

# アユ冷水病菌由来毒素を応用した新規トキソイドワクチンの開発

中山仁志（内水面試験地）

## 1 目的

アユ冷水病は、河川や養殖場において頻繁に発生し、全国的に大きな問題となっている。本県では平成3年にアユ養殖場で初めて冷水病の発生が確認され、ほぼ同じ頃から河川においても発生し、その被害は甚大であった。それにも関わらず、未だ有効なワクチンは開発されていない。本研究は、従来型ホルマリン不活化ワクチンとは異なる剤型のトキソイドワクチンの開発を目的とし研究を行った。

## 2 方法

### 1) 冷水病菌由来コラゲナーゼ発現系の改良

枯草菌発現系における蛋白質発現量を改善するために、コラゲナーゼ発現株<sup>1)</sup> (*B. chosinensis*/pNY326/mFpC)を用いて、培養条件の最適化を図った。培養開始から24時間は37℃で培養した後、15℃まで温度を下げて定常期まで培養を続けた。培養液の濁度(OD<sub>620</sub>)を経時的に測定すると共に、その培養上清を経時的に回収し、SDS-PAGE及びゼラチンザイモグラフィ法<sup>1)</sup>によって、コラゲナーゼ発現量を確認した。

### 2) コラゲナーゼがアユに及ぼす影響の検証

アユ表皮をペプシンで分解し、塩析を繰り返すことで表皮に含まれるコラーゲンを抽出した。当該コラーゲン溶液を1℃/分の割合で昇温しつつ、222nm波長での円偏光二色性値(CD<sub>222</sub>)を測定し、コラーゲンに含まれるαヘリックス構造の崩壊を基に熱変性温度(T<sub>m</sub>値)を算出した。

次に、枯草菌発現系を用いて産生したコラゲナーゼ溶液を50%硫酸分画及びDEAEセファロースを用いた分画に供して精製した。当該精製コラゲナーゼ溶液をアユ表皮由来コラーゲンと混合して、各種温度(15, 25, 35℃)でインキュベートした。その反応物を10%SDS-PAGEに供し、クーマシー染色を行った。

表皮下に浸潤したコラゲナーゼが及ぼす影響を調べるため、細胞外マトリクスを構成するフィブロネクチン(ウシ由来)を精製コラゲナーゼが分解できるか調べた。1 mgのフィブロネクチンを含む溶液に精製コラゲナーゼ溶液を添加し、24℃×16 hインキュベートした。また、比較対象としてウシ皮由来コラーゲンを25℃で分解できるかを調べた。その後、分解物を6% SDS-PAGEに供し、クーマシー染色を行った。

### 3) 冷水病菌由来コラゲナーゼを用いたトキソイドワクチン効果試験

平均体重10~15gの海産種苗150尾に対して2回のワクチン処理(7月15日及び8月5日)を施した。ワクチン処理においては、アユを上記1)と同じ方法で作製したコラゲナーゼを含む溶液を20倍希釈した溶液(トキソイドワクチン液)に30分間、浸漬した後、引き続いて2倍希釈したFKCワクチン液<sup>2)</sup>に5分間浸漬した。2回目のワクチン処理時においては、1回目と同様であるが、FKCワクチン液には消泡剤KM-72(信越化学)を適量添加した。これらの供試魚は対照区の供試魚と共に屋根付きの屋外2.5tコンクリート水槽で飼育を行い、給餌率表に従った給餌を行うと共に、電照による長日処理を施し成熟を抑制した。2回目のワクチン処理から約3週間後(8月28日)に、ワクチン処理を施したアユ(ワクチン区)及びワクチン未処理アユ(対照区)、各30尾の腹腔内に冷水病菌SG-1株の菌液200 μLを注射し攻撃を行った。攻撃強度は1尾あたり1.6×10<sup>7</sup>CFUであった。菌液を注射したアユは防疫棟の屋内FRP水槽(水量約176L)に10尾ずつに分けて収容し、その後の死亡尾数を計数した。

## 3 結果及び考察

### 1) 冷水病菌由来コラゲナーゼ発現系の改良

コラゲナーゼ発現株は37℃で培養を続けるとOD<sub>620</sub>=1.0前後で、増殖が止まった(データ非表示)。これは、冷水病菌由来コラゲナーゼが宿主である枯草菌に対して強い細胞毒性を示すためと考えられる。そこで、培養開始

から24時間後に、培養温度を15°Cに下げること、コラゲナーゼの細胞毒性の緩和を試みた。その結果、枯草菌の増殖速度は低下したものの、約7日以上培養することでコラゲナーゼが分泌されることを確認した(図1)。このときのコラゲナーゼ産生量は培地1L当たり約10 mg以上と推定され、当該コラゲナーゼ溶液から冷水病ワクチンを生産することは十分可能であると考えた。

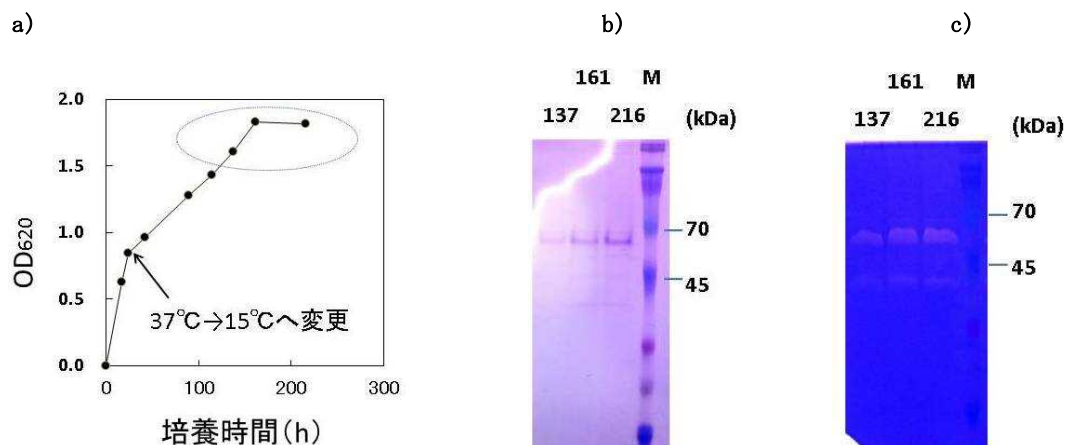


図1 枯草菌を用いたコラゲナーゼ発現条件の検討

- a) コラゲナーゼ発現株の増殖曲線。線で囲った時間(137, 161及び216 h)で培養上清を回収した。  
 b) c) 枯草菌培養上清(137, 161及び216 h培養)をSDS-PAGE(b)及びゼラチンゼイモグラフィー(c)に供した。

## 2) コラゲナーゼがアユに及ぼす影響の検証

アユ表皮由来コラーゲンの  $T_m$  値は約29°Cであった。このことからアユ表皮由来コラーゲンは15及び25°Cでは未変性であるものの、35°Cでは変性しゼラチン化していると考えられる。これらのアユ表皮由来コラーゲン(基質)を、部分精製したコラゲナーゼと共に各温度条件下で反応させたところ、15°C及び25°Cではほとんど分解されず、35°Cにおいては効率的に分解された。また、比較対照として用いたウシ皮由来コラーゲンも25°Cでほとんど分解されなかった(図2)。このことから、枯草菌発現系で産生した冷水病菌由来コラゲナーゼは、変性コラーゲンをより効率的に分解することが明らかになった。この結果から、体表に全く傷がないアユは当該コラゲナーゼの影響を受けにくいと考えられた。

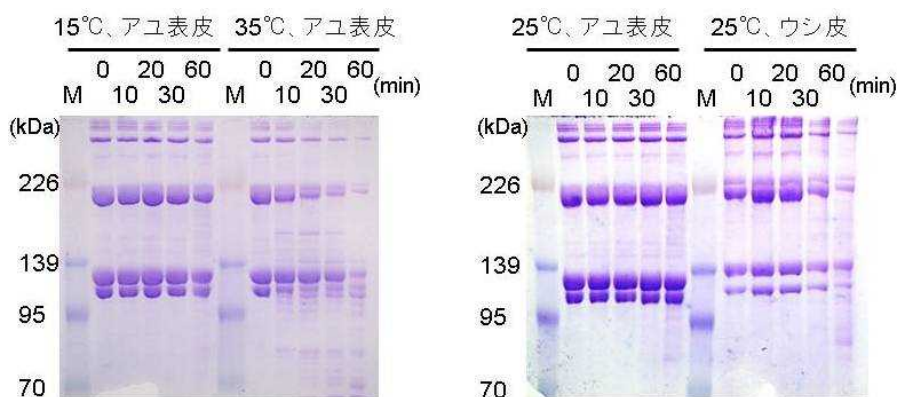


図2 コラーゲン分解実験

冷水病菌由来コラゲナーゼを用い、アユ表皮由来コラーゲンを15°C、25°C又は35°Cで分解した。また、ウシ皮由来コラーゲンをを用いて25°Cで分解した。

一方、当該コラゲナーゼはフィブロネクチンを分解したことから（図3）、少なくとも当該コラゲナーゼは、アユ体内ではフィブロネクチン等の細胞外マトリクスを破壊することで、組織の壊死等に関与すると考えられた。

### 3) 冷水病菌由来コラゲナーゼを用いたトキソイドワクチン効果試験

ワクチン区及び対照区の累積死亡率はそれぞれ24%、48%であり、ワクチン有効率は50%であった（図4）。ワクチンとしての改善の余地はあるものの、浸漬法によるワクチンとしては高い効果が認められた。

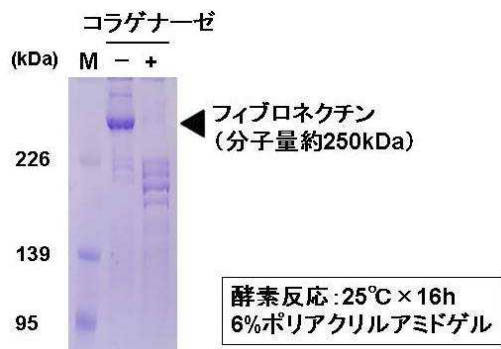


図3 フィブロネクチン分解試験

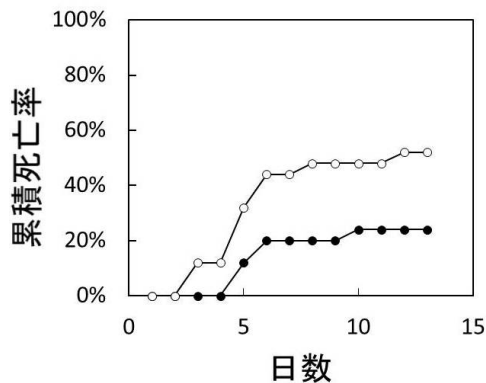


図4 ワクチン効果試験

● : ワクチン区, ○ : 対照区

## 4 文献

- 1) 中山仁志 (2013) アユ冷水病トキソイドワクチンの開発. 平成25年度和歌山県水産試験場事業報告.
- 2) 岡村貴司 (2013) アユ冷水病試作ワクチンの接種法別の抗体価と有効率との関係. 平成25年度滋賀県水産試験場事業報告.