

要 約

(1) 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

Oncorhynchus masou virus (OMV) 感染症は当初ヒメマスおよびサクラマスで問題となり、約10年を経過してギンザケでも産業被害が発生した。防疫対策が功を奏し北日本ではほぼ終息した。しかし、1992年に北海道のニジマスで再発し、その後、本州中部のニジマス養殖場で大きな被害を与え問題になっている。本研究では、ニジマスの産業被害をなくすと共に、わが国からOMVDをなくすことを目的に総合的な研究を行った。13年度は、潜伏感染部位の特定を目的にウイルス遺伝子の検出法としてPCRを開発し、本法を用いて病魚体内でのOMVの分布および採卵親魚の成熟段階ごとのOMV出現部位を検討し、まず腎臓および脳から、次いで各臓器から検出されることを見いだした。しかしウイルスは卵巣腔液以外では分離されなかった。次いで経卵感染の可能性を検討しIHN同様その可能性を否定した。さらに各種消毒薬のOMV不活化効果、OMVの温度およびpH感受性を検討し、IHN対策と同様の方法での効果を確認した。14年度は、分離株の血清学的性状およびDNAの比較を行い、わが国分離株は全て同一の血清型に属すこと、制限酵素切断パターン、構造タンパク質およびPCR産物に大きな違いが見られないことを見いだした。本年度は、本研究で得られた成果を基に防疫対策の再検討を行い、採卵親魚を対象としたワクチン投与効果の検討を行い、卵巣腔液へのOMV出現率が顕著に減少することを見いだした。防疫対策マニュアルを作成し、発生歴のある養魚池を対象に実施したところ発症がみられなくなった。

(2) 過酸化水素製剤等によるサケマス卵のミズカビ病防除法の実用化に関する研究

宮城県内水面水産試験場

サケマス卵のミズカビ病防除対策として、過酸化水素製剤の実用化と薬剤を使用しない防除法について検討し、以下の結果を得た。ミズカビ菌糸は H_2O_2 900~1200ppm・30分, 600ppm・60分の浸漬により発育が抑制された。 H_2O_2 に対する卵の抵抗力は魚種により異なり、ニジマス、ヤマメ、イワナ、ギンザケは強く、シロサケは弱かった。受精~発眼期までの H_2O_2 反復薬浴 (2回/週)の安全濃度は、1回浸漬のそれより低下した。 H_2O_2 の11臨床試験 (600ppm, 1時間, 薬液循環)における有効率は30%以下と低く、 H_2O_2 < 死卵1回除去 < 死卵毎週除去 < マラカイトグリーンの順であった。

(3) 養殖魚の薬剤吸収・排泄に及ぼす飼育管理技術の影響に関する研究

大分県海洋水産研究センター

溶存酸素量がヒラメの薬剤吸収・排泄に及ぼす影響を調べるため、高酸素区、低酸素区および高酸素で投薬後に低酸素に移行した区の3区を設定し、OTC濃度を肝臓、腎臓および筋肉の3部位について、1、5、10、20、30、40日後の計6回調べた。各区ともに有意差は見られず、溶存酸素量がヒラメのOTC吸収・排泄に及ぼす影響はないと思われた。ヒラメは他魚種に比べて平常時の酸素消費量が少なく低酸素に強いことによると考えられた。

ホシガレイのOTC吸収は1日後の肝臓のOTC濃度はヒラメと変わらなかったが、筋肉のOTC濃度はヒラメに比べて低く、吸収がやや遅いことが考えられた。このことから、OTCが残留する心配はないが薬効が低くなる恐れがあることが考えられた。

(4) 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

ワクチン普及に伴いブリ養殖において被害増加が表面化してきた抗酸菌症や細菌性溶血性黄疸の対策には早期発見が必須であるが、いずれの疾病も細菌学的検査による診断だけでは、迅速性や検出感度の面で有用性に乏しい。そこで、分子生物学的手法等による診断技術を開発し、対策技術を検討した。ノカルジア症に関する研究では、実験感染ブリの血液中 *Nocardia seriolae* の検出をPCR法を用いて検討したが、検出感度が低く、早期診断技術として利用するためには核酸抽出法を含めてさらに改良検討が必要であると思われた。また、7H11寒天を用いたディスク法による *N. seriolae* の薬剤感受性の簡易測定法を提示することができた。細菌性黄疸に関する研究では、PCR法による診断技術がほぼ完成し、魚病診断における補助検査としての有用性が確認された。PCR法を用いることによってブリ以外の魚種ではじめてヒラマサから原因細菌が検出された。また、不活化ワクチンによる予防を試みた結果、有効性は認められなかったが、感染耐過魚血清が原因細菌の増殖を抑制することが明らかとなり、予防免疫の可能性が残された。今後は抗酸菌症や細菌性黄疸などの対策技術開発をめざし、ワクチン開発を中心とした研究を進める必要があると考えられる。

(5) 養殖ブリの再興疾病に関する研究

愛媛県魚病指導センター

ノカルジア症における診断法の確立、感染方法の検討、治療試験、予防試験について検討した。診断法はPCR法で臓器からの菌の検出を試みた。感染方法では5手法を用いて各手法におけるLD₅₀を求めた。治療試験では2剤を用いて治療効果を検討した。また、予防試験では、試作ワ

クチンを用いて効果の判定を行った。

診断法として用いたPCR法は結節未形成の臓器から検出されず、有効な手法では無かった。感染方法の結果、本症には浸漬法が最も有効な手段と考えられた。治療試験では、両剤ともに治療効果は認められたが生残魚の多くは保菌状態であり、現時点での根治は困難であると考えられた。また、試作ワクチンによる予防効果は認められなかった。

(6) 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」原因粘液胞子虫である *Myxidium* sp. TPと *Leptotheca fugu* のSSUrRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。*Myxidium* sp. TPは *Enteromyxum leei* と99.6%の相同性があったが、*L. fugu* は *Enteromyxum* 属とも従来の *Myxidium* 属とも類縁が遠かった。*Myxidium* sp. TPをマダイに実験感染して得られた胞子の形態学的特徴は、*E. leei* のそれと一致した。これらの分子生物学的、形態学的証拠から、*Myxidium* sp. TPと *E. leei* は同種であることが確認された。*Enteromyxum fugu* (= *Myxidium fugu*)、*E. leei* (= *Myxidium* sp. TP)、および *L. fugu* の3種を識別するPCR法を開発し、従来の腸管スタンプ検査法より検出感度が高いことが示された。

(7) アユ冷水病ワクチンの有効性に関する研究

広島県水産試験場

浸漬ワクチンおよび経口ワクチンの有効性を高めるために様々な検討を行った。ワクチン作製用培地の検討を行った結果、改変サイトファーガ培地と比較して羊血液寒天培地で作製した浸漬ワクチンの有効性が高かった。免疫増強強

化を期待して冷水病菌以外の魚病細菌を冷水病ワクチンに添加した結果、*R. salmoninarum*を添加した注射ワクチンの有効性が高かった。一方、ワクチン液のpHの調整やアルギン酸ナトリウムの添加を行ったが、浸漬ワクチンの有効性は高まらなかった。また、浸漬ワクチン処理前に免疫賦活剤のLPSを投与した結果、ワクチンの有効性が高まった。経口ワクチンと浸漬ワクチンとの混合処理を行ったが、ワクチンの有効性は得られなかった。

(8) 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

冷水病が発生し、無処置で終息後の水平感染耐過アユの抗病性を調べると、FKC注射ワクチン接種アユよりも非常に高く、培養菌浸漬攻撃耐過アユでも同様に高かった。水平感染耐過アユおよびアジュバント添加FKC注射ワクチン接種アユ血清が認識する抗原を調べると、冷水病生菌から60℃で抽出した抗原分画液に対して水平感染耐過アユ血清は低分子画分と反応する抗体を少量有し、FKC注射ワクチン接種アユは高分子画分と反応する抗体を多量に有しており、認識抗原は異なっていた。この水平感染耐過アユ血清を健常アユに接種して受動免疫したが抗病性の付与効果は認められず、細胞性免疫等の他の免疫系の活性化が必要と判断された。さらに、培養菌の注射攻撃で生残した感染耐過魚の抗病性が高かったことから局所免疫系より体内免疫系が重要ではないかと推察された。ゆえに水平感染耐過アユの抗病性はFKC注射ワクチンの接種だけでは生じない体内免疫系の活性化が必要と考えられた。

(9) 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、経口ワクチン及び浸漬と経口の併用ワクチンによる効果向上について検討した。ホルマリン不活化ワクチン内包マイクロカプセルを延べ15日または20日投与したが、有効率は低かった。水溶性アジュバントを添加したホルマリン不活化ワクチンを内包したマイクロカプセルを延べ15日投与したところ、有効率が上昇する傾向が認められた。ホルマリン不活化ワクチンまたは菌体外膜成分ワクチンを用いた併用ワクチンは、併用による有効率の向上は認められなかった。今後、経口ワクチンの投与量、IMSの添加割合およびアジュバント種類等の検討が必要である。

(10) 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

近年、アユの冷水病及びシュードモナス病(以下、細菌性出血性腹水病)はアユ養殖業にとって大きな問題である。しかし、アユ人工種苗生産現場において両魚病への防疫体制は未整備の状態である。本研究ではアユ人工種苗生産の防疫体制の一環として卵消毒技術及び冷水病親魚ワクチンの開発に取り組んだ。アユ卵消毒剤としてポビドンヨード製剤及び過酸化水素製剤について検討を行った。その結果、ポビドンヨード製剤(有効ヨウ素1%)はアユ卵に対して安全な消毒処理は困難と判断された。また、過酸化水素製剤(過酸化水素濃度30%)については、冷水病菌に対しては安全な濃度・時間内で消毒処理することが可能であると判断された。しかし、細菌性出血性腹水病菌に対してはポビドンヨード製剤と同様に安全な濃度・時間内で消毒処理することが困難と判断された。以上より、アユ卵の消毒方法として受精1時間後に過酸化水

素製剤（作用濃度1/1000・60分あるいは2/1000・30分）処理を行うことで冷水病菌の消毒処理が可能と考えられた。また、冷水病親魚ワクチンの検討では効果は認められなかった。本研究で冷水病菌を対象とした卵消毒技術開発については一定の成果が得られた。しかし、実用化に向けて更に詳細な知見の収集及び細菌性出血性腹水病菌やその他のアユ病原細菌を対象とした卵消毒技術の確立は今後、課題として取り組む必要がある。

(11) アユ冷水病ワクチン有効性試験の研究 三重大学生物資源学部

本研究ではアユ冷水病ワクチンの開発を目的として、エドワジエラ菌を用いた油球包埋型経口ワクチンについて基礎的検討を行った。魚類は、腸管後半部の栄養吸収部位で、脂肪をクルードのまま吸収することが知られている(宮崎・藤原 1988)。そこで界面活性効果がある多糖体を利用して、油球懸濁液が簡単に作成できることから、その油球に抗原を包埋して魚に投与すれば、腸管上皮が脂肪を吸収することにより同時に抗原も吸収されると考えられた。本年度は取扱いの容易なヒラメを用いて実験したところ、油球ワクチンはヒラメの抗体産生を促すことが確認された。また、生菌攻撃実験でも、ワクチン投与した魚の方が明らかに生残率が高く、血清の抗体価が512以上であれば10⁵CFUレベルの*E. tarda*の攻撃に耐え、生残できると考えられた。

(12) アユ冷水病ワクチン有効性試験の研究 福山大学生命工学部

アユ冷水病を防除するために開発したウサギ赤血球膜結合LPSワクチンの防御機序を探ることを目的として、同ワクチンに浸漬したアユ体表粘液中の白血球の貪食能について検討した。

ウサギ赤血球膜結合ワクチン浸漬後、30分から60分で体表粘液中の白血球数は増加し、白血球がウサギ赤血球膜結合ワクチンを貪食することが明らかとなった。また、アユ体表粘液中のレクチンは、ウサギ赤血球膜結合ワクチンと結合することから、白血球のオプソニン効果が期待された。

(13) アユ冷水病ワクチン有効性試験の研究 徳島県立農林水産総合技術センター 水産研究所

三重大学で開発されたアユ冷水病油球ワクチンの有効性について検討した。ワクチン試験区は油球ワクチン3週間投与区、破壊菌体油球ワクチン3週間投与区、破壊菌体油球ワクチン2週間投与区、アジュバンド添加注射ワクチン区および対照区を設けた。その結果、全てのワクチン投与区において有効性は確認されなかった。また、油球ワクチンを投与した試験区では抗体価の上昇が確認されなかった。油球ワクチンについては、不活化剤として加えたホルマリンにより有効性が低下した可能性が考えられたことから、これを除去した油球ワクチンにより有効性を再検討する必要がある。

(14) アユ冷水病ワクチン有効性試験の研究 滋賀県水産試験場

これまでに有効性が確認され、または作製・投与手法で効果が期待される冷水病ホルマリン死菌(FKC)ワクチンを投与し、投与4週間後に抗体価の測定および水平感染攻撃を行って有効性を評価した。浸漬ワクチンにはウサギ赤血球膜(RaRBC)結合粗リポ多糖, RaRBC結合FKCを、経口ワクチンにはFKC油球, FKC水球およびFKC直接餌料混合を用いた。その結果、全ての区でFKCに対する凝集抗体価は検出されな

った。また、攻撃試験ではその期間中に細菌性出血性腹水病が発生したことから再試験の必要性があるものの、試験ワクチン区の全てで無処理対照区と同等かそれ以下の生残率を示し、これらワクチンの有効性は確認できなかった。

(15) アユ冷水病ワクチン有効性試験の研究 長野県水産試験場諏訪支場

新たに開発された油球経口ワクチンのアユ冷水病に対する有効性をマイクロタイター法による凝集抗体価及びアユ冷水病発病魚群の飼育排水を試験水槽に注入する人為感染試験によりアジュバントワクチンと比較して評価した。油球経口ワクチンは1日に体重1kgあたり2gのワクチン液を配合飼料に添加し、3週間で延べ15日間投与した。アジュバントワクチンは1尾当たり60 μ Lのワクチン液を腹腔内に注射した。凝集抗体がアジュバントワクチン魚に誘導されていたが、油球経口ワクチン魚には確認できなかった。人為感染試験は攻撃強度が強かったため各試験区の累積死亡率は95～100%と高く、油球経口ワクチンの評価には至らなかった。