fujihara, M. P. and R. E. Nakatani (1971) Antibody production and immune response of rainbow trout and coho salmon to *Chondrococcus columnaris*. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 28, 1253-1258.
- Handler, J. M. Soltani and S. Percival (1997) The pathology of *Flexibacter maritimus* in aquaculture species in Tasmania, Australia. *J. Fish Dis.*, 20, 159-168.
- 畑井喜司雄 (2006a) ビブリオ病. 新魚病図鑑(畑井喜司雄, 小川和夫編), 緑書房, 東京, pp. 175.
- 畑井喜司雄 (2006b) 滑走細菌症. 新魚病図鑑(畑井喜司雄, 小川和夫編), 緑書房, 東京, p. 176.
- Hikida, M., H. Wakabayashi, S. Egus and K. Masumura (1979) *Flexibacter* sp., a gliding bacterium pathogenic to some marine fishes in Japan. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 45, 421-428.
- Holt, R. A., A. Amandi, J. S. Rohovec and J. L. Fryer (1993) Bacterial coldwater disease. In "Bacterial disease of fish" (ed. by Inglis, V., R. J. Roberts and N. R. Bromage). Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 3-23.
- 飯田貴次, 若林久嗣, 江草周三 (1981) ハマチの連鎖球菌症ワクチンについて. 魚病研究, 16, 201-206.
- 金井欣也 (1996) 海産魚の細菌病. 魚病学概論(室賀清邦, 江草周三編), 恒星社厚生閣, 東京, 58-63.
- 河原栄二郎, 中塚義春, 楠田理一 (2001) 海産魚の滑走細菌症原因菌 *Flexibacter maritimus* に対するヒラメの免疫応答. 平成 13 年度日本魚病学会春期大会講演要旨集, p. 46.
- 木村 創, 楠田理一 (1983) 養殖マダイの滑走細菌症における菌交代現象. 日水誌, 49, 1553-1559.
- Kumai, H. (2002) Status and prospect of Japanese marine fish culture. *Suisanzoshoku*, 50, 514-516.
- 楠田理一, 杉山昭博, 川合研児, 稲田善和, 木田 実 (1981) アユに対する *Streptococcus* sp. ならびに *Vibrio anguillarum* の病原性について. 日水誌, 47, 993-997.
- Lobb, C. J. and L. W. Clem (1981) The metabolic relationships of the immunoglobulins in fish serum, and bile. *J. Immunol.*, 127, 1525-1529.
- Lorenzen, E. (1994) Studies on *Flexibacter psychrophilus* in relation to rainbow trout fry syndrome (RTFS). Ph.D. Thesis, National Veterinary Laboratory, Arhus, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.

- MacVicar, A. H. and P. G. White (1979) Fin and skin necrosis of cultivated Dover sole, *Solea solea* (L.). *J. Fish Dis.*, **2**, 557-562.
- 間野伸宏, 乾 享哉, 荒井大介, 廣瀬一美, 出口吉昭 (1996) *Cytophaga columnaris* に対するウナギ皮膚の免疫応答. 魚病研究, **31**, 65-70.
- 増村和彦, 若林久嗣 (1977) 人工生産マダイ, クロダイ稚魚の滑走細菌感染症. 魚病研究, **12**, 171-177.
- 宮下 盛, 瀬岡 学 (2005) マダイ・マチダイ. 水産増養殖システム 1 海水魚(熊井英水編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 45-81.
- 宮崎照雄, 窪田三郎, 江草周三 (1975) ハマチの滑走細菌性潰瘍病の病理組織学的研究. 魚病研究, **10**, 69-71.
- 水野芳嗣 (2006) 滑走細菌症. 新魚病図鑑(畑井喜司雄, 小川和夫編), 緑書房, 東京, p. 203.
- Moore, A. A., M. E. Eimers and M. A. Cardell (1990) Attempts to control *Flexibacter columnaris* epizootics in pond-reared channel catfish by vaccination. *J. Aquat. Org.*, **2**, 109-111.
- 村田 修 (2000) マダイ. 最新海産魚の養殖(熊井英水編), 湊文社, 東京, pp. 89-108.
- 村田 修 (2000) ヒラメ. 最新海産魚の養殖(熊井英水編), 湊文社, 東京, pp. 109-130.
- 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.
- 中西照幸 (1998) 魚類ワクチン開発の現状と展望. 水産増殖, **46**, 461-468.
- 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課 (2006) 水産用医薬品の使用について 第20報. 農林水産省, pp. 1-24.
- Obach, A. and F. Baudin-Laurencin (1991) Vaccination of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* against the visceral form of coldwater disease. *Dis. Aquat. Org.*, **12**, 13-15.
- Pazos, F., Y. Santos, A. R. Macias, S. Nunez and A. E. Toranzo (1996) Evaluation of media for the successful culture of *Flexibacter maritimus*. *J. Fish Dis.*, **19**, 193-197.
- Péin, J. F. and E. Emery (1993) Marine *Cytophaga*-like bacteria (CLB) isolated from diseased reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) from French mediterranean coast. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **13**, 165-167.
- Rahman, M. H., M. Ototake, Y. Iida, Y. Yokomizo and T. Nakanishi (2000) Efficacy of oil adjuvanted vaccine for coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, **35**, 199-203.
- Rombout, J. W. H. M., L. J. Blok, C. H. J. Lamers and E. Egberts (1986) Immunization

of carp (*Cyprinus carpio*) with a *Vibrio anguillarum* bacterin: indications for a common mucosal immune system. *Dev. Comp. Immunol.*, 10, 341-352.

佐古 浩 (1992) ブリの β 溶血性連鎖球菌症予防ワクチンの有効性. 水産増殖, 40, 393-397.

佐古 浩 (1992) ブリの実験的 β 溶血性連鎖球菌症回復魚における免疫の獲得. 水産増殖, 40, 389-392.

Salati, F., C. Cubadda, I. Viale and R. Kusuda (2005) Immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax* to *Tenacibaculum maritimum* antigens. *Fish. Sci.*, 71, 563-567.

Soltani, M. and C. M. Burke (1994) Responses of fish-pathogenic *Cytophaga Flexbacter*-like bacteria (CFLB) to environmental conditions. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 14, 185-187.

Stackebrandt, E. and B. M. Goebel (1994) Taxonomic notes: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 846-849.

Suzuki, M., Y. Nakagawa, S. Harayama and S. Yamamoto (2001) Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 1639-1652

Tabone, J. (1996) Isolation and characterization of the fish pathogen *Flexibacter maritimus* from cultured sea bass *Dicentrarchus labrax* L. B. Sc. Thesis, University of Malta, Malta.

Toranzo, A. E., B. Magariños and J. L. Romalde (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246, 37-61.

若林久嗣 (2004) 海産魚の滑走細菌症. 魚介類の感染症・寄生虫病(若林久嗣, 室賀清邦編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 214-220.

Wakabayashi, H., M. Hikida and K. Masumura (1984) *Flexibacter* infection in cultured marine fish in Japan. *Helgoländer Meeresunters*, 37, 587-593.

Wakabayashi, H., M. Hikida and K. Masumura (1986) *Flexibacter maritimus* sp. nov., a pathogens of marine fishes. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 36, 396-398.

矢野友紀 (1995) ワクチンと免疫賦活物質. 生物生産と生体防御 (緒方靖哉編), コロナ社, 東京, pp. 242-248.

要旨

本研究では、海産魚の滑走細菌症に対するホルマリン不活化ワクチンの実用化を目的として、以下の検討を行った。第1部では研究を進める上で不可欠な、再現性が高く効率的な滑走細菌症の人為感染法を確立するために、BCG接種用管針を用いた体表への接種法を検討した。第2部では原因菌 *Tenacibaculum maritimum* から作製したホルマリン不活化ワクチンの有効性をマダイおよびヒラメを用いて検討した。また第3部では、野外分離株について人為感染による毒性の比較を行うと共に、分類学的検討を行った。

第1部 BCG接種用管針を用いた人為感染法の確立

効率的で再現性が高い滑走細菌症の人為感染法を確立するために、マダイ（平均体重55.2g）を供試魚としてBCG接種用管針を用いたスタンプ接種法を検討した。スタンプ接種は、BCG接種用管針の9本の針の先端を細菌懸濁液に数秒間浸した後、供試魚の左体側面を1回押圧することによって行った。攻撃菌株には *T. maritimum* の基準株 R2（以下R2）を用い、3段階のスタンプ接種区（ 4.0×10^9 CFU/mL, 2.0×10^{10} CFU/mL, 1.5×10^{11} CFU/mL）、浸漬区（ 5.3×10^8 CFU/mL, 20分）、対照区（PBSスタンプ）で攻撃1週間後の死亡率を比較した。その結果、 4.0×10^9 CFU/mLの濃度でスタンプ接種した区で40%、より高濃度でスタンプ接種した2区で100%の死亡率が認められたが、浸漬区および対照区は0%であった。死亡魚の接種部位に潰瘍が認められ、人為感染1日後の死亡魚患部から *T. maritimum* が分離されたことから、スタンプ接種により人為感染が成立することが確認された。同時に行った浸漬法では死亡が見られなかったことから、スタンプ法は滑走細菌症の人為感染法として優れていることが明らかとなった。

第2部 浸漬ワクチンの有効性の検討

2-1 FKC-R2の有効性の検討

実験1. マダイにおける有効性の検討 *T. maritimum* の基準株 R2 で作製した不活化ワクチンの有効性を検討した。500L容パンライト水槽2基にマダイ（平均体重1.6g）を60尾ずつ収容し、ワクチン接種区および対照区に設定した。MCA70で25°C、48時間培養後、1.5%ホルマリンで4°C、48時間不活化したR2菌体(FKC-R2)をワクチン接種区には浸漬投与し（20 μ g/mL, 30分）。ワクチンの有効性はFKC-R2接種1週間目に両試験区30尾ずつに2段階の生菌濃度（ 1.6×10^7 CFU/ml, 2.2×10^7 CFU/ml）でR2による浸漬攻撃を行い、死亡率から有効率を算出し判定した。有効率は以下の式によって算出した。

$$\text{有効率(\%)} = \left(1 - \frac{\text{ワクチン投与区の死亡率}}{\text{ワクチン非投与区の死亡率}}\right) \times 100$$

その結果、64.3% (1.6×10^7 CFU/ml) および 83.3% (2.2×10^7 CFU/ml) の有効率が得られた。また両攻撃濃度における FKCR-2 接種区の生残率はともに対照区に対して有意に高かった。

実験 2. マダイにおいて防御効果が得られるまでの日数の検討 ワクチン接種後の経過日数の相違による防御効果の比較をマダイ（平均体重 14.6g）で行った。200L 容パンライト水槽 4 基に供試魚を 50 尾ずつ収容し、FKCR-2 接種 3 日後攻撃区、1 週間後攻撃区、2 週間後攻撃区、および対照区にそれぞれ設定した。FKCR-2 の接種および有効性の判定は実験 1 と同様に行った。また人為感染を全区同時に実施できるように、攻撃試験日から逆算してワクチン接種日を決定した。人為感染の浸漬条件は 1.1×10^8 CFU/mL、20 分とした。その結果、1 週間後攻撃区および 2 週間後攻撃区の生残率は対照区に対して有意に高く、有効率は 3 日後攻撃区 4.0%、1 週間後攻撃区 56.0%、2 週間後攻撃区 76.0%であった。

実験 3. マダイにおける追加免疫効果の検討 追加免疫効果の検討をマダイ（平均体重 2.5g）を用いて行った。500L 容パンライト水槽 4 基に供試魚を 30 尾ずつ収容し、ワクチン接種は攻撃 1 週間前のみ、2 週間前のみ、1 および 2 週間前の 2 回、および対照区の 4 設定とした。FKCR-2 の接種および有効性の判定は実験 1 と同様に行った。FKCR-2 の接種日は人為感染を全区同時に実施できるように、攻撃試験日から逆算して決定した。人為感染の浸漬条件は 2.4×10^7 CFU/mL、20 分とした。その結果、1 週間前接種区、2 週間前接種区および 2 回接種区の生残率は対照区に対して有意に高かった。有効率は 1 週間前接種区 59.3%、2 週間前接種区 59.3%、2 回接種区 74.1%であった。

実験 4. ヒラメにおける有効性の検討 ヒラメ（2.3g）を供試魚として実験 2 と同じ試験区設定でワクチンの有効性を検討した。供試尾数は 30 尾ずつ、人為感染はヒラメ由来株 GF0609 を用いて浸漬 (4.5×10^7 CFU/mL, 20min) によって行った。その結果、有効率は 2 週間後攻撃区 16.7%、1 週間後攻撃区および 3 日後攻撃区 0%と極めて低かった。

2-2 FKC-R2 と FKC-GF の比較 GF0609 で不活化ワクチンを作製し (以下 FKC-GF), FKC-R2 とともにその有効性をマダイ (平均体重 30.7g) およびヒラメ (平均体重 63.6g) で検討した。ワクチン接種 10 日後に R2 および GF0609 の生菌を用いて攻撃を行い, ワクチンの効果を判定した。R2 で攻撃したマダイでは, 両 FKC 免疫区で対照区より高い生残率が得られたが, ヒラメではワクチンの効果が認められなかった。また, マダイは GF0609 による攻撃に対して, ヒラメは R2 による攻撃に対してそれぞれ感受性が低かった。

2-3 野外分離株で作製した FKC の比較 野外分離株 13 株および R2 から作製した不活化ワクチンの有効性をマダイ (平均体重 3.1g) を供試魚として比較した。不活化ワクチンの作製および接種は実験 1 と同様に行った。ワクチン接種 2 週間後に浸漬攻撃 (4.0×10^7 CFU/mL) を行った結果, ワクチンの有効率は-3.4%から 89.7%と大きくばらつき, 株間の免疫原性に差異があることが推察された。

第 3 部 野外分離株の比較 人為感染, 性状試験, SDS-PAGE, DNA-DNA ハイブリダイゼーションおよび 16S rDNA 塩基配列によって株間の差異を比較した。マダイ (平均体重 57.0g) への人為感染試験の結果, 分離株には強毒株と弱毒株の 2 群が認められた。性状試験では強毒株群と弱毒株群で海水要求性, 塩分要求性, 発育温度域, 炭素源利用能に差異が認められた。また SDS-PAGE によって全菌体タンパク質のバンドパターンを比較したところ, 強毒株と弱毒株で異なっていた。DNA-DNA ハイブリダイゼーションによって種の異同を調べた結果, 強毒株群はすべて R2 と 70%以上の DNA 相同性が認められたが, 弱毒株群は 52%以下であり, 両群は別種であることが明らかとなった。そこで弱毒株の代表株の 16S r-DNA の配列を解読し, 類似配列を持つ菌種を検索したが, 既知の *Tenacibaculum* 属菌種は弱毒株と近縁ではあるものの同種とは認められず, 弱毒株群は新種である可能性が強く示唆された。