HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	大腸菌発現VNNウイルス外被タンパク質に対するマツカワの液性免疫応答開始時期
Author(s)	渡辺, 研一; 吉水, 守
Citation	魚病研究, 37(2), 92-94 https://doi.org/10.3147/jsfp.37.92
Issue Date	2002-06-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53157
Type	journal article
File Information	article107.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

魚病研究 Fish Pathology, 37 (2), 92–94, 2002. 6
© 2002 The Japanese Society of Fish Pathology

大腸菌発現 VNN ウイルス外被タンパク質に対するマツカワの液性免疫応答開始時期

渡辺研一[1*†]・吉水　守[2]

（2001年12月 4 日受付）

Age-dependent Humoral Immune Response of Barfin Flounder against Recombinant Coat Protein of Barfin Flounder Nervous Necrosis Virus

Ken-ichi Watanabe[1*†] and Mamoru Yoshimizu[2]

[1]*Akkeshi Station of Japan Sea-Farming Association, Chikushikoi, Akkeshi, Hokkaido, 088-1108, Japan.*
[2]*Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido, 041-8611, Japan.*

（Received December 4, 2001）

ABSTRACT—Age-dependent humoral immune response of barfin flounder *Verasper moseri* was investigated. One hundred μL of recombinant coat protein of barfin flounder nervous necrosis virus（BFNNV）adjusted to 250 μg/mL in Tris-EDTA buffer（pH 8.0）was injected intravascularly to 4, 5, 6 and 7 month-old fish. One month after injection, an enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）antibody titer was measured. Although no ELISA antibody titers were detected in injected or non-injected fish of 4 and 5 month-old, the antibody titers were remarkably increased（$p<0.025$）in 6 and 7 month-old fish. High ELISA antibody titers were kept for at least 2 months.

Key words: betanodavirus, BFNNV, immune response, *Verasper moseri*, ELISA antibody titer, barfin flounder

北日本の重要な栽培漁業対象種であるマツカワ *Verasper moseri* にも，他の海産魚同様[1]種苗生産時にウイルス性神経壊死症（以下 VNN）が発生し[2]，大きな問題となったが，防疫対策の徹底によりウイルスフリーの稚魚を生産できるようになった[3]。本種の栽培漁業のさらなる推進にあたっては放流後の種苗が疾病に罹病しないことが重要であり，そのためには放流後に感染が想定される病原体に対する放流前のワクチン投与が有効と考えられる。

現在，日本で市販されているワクチンは，ビブリオ病とレンサ球菌症およびマダイイリドウイルス病に対するワクチンの 3 種類であるが，外国ではせっそう病，冷水病，レッドマウス病，冷水性ビブリオ病および伝染性膵臓壊死症に対するワクチンも市販されている。伝染性造血器壊死症，ウイルス性出血性敗血症，アメリカナマズウイルス病およびリンホシスチス病に対する各種ワクチン[4]，ヒラメラブドウイルス病[5]および VNN に対するワクチン[6]が研究されている。そして，これらのワクチンは，魚類の細胞性免疫がふ化後約 2 週間以上，液性免疫がふ化後 4 ～ 6 週間以上経過しないと発達しないため[4]，稚魚期以降に使用することが条件となっている。ただし，免疫応答が発現する時期に関しては明らかとなっている

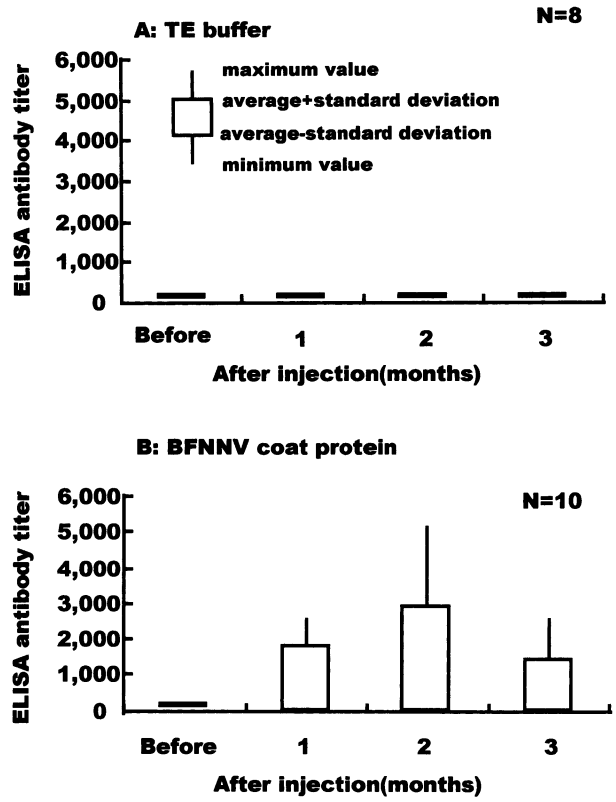

Fig. 1. ELISA antibody titers in sera of adult barfin flounder immunized with BFNNV coat protein. One mL of TE buffer was injected into the muscles and additionally into the blood vessel of control fish (A). One mL of recombinant coat protein of BFNNV (250 μg / mL in TE buffer (pH 8.0)) was injected into the muscle of healthy barfin flounder, and after 2 weeks, 1 mL of the coat protein was injected intravascularly (B).

[1]（社）日本培漁業協会厚岸事業場
[2] 北海道大学大学院水産科学研究科
* Corresponding author
E-mail: kenichi-watanabe@jasfa.or.jp
† 現住所：（社）日本栽培漁業協会能登島事業場（〒926-0216 石川県鹿島郡能登島町曲15-1-1）

魚種は少なく，マツカワやヒラメ *Paralichthys olivaceus* など，異体類についても免疫応答開始時期は明らかでなく，ワクチネーションが有効となる時期は明確になっていない。

本研究では，すでに確立したELISAによるVNNウイルスに対する抗体検出法[7]を用いて，VNN試作ワクチンについて，マツカワの大腸菌発現 barfin flounder nervous necrosis virus（BFNNV）外被タンパク質[7]に対する液性免疫応答開始魚齢を把握することを目的に試験を行った。

まず，日本栽培漁業協会厚岸事業場（以下当場）で飼育したマツカワ成魚（平均体重 1,673 g）の筋肉内に，Tris-EDTA（以下TE）緩衝液（pH 8.0）で250 μg/mLの濃度に調整した大腸菌発現BFNNV外被タンパク質（32 kDa）1 mLを抗原として注射し，さらに2週間後に尾部血管内に同量を追加投与した。対照にはTE緩衝液を注射した。抗原タンパク質を注射した区は10尾，対照区は8尾とした。飼育は自然水温（3.0～12.9°C）の流水により，週3回配合飼料（ヒラメ用ソフト2号，坂本飼料）を飽食量給餌して行った。供試魚の血液を抗原タンパク質投与前および1，2，3ヶ月後に尾部血管より採取し，大腸菌発現BFNNV外被タンパク質を固相抗原としたELISA[7]によりBFNNVに対する特異抗体価を測定した。測定結果を χ^2 検定により比較した。

供試魚に抗原タンパク質を投与した後のELISA抗体価の変化をFig. 1に示した。対照区では試験期間を通して抗体価の上昇は認められなかったが，抗原タンパク質を投与した区では初回投与1カ月目から顕著なELISA抗体価の上昇が認められた（$p<0.001$）。抗体価の上昇が認められた血清の中和能を，常法にしたがってSSN-1細胞[8]を用いて試験したところ，細胞変性効果は観察されず，免疫したマツカワはBFNNVに対する中和活性（ND_{50}＝1:20～1:40）を有していた。このことから，大腸菌発現BFNNV外被タンパク質は，sea bass *Dicentrarchus labrax* に対する不活化魚類ノダウイルス[9]およびシマアジ *Pseudocaranx dentex*[1]およびマハタ *Epinephelus septemfasciatus*[10]に対する大腸菌発現SJNNV外被タンパク質と同様に，マツカワに液性免疫による防御能を誘導できるものと考えられた。

次に，当場で種苗生産した4，5，6および7ヶ月齢（平均全長それぞれ59.5，91.1，107.0，133.2 mm）の魚の尾部血管内に，同濃度の抗原タンパク質を100 μL投与した。対照としてTE緩衝液を投与する区および投与しない区を設けた。各区とも30尾とし，配合飼料を週5

Table 1. Effects of age on humoral immune response of barfin flounder juveniles immunized with BFNNV coat protein

Time after hatching (month)	Time after immunization (month)	Group	Number of fish examined	Average total length (mm)	Number of fish ELISA antibody titer					
					≦10	20	40	80	160	>160
4	0	Control*1	10	59.5	10					
〃	1	Control	10	88.0	10					
		TE buffer*2	10	95.4	10					
		BFNNV coat protein*3	10	91.1	10					
5	0	Control	10	91.1	10					
〃	1	Control	10	102.0	10					
		TE buffer	10	106.0	10					
		BFNNV coat protein	10	104.0	10					
6	0	Control	10	107.0	10					
〃	1	Control	10	133.0	10					
		TE buffer	10	131.0	10					
		BFNNV coat protein	10	129.0	3	2	2			3
〃	2	BFNNV coat protein	10	143.0			4	3		3
〃	3	BFNNV coat protein	10	149.0	8	1	1			
7	0	Control	10	133.0	10					
〃	1	Control	10	140.0	10					
		TE buffer	10	143.0	10					
		BFNNV coat protein	10	141.6						10
〃	2	BFNNV coat protein	10	149.0		1			1	8
〃	3	BFNNV coat protein	10	153.9	3	5	2			

*1 Not injected.
*2 One hundred μL of TE buffer was injected intravascularly.
*3 One hundred μL of recombinant coat protein of BFNNV (250 μg / mL in TE buffer (pH 8.0)) was injected intravascularly.

回飽食量給餌し，14°C に調温した海水により流水飼育した。抗原投与前および投与後1，2，3ヶ月に各区から10尾ずつ血清を採取し（4，5ヶ月齢の稚魚では1ヶ月後のみ），親魚と同様に ELISA 抗体価を求めた。

魚へ抗原タンパク質を投与した場合の ELISA 抗体価の変化を Table 1 に示した。いずれの月齢の魚も，投与前の ELISA 抗体価は10以下であった。4，5ヶ月齢の魚では，投与後1ヶ月を経過しても，抗体価は10以下であった。対照区および TE 緩衝液を投与した6，7ヶ月齢の魚では，いずれも抗体価は10以下であったが，抗原タンパク質を投与した区では，抗体価が6ヶ月齢の魚で≦10～＞160と上昇する個体が認められ，7ヶ月齢の魚では＞160と投与前より顕著に上昇した。

抗原タンパク質を投与した魚の2ヶ月後の抗体価は，6ヶ月齢の魚で40～＞160，7ヶ月齢の魚で20～＞160と引き続き高かったが，3ヶ月後には6ヶ月齢および7ヶ月齢の魚ともに≦10～40に低下した。

これらのことから，本試作ワクチンを1回注射した場合，4～6ヶ月齢までのマツカワでは液性免疫応答の発達段階であり，7ヶ月齢でほとんどの個体に発現するものと考えられた。また，高い抗体価の継続期間は本試験の条件下では投与後1～2ヶ月程度と推察された。

なお各試験区間で注射後の平均全長に明瞭な差は認められず（$p>0.25$，χ^2 検定），死亡する個体もなかったことから，抗原とした BFNNV 外被タンパク質がマツカワの成長・生残に悪影響を及ぼすことはないものと考えられる。

以上のことから，6ヶ月齢以降のマツカワの尾部血管内へ本試作ワクチンを1回注射することにより，本種の液性免疫応答による防疫効果を期待できるものと考える。今後の課題として，本試作ワクチンを注射した魚の血清中の VNN ウイルスに対する中和活性を確認するとともに，注射した魚に対して VNN ウイルスによる攻撃試験を行って効果を検証する必要がある。

一方魚類においては，疾病に対する防御能があっても抗体が認められないか，抗体価が著しく低い場合があり，ワクチンにより誘導される特異的感染防御能は抗体に依存する液性免疫よりも，細胞性免疫や腸管免疫のような局所免疫が重要な役割を果たすことも示唆されている[11]。マツカワでは細胞性免疫や局所免疫の機能を検査する方法が確立されていないが，これらの免疫応答について検討し，より有効なワクチネーション手法を確立していく必要があると考える。

本研究に当たり，日本栽培漁業協会今村茂生第二技術部長，同協会厚岸事業場錦昭夫場長はじめ職員の方々に種々ご配慮をいただいた。ここに記して深謝の意を表する。

文　　献

1）室賀清邦・古澤　徹・古澤　巌（1998）：水産増殖，**46**，473–480. 2）渡辺研一・石間正浩・川真田憲治・吉水　守・絵面良男（1998）：北大水産彙報，**50**，101–113. 3）Watanabe, K., S. Suzuki, T. Nishizawa, K. Suzuki, M. Yoshimizu and Y. Ezura（1998）：*Fish Pathol.*, **33**, 445–446. 4）中西照幸（1998）：水産増殖，**46**，461–468. 5）Eou, J.-I., M.-J. Oh, S.-J. Jung, Y.-H. Song and T.-J. Choi（2001）：*Fish Pathol.*, **36**, 67–72. 6）Husgag, S., S. Grotmol , B. K. Hjeltnes, O. M. Rodseth and E. Biering（2001）: *Dis. Aquat. Org.*, **45**, 33–44. 7) Watanabe, K., T. Nishizawa and M. Yoshimizu（2000）: *Dis. Aquat. Org.* **41**, 219–223. 8）Frerichs, G. N., H. D. Rodger and Z. Peric（1996）: *J. Gen. Virol.*, **77**, 2067–2071. 9）Breuil, G. and B. Romend（1999）: *J. Fish Dis.*, **22**, 45–52. 10）Tanaka, S., K. Mori, M. Arimoto, T. Iwamoto and T. Nakai（2001）: *J. Fish Dis.*, **24**, 15–22. 11）中西照幸（1998）：月刊海洋，号外 No. 14，『魚類防疫』pp. 149–153.