

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19139

研究課題名（和文）ブリ属魚類のノカルジア症に対する 線照射不活化ワクチンの開発

研究課題名（英文）Development of gamma-irradiated vaccine against *Nocardia seriolae* in *Seriola* species

研究代表者

加藤 豪司（Kato, Goshi）

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：50624219

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ノカルジア症はブリ属魚類の養殖に甚大な被害を与えている感染症である。本研究では、病原細菌 *Nocardia seriolae* を線照射により不活化し、ワクチンとして使用した。研究室内で簡易的に飼育できるモデル魚・ギンブナに、本不活化ワクチンを投与したところ、ノカルジア症の症状を示さず、本ワクチンは魚類において病原性を示さないことが示唆された。さらに、本ワクチンを接種した魚に、*N. seriolae* の生菌を腹腔内に接種して攻撃試験をしたところ、陰性対照区よりも統計的有意に累積死亡率が低下した。以上のことから、本ワクチンは魚類のノカルジア症に対して有効であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水産用ワクチンとして一般的に使用されているホルマリン不活化菌体は、ノカルジア症に対して有効性を示さないことから、本症に対する実用化可能なワクチンの開発は難航してきた。本研究の成果により、線照射不活化ワクチンは本症に有効性を示し、現段階では最も実用化に近いワクチン候補であると考えられる。今後、本ワクチンの安全性および有効性についてブリ属魚類を用いて試験を行えば、実用化に大きく近づくと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Nocardiosis caused by *Nocardia seriolae* is one of the most important infectious diseases in aquaculture of *seriola* species in Japan. In this study, we investigated protective efficacy of a gamma-irradiated vaccine against the disease using a model fish species, *Ginbuna crucian carp Carassius auratus langsdorfii*. *Ginbuna* injected with gamma-irradiated *N. seriolae* showed no symptoms of nocardiosis at 4 weeks after the administration, suggesting that the vaccine is not virulent to fish. Furthermore, the vaccinated fish were challenged with live *N. seriolae* and showed statistically higher survival rate compared with phosphate-buffered saline as a negative control. These results suggest that gamma-irradiated *N. seriolae* is effective as a vaccine against fish nocardiosis.

研究分野：魚病学

キーワード：水産用ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ブリ属魚類で発生するノカルジア症は、国内の養殖で最も被害額の大きな感染症の一つである。出荷サイズの成魚が発症・死亡するため被害額が大きく、年間の魚病被害額総額のうち 40%以上を占めることもある。原因菌である *Nocardia seriolae* は宿主の細胞内に侵入して増殖する細胞内寄生性細菌である。そのため、細胞内部まで浸透しにくい抗生物質・合成抗菌剤では本症の治療は難しい。さらに、食の安心・安全に対する消費者意識の高まりからも、抗生物質等を使用しないワクチンによる予防法の開発が求められている。

現在使用されている水産用ワクチンは、すべてが「不活化ワクチン」である。培養した病原体をホルマリンで不活化したものをワクチンとして投与する。一般的に、不活化ワクチンは宿主の液性免疫応答を誘導し、抗体の産生を促進する。抗体は病原体に特異的に結合し、その感染力を中和するか、貪食細胞による殺菌を強力に補助する。しかし、抗体は細胞内まで浸透できないため、宿主の細胞内に寄生する *N. seriolae* にはアクセスできない。このため、ノカルジア症に対しては不活化ワクチンによる予防効果は期待できない。

細胞内寄生性細菌を排除するためには、病原体を感染細胞ごと排除できる細胞性免疫応答の誘導が必要である。弱毒生ワクチンは疑似的に感染を再現できるため、細胞性免疫を誘導できる。これまでに、非病原性の *Nocardia* 属細菌が本症に対する弱毒生ワクチンとして一定の感染防御効果を有することが報告されている。しかし、個別に隔離管理が可能な哺乳類と異なり、海上生簀で群管理する魚類の養殖では、弱毒菌株の水平伝播やそれに伴う病原性の復帰が懸念されており、弱毒生ワクチンは水産用医薬品として認可されていない。

近年、不活化ワクチンの製造方法として、線照射滅菌が注目されている。線照射により染色体 DNA が破壊されるため、病原体は増殖不能となる。しかし、線照射はタンパク質やリン脂質などの生体分子には影響を与えにくく、不活化菌は増殖能を失うものの代謝活性は一定期間保持したままになる。そのため、線照射不活化ワクチンは宿主体内で感染を疑似的に再現することができ、細胞性免疫応答を誘導できる。ヒトやマウスでは、細胞内寄生性細菌である *Mycobacterium leprae* および *M. avium* に対して、線照射ワクチンが弱毒生ワクチン同等の有効性を示すことが報告されている。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、*N. seriolae* の線照射による不活化条件を検討し、不活化菌の代謝活性の保持期間を解明する。また、これら線照射不活化ワクチンの免疫誘導能および感染防御効果を検討し、ブリ属魚類のノカルジア症に対する不活化ワクチンを開発する。

3. 研究の方法

1. *Nocardia seriolae* の線照射不活化条件の検討

哺乳類では、*Mycobacterium* 属細菌の線照射不活化ワクチンが開発されており、ワクチン菌株の不活化には 25~35 kGy で 1.5 時間程度の線照射が行われる。*Nocardia seriolae* は *Mycobacterium* 属に近縁であるため、これらを参考にして線照射による不活化条件を検討する。なお、本研究では線照射実験は外部委託して行う。

- ・ *N. seriolae* に 25、30 および 35kGy の線を 30 分、60 分および 90 分間照射する。その後、1%小川培地で 3 週間培養し、コロニーが生育しないことを確認する。
- ・ 線照射した菌を培地へ接種し、培養液を経時的に採取して NADPH を比色定量することで、不活化菌の代謝活性を測定する。代謝活性が保持される期間のより長いものをワクチン候補とする。

2. 線照射不活化ワクチンの免疫誘導能および感染防御効果

上記の実験により得られた線照射不活化 *N. seriolae* 菌体が、ノカルジア症に対するワクチンとして有効かどうか、ブリ稚魚を用いて解析する。東京海洋大学は充実した飼育設備を有している。また、試験に用いる魚は病原体フリーである必要があるため、陸上水槽で生産された人工種苗を使用する。

- ・ ブリ稚魚に線照射不活化 *N. seriolae* 菌体を注射投与する。4 週間飼育した後、*N. seriolae* による攻撃試験を行い、本ワクチンの感染防御効果を検討する。
- ・ 同様に線照射不活化 *N. seriolae* 菌体を注射投与し、経時的に脾臓および腎臓を採取する。これら組織における炎症性サイトカイン遺伝子 (IL-1、IL-6、TNF) および細胞性免疫関連サイトカイン遺伝子 (IL-2、IL-12、IFN-) の発現解析を行い、本ワクチンにより細胞性免疫応答が誘導されるかどうか解析する。

4. 研究成果

まず、線照射による *N. seriolae* の不活化条件の検討および線照射 *N. seriolae* 不活化菌

体のノカルジア症に対する感染防御効果を検討した。線照射後に各処理群の菌体を 1%小川培地に接種したところ、未処理菌、5 kGy 照射区および 10 kGy 照射区では、培養 14 日後においてコロニーの生育が確認されたが、20 kGy および 30 kGy 照射区ではコロニーは確認されなかった。そこで、不活化の確認できた 20 kGy、30 kGy、HKC、PBS および未処理菌をギンブナに接種したところ、未処理菌接種区でのみ死亡が認められたが、その他の試験区では 28 日後までに死亡はみられず、外観症状もみられなかった。再攻撃試験では、PBS および HKC 試験区の最終的な累積死亡率に対し、20 kGy および 30 kGy 区ではそれぞれ統計的優位に低い値となった。

続いて、ブリの稚魚を用いたワクチン試験および攻撃試験を実施した。体重約 30g 程度のブリ稚魚に線照射不活化菌体を約 10^8 CFU/fish となるように接種し、4 週間後に *N. seriolae* の生菌約 10^5 で攻撃した。いずれの試験区でも累積死亡率は 80%以上となったが、生存日数については 20 kGy 接種区は対照区に比べ有意に長くなった。以上のことから、20kGy の線照射により不活化した *N. seriolae* はブリのノカルジア症に対して感染防御効果を有することが示唆された。

さらに、より安定的に不活化菌体を作製するために、*Nocardia seriolae* の液体培養法を検討し、ジルコニアビーズを添加して振とう培養する方法を試みた。その結果、培養した菌の凝集をかなり抑えることができ、これら培養菌を昨年度までに構築したの線照射不活化法に供した。作製した不活化菌体を 3 日ごとに培地を交換しながらエステラーゼ活性ならびに呼吸活性を測定し、少なくとも 8 日間は細菌が生存している状態であることが示された。これら菌体をブリ養魚に腹腔内投与し、4 週間飼育したが、これら接種魚に病変は認められず、死亡もみられなかったことから、線照射不活化菌体はブリに対して毒性を示さないことが確認できた。さらにこれら線照射不活化菌体を接種した魚に、*N. seriolae* 生菌を腹腔内投与して攻撃したところ、ホルマリン不活化菌体および PBS を接種した陰性対照試験区では脾臓および腎臓に肉芽腫が形成されていたものの、線照射不活化菌体接種区ではこのような病変は全く認められなかった。以上のことから、ブリにおいても本菌の線照射不活化菌体はノカルジア症に対して感染防御効果を示すことが示唆された。このように本研究では線照射不活化技術が魚類細胞内寄生性細菌に対するワクチンの開発において非常に有効であることを示せた。今後、水産養殖で問題となっているその他の細胞内寄生性細菌へも本技術は応用可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ノカルジア症用ワクチン	発明者 加藤豪司・富山貴文	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-002497	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------