

### 3 ブリ連鎖球菌症経口ワクチンの安全性および有効性試験

小川 健 ・ 小松 功\*

#### 目 的

ブリ養殖において最も大きな魚病被害をもたらす *Enterococcus seriolicida* による  $\alpha$  溶血性連鎖球菌症に対するワクチンの実用化を図るため、不活化ワクチンの経口投与方法によるブリ稚魚における有効性および安全性について野外試験により検討する。

#### 材料および方法

##### 1 供試ワクチン

$\alpha$  溶血性連鎖球菌症原因菌 (*Enterococcus seriolicida* KS-7C) をホルマリンで不活化した培地成分込みのワクチン (共立商事株式会社製 X-8, 試作ロット No. 5)。

##### 2 供 試 魚

1994年6月上旬熊野灘で採捕され、和歌山県西牟婁郡白浜町の海面小割生簀で蓄養餌付けされたモジヤコを当场まで輸送し、海面小割生簀で配合飼料を投与して養成した平均体重約100gのブリ稚魚を用いた。これには養成中にビブリオ病および類結節症が発生したため塩酸オキシテトラサイクリンおよびオ

キソリン酸の投与により治療を行った。しかし  $\alpha$  溶血性連鎖球菌症に対しては未感染の状態であった。

##### 3 ワクチン投与方法

ワクチンを容器内でよく振り混ぜた後、所定の投与量となるよう算出した量のワクチンに必要により水を加えて餌重量の約30%に調整してブリ用固形飼料に十分吸収させ、1日1回給餌の5日間連続経口投与とした。

対照区は30%の水を吸収させた配合飼料を投与し、また陽性対照区として接種区 (以下IP区) を設け、経口投与区の投与終了日にワクチンを0.1ml/尾腹腔内接種する。

##### 4 試 験 区

試験区および内容は表1に示すとおりである。

##### 5 安全性および有効性判定方法

1) 安全性: ワクチン投与後のワクチン区と対照区について、遊泳・摂餌行動、体色および斃死数を観察し、さらに成長についても攻撃試験用に取上げた供試魚の平均体重を測定して比較を行い、安全性を検討する。

表 1 試験区および内容

区	ワクチン投与量 (ml/kg・BW/日)	投与方法	平均体重 (g)	供試尾数
1	10	経口投与、5日間連続	104.3	100
2	7	"	104.4	100
3	5	"	103.9	100
4	3	"	110.2	100
5	0.1ml/尾	腹腔内接種 (IP) 1回	106.9	100
6	対照		106.5	100

\* : 共立商事株式会社中央研究所

2) 有効性: ワクチン投与後2, 4, 6, 8, および10週目に各区から20尾ずつ取り上げて陸上飼育水槽に移し, 当日中に次の方法で攻撃を行い, 14日間飼育して本症による死亡を観察, 生残率を比較検討して有効性を判定する.

### 6 攻撃方法

*Enterococcus seriolicida* KS-7C株のソイビーンカゼインダイジェスト液体培地培養液をストローに封入して-60℃に凍結保存していたものを解凍し, 前日に作成して25℃で保存しておいたソイビーンカゼインダイジェスト液体培地 (pH8.6) 10mlに, 0.2ml接種し, これをさらに同培地で, 10倍段階希釈して25℃で18~20時間培養後,  $10^{-3}$ または $10^{-4}$ 希釈試験管の菌液を原液とし, さらに滅菌PBSで $5 \times 10^{-4}$  (2,000倍) 希釈したものを冷血動物用麻醉薬FA-100で麻酔した各区の供試魚に0.1ml/尾ずつ腹腔内接種する.

### 7 飼育管理

供試魚と各区とも当場の海面試験筏の1.5m角小割網生簀に収容し, 1日1回配合飼料をほぼ飽食量与え, 攻撃試験用の水槽は0.2m<sup>2</sup>の円形水槽で流水式とし, 攻撃を行った後の供試魚に対する給餌方法も小割網生簀と同様とした.

各区の斃死は朝夕に取上げ, 必要なものは腎臓からの菌分離を行い斃死原因を明らかにする.

### 8 試験期間

1994年8月1日から同10月28日.

#### 結果および考察

試験期間中の陸上水槽の飼育水温の変化を図1に示した. 8月1日の試験開始時は28.3℃で, 以後28~29℃台で推移したが, 9月中旬から低下し始め10月28日の試験終了時には23.1℃となった. 海面小割生簀の水温も陸上水槽の水温とほとんど差はなかった.

なお, 9月29日には台風26号が和歌山県に來襲, 串本町に上陸したが, このときの試験筏周辺への漂

流物により4区の小割網が破損し供試魚22尾が逃亡した. このため4区については8週目の攻撃試験は18尾で行ったが, 10週目の試験は実施できなかった.

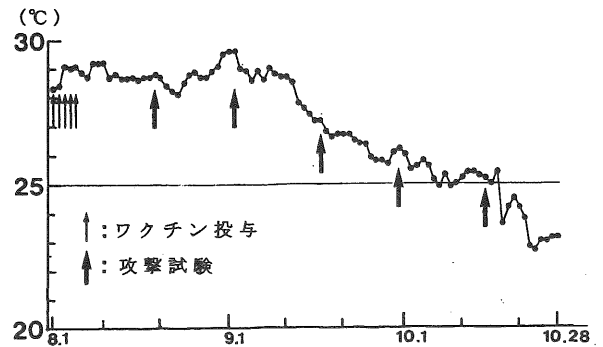


図1 試験期間中の飼育水温と攻撃試験

### 1 供試ワクチンの安全性

ワクチン区は各区共, 投与中および投与終了後において遊泳・摂餌行動の変化ならびに体色異常等は観察されず, ワクチン投与後の海面小割生簀での飼育中の斃死も全く見られなかった. また成長についても表2, 図2に示すとおりで, 全体としては各区

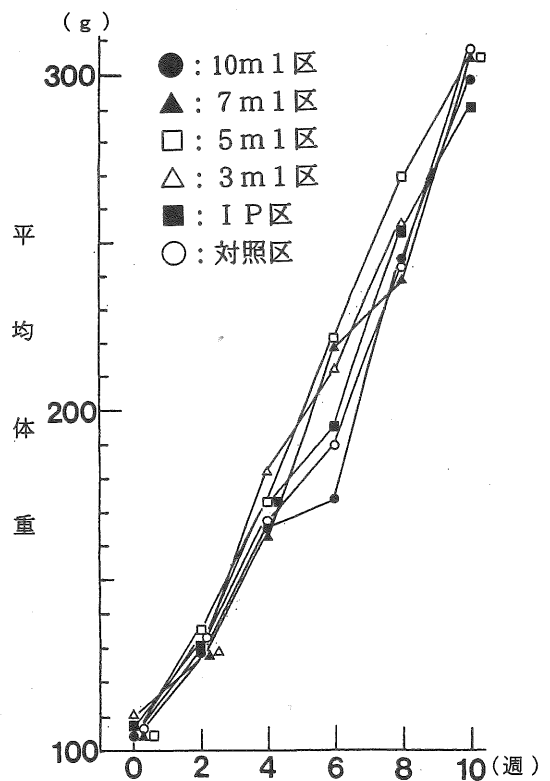


図2 各区の成長

表 2 各区の成長 (平均体重, g)

区	経過週数					
	0	2	4	6	8	10
1	104.3	128.8	165.5	174.2	247.5	299.0
2	104.4	127.8	163.8	218.0	239.6	304.7
3	103.9	136.3	173.3	223.0	269.7	305.3
4	110.2	129.1	181.7	211.9	256.3	—
5	106.9	130.5	173.0	195.1	253.0	291.9
6	106.5	133.6	167.5	189.7	240.3	308.1

共成長には殆ど差はないとみられる。これらのことから、供試ワクチンの本試験における投与範囲内の安全性については問題はないものと思われた。

2 供試ワクチンの有効性

ワクチン投与後2, 4, 6, 8および10週目の攻撃試験の攻撃菌数と水温範囲および平均水温を表3に、攻撃試験後の生存率の変化を図3~7に示した。攻撃菌数には2週目の $5.5 \times 10^3$ CFU/尾から6週目

の $3.3 \times 10^4$ CFU/尾までやや幅があったが、攻撃後の斃死は各試験時とも2日目から観察され3~9日目で終息した。いずれの試験時にもワクチン投与区の生存率は対照区を上回り、とくにIP区は全て100%の生存率を示した。経口投与区では、10ml区が平均して高く10週目でも55%の生存率を示したが、5ml, 3ml区では日数経過とともに生存率も低くなる傾向が窺われた。

表 3 各試験時の攻撃菌数と水温

項目	2週目	4週目	6週目	8週目	10週目
菌数 (CFU/尾)	$5.5 \times 10^3$	$1.3 \times 10^4$	$3.3 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$
水温範囲 (°C)	28.1~29.6	29.6~26.6	27.2~25.7	26.2~24.9	25.4~22.7
平均水温 (°C)	28.8	28.4	26.4	25.4	23.9

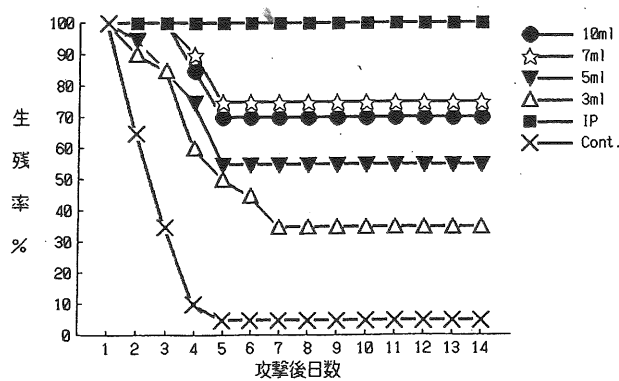


図3 ワクチン投与後2週の攻撃後の生存率

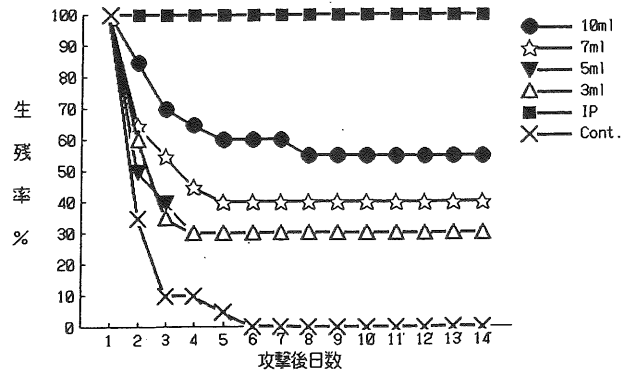


図4 ワクチン投与後4週の攻撃後の生存率

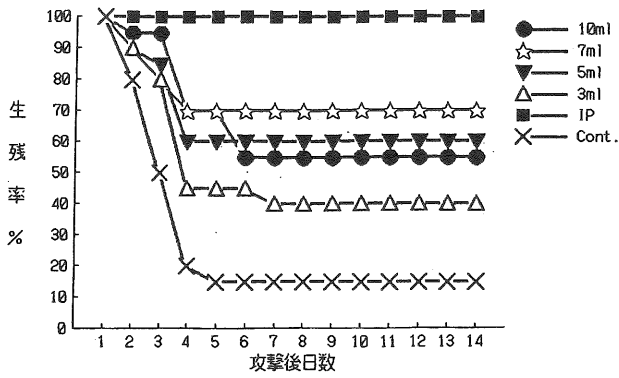


図5 ワクチン投与後6週の攻撃後の生存率

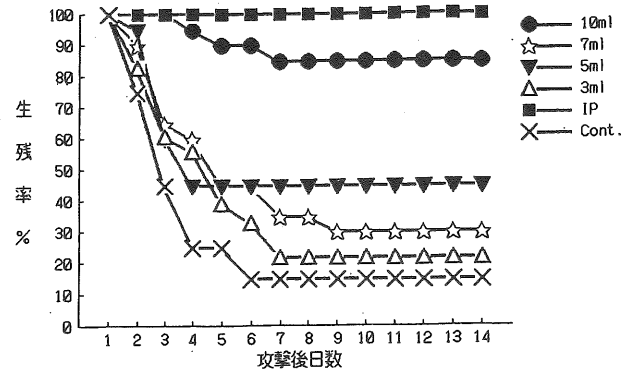


図6 ワクチン投与後8週の攻撃後の生存率

各試験時の最終的な生残率をまとめて表4に示した。また、そのワクチン区の生残率の、対照区のそれとの統計学的有意差について、Fisherの直接確率計算法により判定した結果を併せて表4に示した。

IP区は攻撃による斃死は全くなく、生残率も100%であり、当然のことながら有意差は10週目の攻撃試験でも認められた。このことから、供試ブリ稚魚は本症に対する極めて強い免疫を獲得していたものと考えられ、供試ワクチンは腹腔内接種では非常に高い有効性を示した。

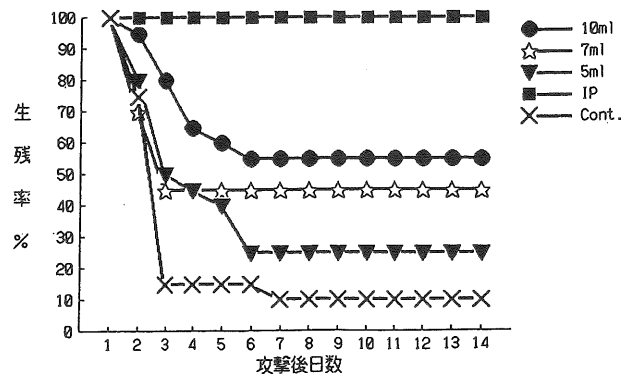


図7 ワクチン投与後10週の攻撃後の生存率

表4 攻撃試験時の各区の生残率(%)と対照区に対する統計学的有意差

ワクチン投与 経過週数	試験区					
	1 (10ml)	2 (7 ml)	3 (5 ml)	4 (3 ml)	5 (IP)	6 (対照)
2	70 : ○	75 : ○	55 : ○	35 : ○	100 : ○	5
4	55 : ○	40 : ○	30 : ○	30 : ○	100 : ○	0
6	55 : ○	70 : ○	60 : ○	40 : ×	100 : ○	15
8	85 : ○	30 : ×	45 : ○	22.2 : ×	100 : ○	15
10	55 : ○	45 : ○	25 : ×	— : —	100 : ○	10

○ : 有意差あり (P ≤ 0.05)

× : 有意差なし (P > 0.05)

一方、経口投与区では、3ml区は4週目までは生残率に有意差があったが、6週目以降は有意差はなく、5ml区は8週目まで有意差が認められた。7ml区は6週目までの生残率に有意差があったものの、8週目にはなくなり、10週目には再び有意差が見ら

れる結果となった。しかし、10ml区では10週目の攻撃試験まで全ての生残率に有意差が認められた。

以上から、本供試ワクチンは経口投与によっても予防効果を有することは明らかで、10ml/kg・BWの5日間連続投与により供試魚に付与された免疫

は、少なくとも10週目までは有効性を継続していると考えられる。7 mlでは6週目以降はやや不安定ではあるが、10週目でも一応有効性はあり、5 ml投与は8週目まで、3 ml投与は4週目まで有効性を持続していると思われた。

ブリの*Enterococcus seriolicida*に対する血中抗体価

と感染防御との関係は明らかではないが、養殖漁場でブリが攻撃を受ける菌数は本試験の攻撃菌数よりも2オーダー以上少ないと推定されることを考えると、養殖現場での供試ワクチンの有効性は3~5 ml/kg・BWの5日間連続投与でもかなりの長期間持続することが推測される。

付表- 1 攻撃試験 ( 2 週目 ) 斃死状況

攻撃菌数 :  $5.5 \times 10^3$  CFU/尾

区	ワカチ 投与 量	月/日	8/19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	9/1	斃死 尾数 合計	生残 尾数	生残 率 (%)	
		攻撃後日数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13				14
		水温(°C)	28.8	28.7	28.4	28.2	28.1	28.5	28.8	28.9	28.7	28.7	28.9	29.1	29.5	29.6	29.6			
1	10ml	9:00*1	-	0**	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	6	14	70.0	
		17:00	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
2	7ml	9:00	-	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	5	15	75.0	
		17:00	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0				
3	5ml	9:00	-	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	9	11	55.0	
		17:00	0	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0				
4	3ml	9:00	-	1	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	13	7	35.0	
		17:00	0	0	1	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0				
5	IP	9:00	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	100.0	
		17:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
6	対照	9:00	-	0	4	3	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	19	1	5.0	
		17:00	0	0	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0				

\* 1 : 取り上げ時刻 \* 2 : 斃死尾数

付表- 2 攻撃試験 ( 4 週目 ) 斃死状況

攻撃菌数 :  $1.3 \times 10^4$  CFU/尾

区	ワカチ 投与 量	月/日	9/2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	斃死 尾数 合計	生残 尾数	生残 率 (%)
		攻撃後日数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
		水温(°C)	29.6	29.0	28.9	28.6	28.9	28.6	29.0	28.7	28.6	28.6	28.5	27.8	27.6	27.4	26.6			
1	10ml	9:00*1	-	0**	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	9	11	55.0
		17:00	0	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
2	7ml	9:00	-	0	5	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	8	40.0
		17:00	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
3	5ml	9:00	-	0	6	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	6	30.0
		17:00	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	3ml	9:00	-	0	6	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	6	30.0
		17:00	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
5	IP	9:00	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	100.0
		17:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
6	対照	9:00	-	0	8	4	0	0	1									20	0	0
		17:00	0	0	5	1	0	1	-											

\* 1 : 取り上げ時刻 \* 2 : 斃死尾数

付表-3 攻撃試験 ( 6 週目 ) 斃死状況

攻撃菌数 :  $3.3 \times 10^4$  CFU/尾

区	ワカシ 投与 量	月/日	9/16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	斃死 尾数 合計	生残 尾数	生残 率 (%)
		攻撃後日数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
1	10 ml	9:00*1	-	0*2	0	0	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	9	11	55.0
		17:00	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
2	7 ml	9:00	-	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	14	70.0
		17:00	0	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
3	5 ml	9:00	-	0	1	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	12	60.0
		17:00	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	3 ml	9:00	-	0	1	1	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	12	8	40.0
		17:00	0	0	1	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
5	I P	9:00	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	100.0
		17:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
6	対照	9:00	-	0	2	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	3	15.0
		17:00	0	0	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

\* 1 : 取り上げ時刻 \* 2 : 斃死尾数

付表-4 攻撃試験 ( 8 週目 ) 斃死状況

攻撃菌数 :  $1.1 \times 10^4$  CFU/尾

区	ワカシ 投与 量	月/日	9/30	10/1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	斃死 尾数 合計	生残 尾数	生残 率 (%)
		攻撃後日数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
1	10 ml	9:00*1	-	0*2	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	17	85.0
		17:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
2	7 ml	9:00	-	0	0	5	1	3	0	2	0	1	0	0	0	0	0	14	6	30.0
		17:00	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
3	5 ml	9:00	-	0	1	7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	9	45.0
		17:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	3 ml	9:00	-	0	1	3	1	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	14	4	22.2
		17:00	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
5	I P	9:00	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	100.0
		17:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
6	対照	9:00	-	0	1	5	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	17	3	15.0
		17:00	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

\* 1 : 取り上げ時刻 \* 2 : 斃死尾数

付表-5 攻撃試験 (10週目) 斃死状況

攻撃菌数:  $1.6 \times 10^4$  CFU/尾

区	ワカシ 投与 量	月/日	10/14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	斃死 尾数 合計	生残 尾数	生残 率 (%)
		攻撃後日数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
		水温(°C)	25.4	25.2	25.0	25.4	23.6	24.2	24.5	24.2	23.8	22.8	22.7	23.0	23.0	23.1	23.1			
1	10ml	9:00*1	-	0**	1	1	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	9	11	55.0
		17:00	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
2	7ml	9:00	-	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	9	45.0
		17:00	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
3	5ml	9:00	-	0	4	5	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	15	5	25.0
		17:00	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	3ml	9:00	-																	
		17:00	-																	
5	IP	9:00	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	19	95.0
		17:00	0	1**3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
6	対照	9:00	-	0	4	10	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	18	2	10.0
		17:00	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

\* 1 : 取り上げ時刻    \* 2 : 斃死尾数    \* 3 : Enterococcus seriolicida (-)    \* 4 : 連鎖球菌症によるもの