

要 約

アコヤガイの大量へい死に関する病理学的原因究明およびその防除法に関する研究

愛媛県水産試験場

2002年の宇和海における天然採苗貝(1+)の累積死亡率は、全域平均で40.3%と昨年より約20ポイント低下したが、依然高い値を示した。人為感染貝の血球を経時的に顕微鏡および電顕観察した結果、血球には攻撃後30~40日目に病理学的変性が確認され、赤変および病理組織変化より早く病状が確認された。電子顕微鏡観察では、核崩壊を伴うアポトーシス様の細胞死が確認されたが特定の粒子状構造物は見られなかった。被害軽減対策として取り組んだ低塩分処理では処理海水濃度について過去3年にわたり検討した結果、本処理による防除は困難と推察された。

トラフグのやせ病の防除・治療法に関する研究

宮崎県水産試験場

本研究は養殖トラフグで問題となっている「やせ病」の防除・治療法の開発を目的に行った。防除法の開発を目的に感染経路の特定を試みた結果、粘液胞子虫 *Myxidium* sp. TP と *M. fugu* については、前研究で明らかにした感染腸管の経口投与及び感染魚との同居の他、感染魚飼育水槽からの排水曝露によっても魚から魚への直接伝播が成立することが明らかになった。一方 *Leptotheca fugu* については経口的な実験感染が成立しなかったことから、交互宿主を介した生活環が存在する可能性が示された。また、養殖ヒラメにも「やせ病」に類似した病気が認められ、腸管内から *Myxidium* sp. TP と疑われる栄養体が検出された。ヒラメの感染腸管をトラフグに経口投与した結果、感染が成立した。治療法の開発として、3種の薬剤(フマギリン、アルペンダゾール、メベンダゾール)を用いて駆虫効果を検討したが、いずれも効果は認められなかった。また、整腸作用がある3種の物質(木炭、キチン、塩化リゾチーム)を用いて発病抑制効果を調べたが、陽性対照にも「やせ病」が再現されず、効果の検討には至らなかった。残された課題として、ヒラメ腸管にみられた粘液胞子虫が *Myxidium* sp. TP かどうか、感受性はトラフグと異なるのかどうかを確認する必要がある。また、「やせ病」の発病条件や栄養体の海水中での寿命を特定することが、対策を検討する上で重要である。

トラフグのやせ病の原因生物の解明に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科

養殖トラフグの「やせ病」原因粘液胞子虫の系統分類学的位置を推定するため、*Myxidium fugu* のDNAを抽出してSSUrRNA遺伝子の塩基配列を決定した結果、従来の *Myxidium* 属よりも *Enteromyxum* 属粘液胞子虫に近縁であることが示された。これらの遺伝子データは、今後、より簡便で実用的なPCR診断法を開発するための基礎となる。また、ヒラメ、マダイ、イシガキダイでも見られた「やせ病」病魚から *Myxidium* sp. TP と考えられる虫体が観察された。ヒラメでは発育がスポロゴニーに進んでおり、イシガキダイでは成熟胞子も検出された。胞子の形態学的特徴はヨーロッパで問題となっている *Enteromyxum leei* (= *M. leei*) に類似していた。

ワクチン普及に伴うブリ養殖の再興疾病対策に関する研究

大分県海洋水産研究センター

ノカルジア症実験感染ブリ血液から、*Nocardia seriolae* の検出を試みた。浸漬攻撃では、攻撃2週間後に無症状の *N. seriolae* 血液中心陽性個体が出現し、4週間後には多くの個体に結節形成がみられたことから、血液中の *N. seriolae* 検出による早期診断の可能性が示唆された。しかし、PCR法の検出感度が培養法よりも低く、検出法の改良が必要である。PCR法による細菌性溶血性黄疸の診断技術は、ほぼ完成し、ブリ以外の魚種でははじめてヒラマサから溶血性黄疸原因細菌が検出された。原因細菌の薬剤感受性を検討した結果、*N. seriolae* 分離株の多くはサルファ剤やマクロライド系抗生物質に耐性を示し、黄疸原因細菌分離株は多くの薬剤に高い感受性を示した。

養殖ブリの再興感染症に関する研究

愛媛県魚病指導センター

抗酸菌症は西日本各地のブリ養殖場を中心に増加傾向にあることから1989~2002年の発生状況調査を行い流行の原因について検討した。ノカルジア症の感染期は間接ELISA法を用いて推定した。本症の薬剤感受性試験は寒天平板希釈法でMICの測定を行った。また、本症の治療法の基礎試験として感染方法の検討を行った。

抗酸菌症の発生は99年に最も多く、増加の要因として水温による影響が示唆された。ノカルジア症原因菌に対する抗体価は8月に上昇した。薬剤感受性試験は、マクロライド系薬剤で耐性株が認められた。また、水産用医薬品外の二剤およびFFの感受性は安定しており、治療薬としての可能性が示唆された。感染方法は浸漬感染で養殖現場の臨床的な症状が再現された。

アユの冷水病に対するワクチンの有効性等に関する研究

広島県水産試験場

河川での発生が問題となっているアユ冷水病の有効なワクチンに関しての検討を行った。ワクチン処理に適した飼育水温を検討した結果、15℃が適していることが明らかになった。ワクチン原液2回処理を行ったアユを河川水を用いて飼育した結果、対照区と比較して有意に死亡率は低くなったが、アジュバント添加注射ワクチンに有効性は劣った。浸漬ワクチン前処理としてラクトフェリン投与および低pH水処理を行ったが、有効性の向上には結びつかなかった。また、経口ワクチン試験では投与期間および投与量を増加させると有効性が高まる傾向が見られた。BCG接種針を用いたスタンプワクチンの野外試験を行ったが、高い有効性は得られなかった。

アユ冷水病に対するワクチン開発に関する研究 滋賀県水産試験場

アユ冷水病の浸漬および経口ワクチンを作製して有効性を調べた。ワクチンは①ハブテン化②LPSの使用③ビプリオワクチンと冷水病FKCと結合④培養法、固定法を変更して作製したFKC ⅧKC⑤凍結乾燥菌体（経口）の5分類のものを用いた。その結果、本試験で用いた浸漬、経口ワクチンに注射ワクチンを上回る効果は認められなかった。しかしヘモシアニン結合FKC浸漬ワクチンおよびLPS浸漬ワクチンで接種6週間後に有効率がそれぞれ20.0および13.9%に上昇し冷水病菌LPS_ビプリオ菌体結合（未反応LPS含）ワクチンで3週後に26.5%に上昇した。ゆえにこれらワクチンをベースに接種・作製条件等を検討すれば注射ワクチンを上回る可能性もあると考えられた。

アユ冷水病ワクチンの開発に関する研究 神奈川県水産総合研究所内水面試験場

アユ冷水病の予防対策として、浸漬ワクチンおよび経口ワクチンの効果向上について検討した。

ホルマリン不活化ワクチンを用いた浸漬ワクチンでは、ワクチン原液と等濃度（ 10^8 CFU/mL）の高濃度ワクチンにアユを5分または20分浸漬したが、浸漬ワクチンの効果向上は認められなかった。また、冷水病菌の菌体外膜成分ワクチンを用いた浸漬ワクチンでも、アユを5分または30分浸漬したが、浸漬ワクチンの効果向上は認められなかった。

ワクチン内包マイクロカプセルを用いた経口ワクチンでは、5日間の連続投与を14日後に反復して行うことで抗体獲得割合および抗体価の上昇が認められた。また、菌体外膜成分ワクチンを内包したマイクロカプセルを用いた場合、へい死亡率に有意差（ $P < 0.05$ ）が認められた事例があったものの全般に有効率は低かった。

今後、浸漬ワクチンおよび経口ワクチンともに効果的なアジュバント等の検討が必要である。

アユの冷水病及びシュードモナス病の防除に関する研究 岐阜県淡水魚研究所

アユ卵消毒の検討では、琵琶湖産系卵においてはポピドンヨード製剤（有効ヨウ素1%）に対して受精卵で1/2000・5分、発眼卵で1/500・5分、過酸化水素製剤（ H_2O_2 濃度30%）に対して受精卵で9/1000・80分、発眼卵で6/1000・80分、海産系卵においてはポピドンヨード製剤に対して受精卵で1/4000・40分、発眼卵で1/500・5分、過酸化水素製剤に対して受精卵で12/1000・40分、発眼卵で15/1000・40分処理までそれぞれ安全濃度・時間と判断された。

冷水病親魚ワクチンの検討では、精液からの冷水病原因菌の分離率はワクチン3回接種で最も低くなり、統計学的有意差も認められたが、未熟卵ではワクチン接種による保菌率の低下は認められなかった。

ヒラメのウイルス性出血性敗血症（VHS）に関する研究 大分県海洋水産研究センター

低水温期の瀬戸内海域に生息する漁獲直後のイカナゴからVHSVが検出され、天然イカナゴは海域、時期によっては既にVHSVを保有している可能性が高く、ヒラメの餌料として使用する場合には注意が必要であると思われた。不活化ウイルスを接種したヒラメは、水温15℃では3週間以上で免疫を獲得するものと思われた。VHS感染耐過ヒラメについて、疾病終息後1ヵ月目の2002年4月17日から2003年1月17日まで、ウイルスを保有した魚はみられず、抗体量も増加することはなかった。

ヒラメの卵および孵化仔魚に対するVHSVの病害性に関する研究

広島県水産試験場

ウイルス性出血性敗血症ウイルス（VHSV）がヒラメ卵および孵化仔魚に与える影響について調べた。ヒラメ卵がVHSVに汚染されていた場合は、孵化率に影響が無いことが分かったが、孵化仔魚は沈下する現象が見られた。VHSVはポピドンヨード製剤50ppm30秒の処理で不活化でき、グルタルアルデヒド製剤では125ppm10分間で不活化できることが明らかとなった。両剤は、これらの濃度でヒラメ卵に毒性はなかった。VHSVで人為汚染させた卵を、これらの薬剤で消毒処理した結果、孵化は良好であり、仔魚からはVHSVは検出されなかった。孵化仔魚に対してVHSV攻撃を行ったところ、感染による死亡は見られなかった。しかし、攻撃後6日目の仔魚からVHSVが分離されたことから、感染は成立する可能性が示唆された。RT-PCR法は細胞分離法に比して検出感度が低かった。ヒラメ孵化仔魚表皮細胞を初代培養し、VHSVを接種したところ細胞崩壊がみられたが、培養上澄に接種量以上のVHSVが存在しないことが明らかとなった。ヒラメ種苗生産過程においてVHSの防疫対策を策定する上で、卵の消毒は非常に重要だと思われる。また、孵化仔魚も弱いながらもVHSVに対する感受性を有する可能性が示唆されたことから、感染経路を遮断することが必要である。

クルマエビPAVの予防免疫に関する研究

広島大学大学院生物圏科学研究科

現在世界各地で養殖クルマエビ類にwhite spot syndrome (我が国ではPAV)なるウイルス病が流行し、大きな被害をもたらしている。本病の防除対策技術の開発に資するため、クルマエビにおける免疫様現象の解明(平成12年度)、感染伝播機構の解明(13年度)、および予防免疫の可能性(14年度)について検討し、以下のことを明らかにした。

- 1) 原因ウイルス(WSSV)に感染したエビにおいて、感染3週間後から2ヶ月後にかけて、再感染に対する明らかな抵抗性が認められた。
- 2) この抵抗性は主として血リンパ中に存在するウイルス中和活性因子によることが示された。
- 3) クルマエビの飼育密度が高いとWSSV感染による死亡率が高くなることが確認された。
- 4) エビの密度が高くなると共食いおよび水系感染によるウイルスの水平感染の機会が増すことが確認された。
- 5) ホルマリン不活化WSSVおよび免疫賦活剤を接種することにより、クルマエビにWSSVに対する抵抗性を誘導し得たが、その抵抗性はあまり高くなかった。
- 6) 大腸菌発現系を用いてWSSV構造タンパク質の組換えタンパク質(rVP26, rVP28)を作製し、それを用いて免疫したところ、高い抵抗性が誘導され、ワクチンとしての可能性が示された。

サケ科魚類のOIE指定伝染病OMVDの撲滅に向けた研究

北海道大学大学院水産科学研究科

再興感染症であるニジマスのOMVDによる産業被害をなくすと共に、わが国におけるOMVの分布実態を把握し、OMVD撲滅に向けての総合的な研究を目標に、今年度は現在までに日本各地のサケ科魚類から分離されたヘルペスウイルスの血清学的関係について比較検討した。次いで分子生物学的手法を用いてヘルペスウイルスの比較検討を行い、以下の結論を得た。

- 1) 日本各地のサケ科魚類から分離されたヘルペスウイルスのうち、サクラマス由来のOMVおよびYTV、ヒメマス由来のNeVTA、ギンザケ由来のCOTVおよびOKV、ニジマス由来のRKVおよびRHVを対象に血清学的関係を検討した。その結果、供試したいずれのウイルスも、血清学的にOMVと同一のウイルスであることが明らかとなった。
- 2) 上記の7ウイルスおよび米国由来*H. salmonis*を供試し、*Bam*H I、*Hind* III、*Sma*Iおよび*Eco*RIによるDNA切断パターンを比較観察し、さらにOMVの³²P標識プローブを用いたサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。供試したわが国由来株の切断パターンに大きな違いは認められなかったが、米国由来株は大きく異なっていた。サザンハイブリダイゼーションでも、米国由来株は反応しなかったが、わが国由来のウイルスは本プローブと反応を示した。
- 3) サクラマス由来のOMVとヒメマス、ギンザケおよびニジマス由来ウイルスの構造タンパク質の電気泳動像を比較した。供試4ウイルス間に大きな差異は認められず、構造タンパクの面からも同一ウイルスと考えられた。
- 4) わが国由来のOMV、COTV、RHVおよび腫瘍由来のOMV(SHT-8217株)をPCRに供した結果、何れのウイルスからも約440塩基長の増幅産物が得られた。また前4者から得たPCR産物の塩基配列を解析したところ98%以上の類似性が認められた。