

平成21年5月6日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580204

研究課題名（和文）海産魚のウイルス性出血性敗血症の予防免疫に関する研究

研究課題名（英文）Studies on vaccination against viral hemorrhagic septicemia in marine fishes.

研究代表者 一色 正（ISSHIKI TADASHI）

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：30378319

## 研究成果の概要：

本研究では、魚類の免疫特性を利用したウイルス性出血性敗血症（VHS）の新規予防法を開発した。すなわち、VHS に対するホルマリン不活化ワクチンをヒラメの至適水温 20℃で接種後、同じ水温で約3週間飼育するワクチン投与方法により、ヒラメの感染防御能を確実に誘導することが可能であり、その感染防御能は少なくとも98日間持続することが明らかとなった。本予防法を応用すれば、ヒラメ VHS を効率良く予防できる実用的なワクチンが開発できるであろう。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

## 研究分野：魚病学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：魚病・ウイルス・ワクチン・ウイルス性出血性敗血症・VHS

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルス性出血性敗血症（Viral hemorrhagic septicemia:以下、VHS）は古くから欧州や米国のサケ科魚類に流行し、脅威とされてきたウイルス病である。VHS は本来、サケ科魚類の疾病であると考えられてきたが、1990年代になって世界各地の海産魚類からもその原因ウイルスである VHS ウイルスが分離されるようになり、海洋環境における VHS ウイルスの存在が明らかとなった。わが国においても 1996 年に瀬戸内海の養殖ヒラメに発生した大量死の原因が VHS であることが明らかになり、VHS の発生が初めて確認された。その後、VHS の発生地域・件数が拡大して西

日本各地のヒラメ養殖場に及ぶようになり、低水温期を中心に大きな被害を引き起こしている。さらに、ヒラメ以外にもイカナゴ、マダイ、メバル、タケノコメバルなどの海産魚にも発生するなど、その被害を受ける魚種の範囲も拡大している。また、最近になって VHS は韓国の養殖ヒラメにおいても発生が確認され、アジアにおいて注目される疾病の一つとなっている。海産魚の VHS に対してはワクチンによる予防が有効な対策の一つであり、これまでに DNA ワクチン、リコンビナントワクチンおよびホルマリン不活化ワクチンの注射免疫が試みられ、DNA ワクチンのみが高い有効性が確認されている（卞ら, 2003 ; Byon *et. al.*, 2005, 2006）。しかし

ながら、投与された DNA ワクチン（防御遺伝子）が動物細胞内の染色体に組み込まれたり、複製されたりすると魚類が遺伝子組み換え動物となってしまう危険性を含んでおり、食品を前提に飼育されている魚介類の疾病の予防法として DNA ワクチンを実用化するには食品安全上の問題が残されている。

#### 【引用文献】

ト 珠瑩・高野倫一・大平 剛・廣野育生・青木 宙 (2003)：ヒラメ VHS ウイルスに対する DNA ワクチンの開発. 日本魚病学会大会プログラムおよび講演要旨, 平成 15 年度, p13.

Byon, J. Y., T. Ohira, I. Hirono and T. Aoki (2005)：Use of a cDNA microarray to study immunity against viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol*, 18, 135-147.

Byon, J. Y., T. Ohira, I. Hirono and T. Aoki (2006)：Comparative immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* after vaccination with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) recombinant glycoprotein and DNA vaccine using a microarray analysis. *Vaccine*, 24, 921-930.

## 2. 研究の目的

本研究では海産魚の VHS の予防に有効であり、かつ実用化できるワクチンの開発に繋がる基礎的知見を得ることを目的とした。

(1) 注射免疫と水温調節の併用による予防法：魚類は哺乳類に劣らない免疫機能を備えているが、興味深いことに変温動物である魚類の免疫機構は水温に強く影響されるという特性がある。そこで、この魚類の免疫特性を利用し、注射免疫時とその後の飼育時（免疫能誘導期間）の水温を調節することにより、育成魚の免疫能を誘導させる予防法の有効性を検討した。

(2) 母子免疫による予防法：VHS による被害が発生しているタケノコメバルが卵胎生魚であることに着目し、本種の採卵用親魚を免疫後、産仔された仔魚に免疫能を伝える“母子免疫”を応用した仔稚魚の予防法の有効性を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 注射免疫と水温調節の併用による予防法  
①供試魚：愛媛県栽培漁業センターで種苗生産されたヒラメを香川県水産試験場に搬入し、2 kL 容の FRP 水槽内で飼育しながら実験に供試した。供試魚は実験に使用する前に、無作為に選んだ 10 個体の心臓および脾臓の混合物を用いて RT-PCR を行い、VHS ウイルス

に感染していないことを確認した。なお、試験期間中の水温は 9～28℃であった。

②供試ウイルスおよびホルマリン不活化ワクチンの作製：供試ウイルスには、1998 年に香川県の養殖ヒラメ病魚から分離された VHS ウイルス KRRV9822 株を使用した。ウイルスの培養では 10% となるようにウシ胎児血清を加えた Eagle's minimum essential medium (MEM) 培地（日水）を用いて培養面積 175cm<sup>2</sup> の細胞培養フラスコ (Falcon) に培養した Fad head minnow (FHM) 細胞にウイルス株を 0.001M. O. I. で接種し、20℃で培養した。細胞変性効果（以下、CPE）が細胞単層のほぼ全面に広がり、細胞が崩壊した培養 6 日後に培養液を採取し、遠心分離（2000×g, 15 分, 4℃）したのち、その上清を回収してウイルス浮遊液とし、実験に供するまで -80℃で凍結保存した。なお、得られたウイルス浮遊液のウイルス感染価は 10<sup>9.05</sup>TCID<sub>50</sub>/mL であった。ホルマリン不活化ワクチン原液はこのウイルス浮遊液にホルマリン（和光）を終濃度 0.4% となるように加え、4℃で 1 週間不活化して作製した。

③ワクチンの投与：3 つのワクチン実験を行った。実験 1 では飼育水温 20℃におけるワクチン効果について検討した。実験には、平均体重 10g のヒラメを使用した。まず、供試魚をワクチン接種時の飼育水温に基づいて、12℃群、20℃群および 28℃群に分け、2 kL 容の FRP 水槽内で各水温に馴致させた。次に、各実験群別にそれぞれワクチン区と対照区を設け、26G 注射針付き 1 mL 容シリンジ (TERUMO) を用いてワクチン区の魚にはワクチン原液を 0.1 mL/尾、対照区の魚にはリン酸緩衝生理食塩水（以下、PBS）を 0.1 mL/尾ずつ腹腔内注射した。その後、免疫誘導期間として 12℃群は水温 12±1℃で 21 日間飼育した。20℃群および 28℃群はそれぞれ水温 20±1℃および 28±1℃で 19 日間飼育したのち、2 日間かけて 12℃まで水温を下げた。この飼育期間中、魚には市販のドライペレット（ヒラメ EP フロート、日本配合飼料）を 2 回/日与えた。各実験群とも 21 日間の飼育期間終了後に、ワクチンの有効性判定のための攻撃試験に供試した。

実験 2 では、水温 20℃においてワクチンを 2 回接種した場合の効果について検討した。実験では平均体重 10g のヒラメを使用し、実験 1 の 20℃群と同様にして 1 回目のワクチンを接種後、20±1℃で 21 日間飼育したのち、さらに第 2 回目のワクチンを第 1 回目と同様にして接種した。その後、20±1℃で飼育を続け、2 回目のワクチン接種 19 日後から 2 日間かけて水温を 12℃まで低下させたのち、ワクチンの有効性判定のための攻撃試験に供試した。

実験 3 では、水温 20℃において大型魚にワクチンを 1 回接種した場合の効果およびその持続期間について検討した。実験は平均体重 100g の魚を使用し、実験 1 の 20℃群と同様にして行

った。さらに、ワクチン接種魚は免疫 98 日後まで自然水温 (9~16°C) で飼育し、免疫 77 日後および 98 日後にそれぞれ攻撃試験を行ってワクチンの効果を判定した。

④攻撃試験：実験 1 および 2 では、全ての実験群についてそれぞれのワクチン区および対照区の各 30 尾に VHS ウイルスを  $10^{6.3}$ TCID<sub>50</sub>/尾ずつ筋肉内注射したのち、実験区別に用意した 30L 容のパンライト水槽に收容し、水温  $12 \pm 1$ °C で 21 日間飼育観察し、死亡率を測定した。なお、飼育期間中に餌は与えなかった。実験 3 では、ワクチン区および対照区の各 20 尾に VHS ウイルスを  $10^{7.3}$ TCID<sub>50</sub>/尾ずつ筋肉内注射したのち、実験区別に用意した 100L 容のパンライト水槽に收容し、同様にして行った。なお、28°C 群を除く全てのワクチン区および対照区では、A および B の 2 区を設定して攻撃試験を行った。

⑤ウイルスの再分離と感染価の測定：実験 1 および 2 の攻撃試験における死亡魚および観察期間終了時の生残魚から心臓および脾臓の混合物ならびに脳をそれぞれ 1.5ml 容のマイクロチューブ（理科研）に採取して 9 倍量の Hank' s BSS（日水）を加えたのち、-80°C で凍結保存した。これを解凍し、マイクロホモジナイザー（Fisher）を用いて磨砕したのち、遠心分離（2000×g, 15 分, 4°C）を行った。得られた上清をさらに Hank' s BSS で 5 倍に希釈後、孔径 0.45 μm フィルター（MILLIPORE）で除菌したものを、あらかじめ 24 穴マイクロタイタープレート（Falcon）に培養しておいた FHM 細胞に 100 μL/穴ずつ接種し、20°C で 2 週間培養して VHS ウイルスの特異的 CPE の出現の有無を観察した。なお、CPE が出現した穴のうち、各実験区別に無作為に選んだ 1 穴の培養上清を用いて RT-PCR を行い、VHS ウイルスの感染・増殖に伴う CPE であることを確認した。一方、実験 1 の 20°C 群ワクチン区についてはマイクロタイター法により、心臓・脾臓の混合物および脳におけるウイルス感染価（TCID<sub>50</sub>/g）も測定した。なお、本実験におけるウイルス感染価の検出限界値は  $10^{2.5}$ TCID<sub>50</sub>/g であった。

⑥統計解析：全ての実験において、ワクチン区と対照区の累積死亡率の差異は  $\chi^2$ -test によって判定した。また、ワクチン区と対照区の累積死亡率を使用して感染防御効果（RPS）を次式により求めた： $RPS(\%) = \{1 - (\text{ワクチン区死亡率} / \text{対照区死亡率})\} \times 100$ 。一方、実験 1 の 20°C 群と実験 2 で得られた RPS を Student' s t-test によって比較し、追加免疫の効果を判定した。また、実験 1 の 20°C 群と実験 3 で得られた RPS を Student' s t-test によって比較し、異なる魚体重のヒラメに対する効果を判定した。さらに、実験 1 の 20°C 群ワクチン区においては、死亡魚と生残魚のウイルス感染価を Student' s t-test

によって心臓・脾臓の混合物および脳のそれぞれについて比較した。

## (2) 母子免疫による予防法

①供試親魚：香川県水産試験場で飼育されていたタケノコメバル親魚計 14 尾（平均体重 315g）をワクチン接種群として用いた。親魚はタグ（イラストマー蛍光タグ）を用いて標識し、個体を識別した。

②供試ウイルスおよびホルマリン不活化ワクチンの作製：(1)と同様にして作製した。

③ワクチンの投与：フロイント完全アジュバント（Difco）と等量混合した乳化ワクチン原液を、23G 注射針付き 1ml 容シリンジ（TERUMO）を用いて親魚の腹腔内に 0.5ml/尾ずつ注射して初回免疫を行った。初回免疫 2 週間後および 3 週間後にそれぞれフロイント不完全アジュバント（Difco）と等量混合した乳化ワクチン原液を、同様にして腹腔内注射して追加免疫を行った。最終追加免疫 1 週間後に全個体から採血し、血清を分離後、VHS ウイルスに対する血中抗体価を ELISA 法で測定した。抗体価の測定結果に基づき、高い抗体価を保持していた 2 尾（No. 1 および 2）を選び、0.5kL 容の産仔用パンライト水槽に個別に收容し、産仔するまで自然水温で飼育した。

④攻撃試験：No. 1 および 2 の親魚から、最終追加免疫 18 日後および 19 日後にそれぞれ産仔された仔魚はシオミズツボワムシあるいはアルテミア幼生を与えて飼育し、所定の日令で攻撃試験に供試した。すなわち、ワクチン区には No. 1 に由来する 5 日令および 19 日令の仔魚、ならびに No. 2 に由来する 4 日令および 18 日令の仔魚を供試した。また、対照区にはワクチンを接種していない親魚から産仔した 4 日令および 18 日令の仔魚を供試した。攻撃試験では VHS ウイルスの培養上清を 100 倍に希釈した海水 500mL ( $10^{7.6}$ TCID<sub>50</sub>/mL) に各日令のワクチン区と対照区の仔魚を 50 尾ずつ入れ、水温 12°C で通気しながら 60 分間浸漬して感染させたのち、海水を 4500mL 添加後、14 日間継続して飼育し、死亡状況を観察した。なお、ワクチンを接種していない親魚から産仔した 4 日令および 18 日令の仔魚を MEM 培地で同様にして処理し、各日令別の未感染対照区とした。攻撃試験は未感染対照区を除く全ての実験区において、A および B の 2 区を設定して行った。

⑤仔魚の抗体価測定：各ワクチン区および対照区から攻撃試験に供試した日令の仔魚 25 尾を無作為に採取し、9 倍量の PBS を加えたのち、-80°C で凍結保存した。これを解凍し、ガラスホモジナイザー（Iwaki）を用いて磨砕したのち、遠心分離（2000×g, 15 分, 4°C）を行った。得られた上清を用いて、ELISA 法により上清中に含まれる VHS ウイルスに対する抗体価の測定を試みた。

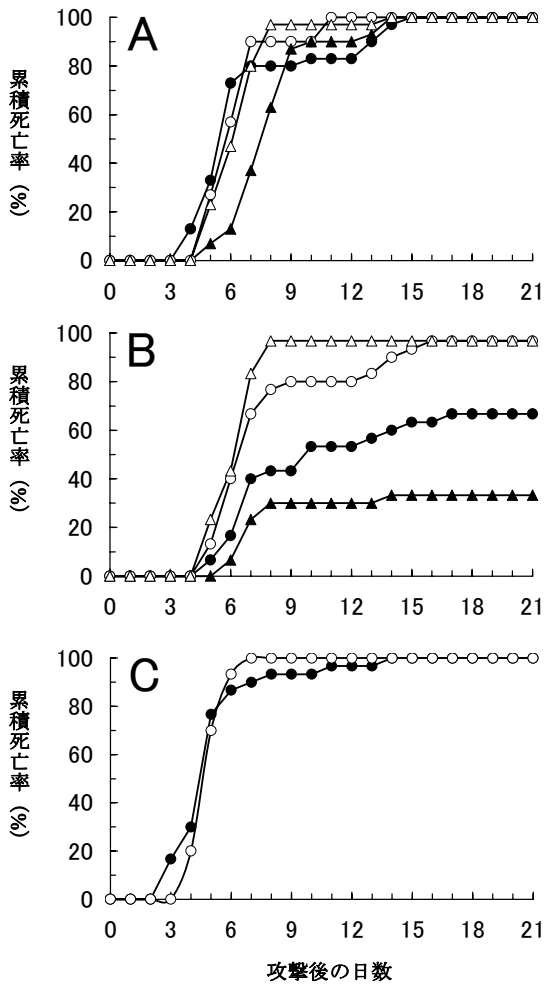


図1 VHS ウイルスで攻撃した各水温群におけるワクチン区および対照区の累積死亡率。

A: 12°C群, B: 20°C群, C: 28°C群。

●: ワクチン区 A, ▲: ワクチン区 B, ○: 対照区 A, △: 対照区 B。

表1 抗VHSホルマリン不活化ワクチンをヒラメ(平均体重10g)に1回接種した実験における感染防御効果

試験群	試験区	死亡尾数/ 供試尾数 (死亡率:%)	x <sup>2</sup>	RPS	ウイルス分離率※1			
					心臓・脾臓		脳	
					生残	死亡	生残	死亡
12°C	ワクチン A	30/30(100)	NS※2	0	0/0	30/30	0/0	30/30
	B	30/30(100)	NS	0	0/0	30/30	0/0	30/30
	対照 A	30/30(100)			0/0	30/30	0/0	30/30
	B	30/30(100)			0/0	30/30	0/0	30/30
20°C	ワクチン A	20/30(66.7)	<0.01	31	7/10	20/20	5/10	20/20
	B	10/30(33.3)	<0.01	66	10/20	10/10	9/20	10/10
	対照 A	29/30(96.7)			1/1	29/29	1/1	29/29
	B	29/30(96.7)			1/1	29/29	1/1	29/29
28°C	ワクチン	30/30(100)	NS	0	ND※3	ND	ND	ND
	対照	30/30(100)			ND	ND	ND	ND

※1: 陽性検体数/検査検体数

※2: 有意差なし ( $p>0.05$ )

※3: 実施せず。

#### 4. 研究成果

(1) 注射免疫と水温調節の併用による予防法

① 攻撃試験: 実験1の攻撃試験における累積死亡率の変化を図1, および攻撃試験終了時における累積死亡率の統計解析の概要を表1にそれぞれ示す。攻撃試験では12°C群にお

ける全てのワクチン区および対照区の死亡率が100%となり、ワクチンの有効性は認められなかった。これは下ら(2003)がホルマリン不活化ワクチンを接種したヒラメ(平均体重3g)を13°Cで4週間飼育後、13°Cで攻撃試験を行った時の結果とほぼ一致している。これに対して、20°C群の死亡率はワクチン区と対照区との間で有意な差異が認められ( $p<0.01$ ), RPSはAおよびB区でそれぞれ31および66となり、ホルマリン不活化ワクチンの投与に伴う感染防御能の誘導が初めて確認された。なお、28°C群においても12°C群と同様に、ワクチンの有効性は確認されなかった。死亡魚および生残魚からVHSウイルスの再分離を試みた結果、死亡魚の全てからVHSウイルスの特異的CPEを呈するウイルスが再分離され、RT-PCRによりVHSウイルスに同定されたことから、攻撃試験における死亡はVHSウイルスの感染に起因するものであることが確認された。これらのことから、ヒラメVHSに対するホルマリン不活化ワクチンの感染防御効果は免疫時とその後の飼育時の水温に依存し、ヒラメの適水温20°Cにおいてホルマリン不活化ワクチンを接種後、同じ温度で約3週間飼育するワクチン投与法は、VHSに対するヒラメの感染防御能の誘導に効果があったと判断される。

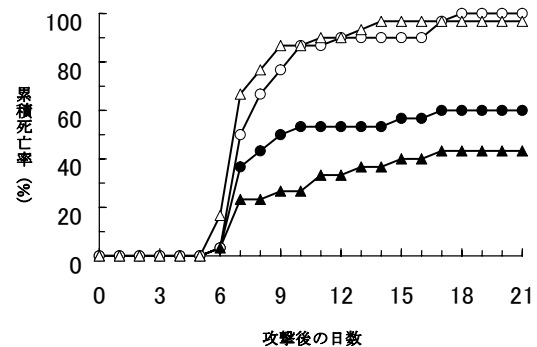


図2 VHS ウイルスで攻撃したワクチン2回接種群におけるワクチン区および対照区の累積死亡率。

●: ワクチン区 A, ▲: ワクチン区 B, ○: 対照区 A, △: 対照区 B。

表2 抗VHSホルマリン不活化ワクチンをヒラメ(平均体重10g)に2回接種した実験における感染防御効果

試験区	死亡尾数/供試尾数 (死亡率:%)	x <sup>2</sup>	RPS	ウイルス分離率※			
				心臓・脾臓		脳	
				生残魚	死亡魚	生残魚	死亡魚
ワクチン A	17/30(56.7)	<0.01	43	8/13	17/17	11/13	17/17
B	13/30(43.3)	<0.01	55	13/17	13/13	11/17	13/13
対照 A	30/30(100)			0/0	30/30	0/0	30/30
B	29/30(96.7)			1/1	29/29	1/1	29/29

※: 陽性検体数/検査検体数

実験2の攻撃試験における累積死亡率の変化を図2, および攻撃試験終了時における累積死亡率の統計解析の概要を表2にそれぞれ示す。ワクチン区AおよびBのいずれについても対照区との間で死亡率に有意な差異が認められ( $p<0.01$ ), RPSはAおよびB区でそれぞれ43および55となった。しかし、本実験で得られ

た RPS を実験 1 の 20°C 群のそれと比較した結果、有意な差異は認められなかった ( $p>0.05$ )。死亡魚および生残魚から VHS ウイルスの再分離を試みた結果、死亡魚の全てから VHS ウイルスの特異的 CPE を呈するウイルスが再分離され、RT-PCR により VHS ウイルスに同定されたことから、攻撃試験における死亡は VHS ウイルスの感染に起因するものであることが確認された。一般に、ワクチンの追加免疫は感染防御能の向上と持続期間の延長に効果のある方法であり、各種の魚類ワクチンについても応用されている。しかし、本ワクチン投与方法における追加免疫の効果は確認されなかった。したがって、本ワクチン投与方法により魚体重約 10g のヒラメに対して感染防御能を誘導させる場合において、追加免疫の必要性は低いと思われる。

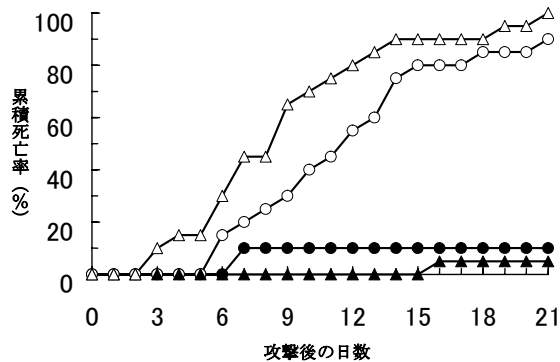


図3 免疫21日後にVHSウイルスで攻撃した大型魚(平均体重100g)におけるワクチン区および対照区の累積死亡率。  
●: ワクチン区A, ▲: ワクチン区B, ○: 対照区A, △: 対照区B。

表3 抗VHSホルマリン不活化ワクチンをヒラメ(平均体重100g)に1回接種した実験における免疫21, 77および98日後の感染防御効果

試験区	死亡魚/実験魚(%)	RPS	$\chi^2$	
21日後	ワクチン A	2/20(10)	89	<0.01
	B	1/20(5)	95	
	対照 A	18/20(90)		
	B	20/20(100)		
77日後	ワクチン A	1/20(5)	94	<0.01
	B	0/20(0)	100	
	対照 A	16/20(80)		
	B	15/20(75)		
98日後	ワクチン A	0/20(0)	100	<0.01
	B	0/20(0)	100	
	対照 A	16/20(80)		
	B	14/20(70)		

実験3の免疫21日後の攻撃試験における累積死亡率の変化を図3、および各攻撃試験終了時における累積死亡率の統計解析の概要を表3にそれぞれ示す。免疫21, 77ならびに98日後のワクチン区AおよびBのいずれについても対照区との間で死亡率に有意な差異が認められた ( $p<0.01$ )。免疫21, 77ならびに98日後のRPSはAおよびB区でそれぞれ89および95, 94および100ならびに100および100となった。本実験で得ら

れた免疫21日後のRPSを実験1の20°C群のそれと比較した結果、有意な差異が認められた ( $p<0.01$ )。ヒラメ VHS は1~1000gまでの様々なサイズのヒラメに流行することから、その予防を目的としたワクチンには被投与魚の魚体重に依存しない効力が要求される。本実験において、本ワクチン投与方法は大型魚に対してもより高い効果を示したことから、ヒラメ VHS の予防に有効なワクチンになり得るものと思われる。また、本ワクチン投与方法により誘導された感染防御能は、少なくとも98日間持続することが明らかとなった。

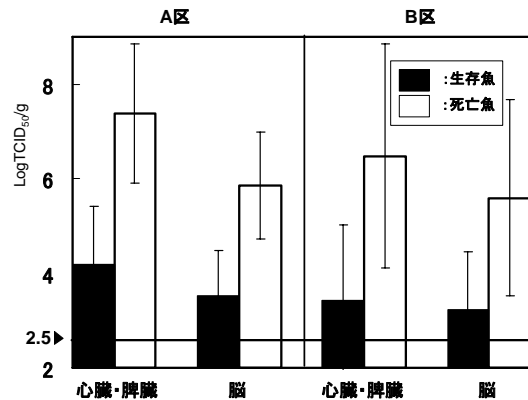


図4 攻撃試験における20°C群ワクチン区の生残魚および死亡魚のウイルス感染価。検出限界値は  $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub>/g。

②死亡魚と生残魚におけるウイルス感染価：実験1の20°C群ワクチン区の死亡魚と生残魚から採取した心臓・脾臓の混合物、および脳におけるウイルス感染価を図4に示す。平均ウイルス感染価±SD(LogTCID<sub>50</sub>/g)はワクチンA区における死亡魚の心臓・脾臓の混合物で  $7.4 \pm 1.5$ 、脳で  $5.9 \pm 1.1$ 、生残魚の心臓・脾臓の混合物で  $4.2 \pm 1.2$ 、脳で  $3.5 \pm 1.0$ 、およびワクチンB区における死亡魚の心臓・脾臓の混合物で  $6.5 \pm 2.4$ 、脳で  $5.6 \pm 2.1$ 、生残魚の心臓・脾臓の混合物で  $3.4 \pm 1.6$ 、脳で  $3.2 \pm 1.2$ であった。得られた平均ウイルス感染価を死亡魚と生残魚との間で比較した結果、両ワクチン区の心臓・脾臓の混合物および脳のいずれについても、生残魚の値が有意に低かった ( $p<0.01$ )。このことから、本ワクチン投与方法には免疫の誘導に伴い、魚体内におけるVHSウイルスの増殖を抑える効力があるものと判断される。

以上のように、本研究により、VHSに対するホルマリン不活化ワクチンの感染防御効果は免疫後の飼育水温に依存し、ヒラメの至適水温20°Cでワクチンを接種後、同じ水温で飼育した場合のみに有効性が確認されること、およびその有効性は少なくとも免疫後98日間持続することが明らかとなった。したがって、本ワクチンを飼育水温が低下する前の時期、あるいは加温飼育期間中に接種してヒラメの防御免疫を誘導しておくことにより、低水温期に流行するヒラメVHSを効果的に予防できる可能性が示唆さ

れる。今後は、ワクチン効果をさらに向上させるアジュバントの探索、および養殖場で自然発生したVHSに対するワクチンの効果などを検討する必要がある。

前述したとおり、VHS に対しては DNA ワクチンのみが高い有効性が確認されているが、DNA ワクチンを実用化するには食品安全上の問題が残されていた。一方、不活化ワクチンは簡便、かつ低コストの工程で製造することができる安全性の高いワクチンであることから、世界各国の養殖魚におけるいくつかの魚病に対して実用化されている。現在のところ、我が国で水産用医薬品として承認を受けている水産用ワクチンは多価ワクチンを含めて計 10 種類であるが、いずれもホルマリン不活化ワクチンである。本研究で開発されたワクチンとその投与法を応用すれば、不活化ワクチンを用いても DNA ワクチンと同程度の予防効果を誘導することができる。今後、VHS の予防に効果のある水産用ワクチンが実用化されることに期待したい。さらに、VHS は国際的にも重要な疾病であるため、国外の水産養殖業界における VHS のワクチン開発に対しても、本研究成果の波及効果は大きいと思われる。本研究の成果はさらに本ワクチン投与に伴う生体防御機構の解明に関する研究へと発展させることにより、ワクチン開発の背景となる魚類の免疫機構の基礎的研究にも寄与するものになるであろう。

## (2) 母子免疫による予防法

①攻撃試験：4日令あるいは5日令を用いた攻撃試験における累積死亡率(%)はそれぞれ4日令のワクチン区AおよびBで94および83、5日令のワクチン区AおよびBで100および100、ならびに4日令の対照区AおよびBで98および100となり、いずれのワクチン区においても有効性は確認できなかった。また、4日令の未感染対照区においても96%の高い死亡率を示したことから、各実験区の死亡率が高くなった原因には攻撃実験時におけるハンドリングも影響していたと思われる。18日令あるいは19日令を用いた攻撃試験における累積死亡率(%)はそれぞれ18日令のワクチン区AおよびBで100および100、19日令のワクチン区AおよびBで100および100、ならびに18日令の対照区AおよびBで94および100となり、いずれのワクチン区においても有効性は確認できなかった。一方、18日令の未感染対照区の累積死亡率は18%と低かったことから、ハンドリングによる影響は低く抑えることができたと考えられる。

②仔魚の抗体価測定：いずれのワクチン区および対照区の仔魚の磨砕液上清からも、VHS ウイルスに対する ELISA 抗体価は検出されなかった。

本研究では、ホルマリン不活化ワクチンの複数回免疫により、タケノコメバル親魚に抗体を産生させることができたものの、親魚に産生された抗体が仔魚に移行し、母子免疫が成立するのかどうかは明らかにできなかった。母子免疫はサケ科魚類やグッピーでは成立することがわかっているが、海産魚類では未だ同様な現象は確認されていない。魚類の母子免疫のメカニズムを含め、さらに詳細な研究が必要である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

(1) 一色 正, ヒラメのウイルス性出血性敗血症に対するホルマリン不活化ワクチンの有効性, 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 2009 年 3 月 28 日, 東京

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 魚類のウイルス性出血性敗血症に対する不活化ワクチンとその処方

発明者: 一色 正・北村真一

権利者: 国立大学法人三重大学・国立大学法人愛媛大学

種類: 特許権

番号: 特願 2008-207626

出願年月日: 2008 年 8 月 12 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://www.pref.kagawa.jp/suisanshiken/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

一色 正 (ISSHIKI TADASHI)

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授  
研究者番号: 30378319

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

北村 真一 (KITAMURA SHIN-ICHI)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・  
准教授

研究者番号: 40448379

### (4) 研究協力者

安部 昌明 (ABE MASAOKI)

香川県水産試験場・主任研究員

長野 泰三 (NAGANO TAIZOU)

香川県水産試験場・主任

