

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo University of Marine Science and Technology (東京海洋大学)

アユの細菌性冷水病に対する感染防御抗原の同定

著者	南 俊伍, 鈴木 究真, 新井 肇, 渡辺 峻, 佐野 元彦, 加藤 豪司
雑誌名	日本魚病学会大会プログラムおよび講演要旨
発行年	2016-09-07
科学研究費研究課題	魚類の鰓上皮抗原取り込み細胞を標的としたニードルフリーワクチンの開発 Development of needle-free vaccine targeting gill-epithelial antigen sampling cells in fish
研究課題番号	16K14971
URL	http://id.nii.ac.jp/1342/00001628/



アユの細菌性冷水病に対する感染防御抗原の同定

○南 俊伍 (海洋大)・鈴木究真・新井 肇・渡辺 峻 (群馬水試)・佐野元彦・加藤豪司 (海洋大)

【目的】 *Flavobacterium psychrophilum* による細菌性冷水病は、アユの養殖業および放流事業において多大な被害を及ぼしており、本病に対する効果的なワクチンの開発が求められている。これまでに、細菌性冷水病の感染耐過魚血清により認識される *F. psychrophilum* の抗原タンパク質が複数同定されている。そこで、本研究では、上記の抗原タンパク質のうち、膜結合型および分泌型の抗原タンパク質 8 種類 (aminopeptidase, Flavo-specific antigen A, FP0073, FP0139, FP1387, Outer membrane protein A, Xaa-Pro dipeptidyl-peptidase, M48 family metalloprotease) の細菌性冷水病に対する感染防御効果を検討した。

【方法】 *F. psychrophilum* の抗原タンパク質 8 種類 (膜結合型：5 種、分泌型 3 種) をクローン化し、大腸菌による実験系を用いて組換えタンパク質を作製した。これらの組換えタンパク質を抗原として使用し、油性アジュバント (ISA763A) と混合してアユの腹腔内に接種した。同様に、*F. psychrophilum* のホルマリン不活化菌体 (FKC) および PBS をそれぞれ陽性対照および陰性対照としてアユに接種した。ワクチン接種後 3 週間もしくは 6 週間アユを飼育し、 1.0×10^6 CFU/mL の *F. psychrophilum* を腹腔内注射して攻撃試験を行った。

組換えタンパク質ワクチンの作製方法は、まず PCR により抗原遺伝子を増幅させ、pET32(+)-ベクターに組み込み発現プラスミドを作製した。そのプラスミドを大腸菌 BL21(DE3)に形質転換し、発現させ、精製を行い組換えタンパク質ワクチンとした。タンパク質の発現は、SDS-PAGE およびウエスタンブロットで確認した。作製したワクチンはアジュバント (ISA763A) と重量比 7:3 で混合し使用した。1 回目のワクチン試験では FspA は $2.67 \mu\text{g}/\text{fish}$ 、HP FP1387 は $1.00 \mu\text{g}/\text{fish}$ 、および OmpA は $0.60 \mu\text{g}/\text{fish}$ で接種し 3 週間飼育後、*F. psychrophilum* (GMA0330) で攻撃試験を行った。2 回目のワクチン試験は、1 回目の試験で効果が高かった 3 つのワクチンをすべて $3 \mu\text{g}/\text{fish}$ になるように接種し 3 週間飼育後に攻撃試験を行った。また 3 回目のワクチン試験では FspA は $10.60 \mu\text{g}/\text{fish}$ 、HP FP1387 は $4.00 \mu\text{g}/\text{fish}$ 、および OmpA は $5.73 \mu\text{g}/\text{fish}$ で接種し、6 週間飼育後に攻撃試験を行った。

【結果】1 回目のワクチン試験では、PBS アジュバントの死亡率が 59%に対して、OmpA の死亡率は 37%、HP FP1387 の死亡率は 37%、および FspA の死亡率は 29.4%であった。5 月 26 日から 6 週間飼育後のワクチン試験では PBS アジュバントの死亡率は 80%なのに対して、OmpA の死亡率は 30.8%であった。