

## 要 約

### 1. 二枚貝類の生体防御に関する研究

東北大学大学院農学研究科

海産二枚貝の生体防御機構において重要な2つの液性因子、殺菌因子であるリゾチームと、凝集活性やオプソニン活性を持つレクチンについて、マガキ、ムラサキイガイおよびアサリを材料として活性の季節変動と体内分布、遺伝子の発現等を調べ、生体内での役割を考察した。ムラサキイガイのリゾチーム活性はマガキの36～100倍と非常に高く、組織では外套膜と消化盲嚢で高い活性を示した。反応温度による活性の違いが認められ、マガキでは37℃で、ムラサキイガイでは25℃で高い値を示した。これらの結果から、リゾチームには生体防御と消化という2つの機能があり、組織により異なると考えられた。また、マガキ、ムラサキイガイともに複数のリゾチーム遺伝子を持ち、ムラサキイガイでは外套膜と消化盲嚢において発現遺伝子が異なることを示した。アサリのレクチンを血漿から精製した。このレクチンは、二枚貝幼生の病原菌である *Vibrio tubiashii* に対する血球の貪食能を有意に高め、オプソニンとして働くことを明らかにした。供試した3種類の細菌に対して殺菌能は示さなかったが、増殖抑制作用が認められた。マガキに *Vibrio* 菌を接種した細菌刺激では、血リンパのレクチンが応答して活性が有意に上昇した。今後は、生体防御機構と感染症との関連を検討する必要がある。

### 2. 貝類の寄生虫症に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科

パーキンサス属原虫のアサリ稚貝に対する影響を実験的に評価することを目的として以下

の研究を行った。まず、わが国のアサリには *Perkinsus olseni* と *P. honshuensis* の2種が寄生していることが報告されたことから、培養株を用いた攻撃試験を行うために培養株からの遊走子の作出法の開発を試みた。培養した栄養体を道東産の無感染アサリ軟組織とともにホモジネートし、RFTM培地で培養して前遊走子嚢を作出した。*P. honshuensis* では、20～30℃の海水中で培養することで、40%以上の高い累積遊走子放出率を得たが、*P. olseni* では、累積遊走子放出率が最大でも約4%程度と極めて低かった。そのため、攻撃試験では自然感染個体から得た虫体を用いることとした。アサリに寄生するパーキンサス属原虫の種を明らかにするため、PCR-RFLP法による同定法を開発し、瀬戸内海産アサリについて調べた結果、*P. olseni* と *P. honshuensis* の2種が感染し、その中でも *P. olseni* が優占種であることを明らかにした。次に、瀬戸内海産アサリ組織をRFTM培地で培養して得た前遊走子嚢を用いて、無感染の北海道産アサリ稚貝とパーキンサス属原虫に低レベルに感染している東京湾産アサリ稚貝を供試して攻撃試験を行ったところ、いずれも遊走子 $10^5$ 個以上の攻撃区では、対照区に比較して明らかに低い生残率を示し、パーキンサス属原虫がアサリ稚貝に致死的影响があることが明らかとなった。

### 3. ホヤの新疾病（被嚢軟化症）の疫学的研究

宮城県水産研究開発センター・

宮城県気仙沼水産試験場

2007年2月に宮城県で初めて確認されたマボヤ被嚢軟化症について、県内の発生状況およ

び種苗導入実績などの疫学的情報を集めるとともに、感染性の有無を評価するため発症漁場へのマボヤの試験垂下、室内における感染実験を行った。併せて、各種組織の病理組織学的検討を行った。マボヤ被囊軟化症は、2004年夏に韓国産種苗が導入された海域でのみ発生が確認され、韓国産種苗との関連が伺われた。また、試験垂下および室内感染実験では、これまでのところ発症個体は確認されず、感染性については不明である。病理組織学的検討を行ったところ、顕著な病変は被囊にのみ認められ、被囊組織の観察により診断が可能であると考えられた。

#### 4. ホヤに寄生する原生生物に関する研究

##### 筑波大学大学院生命環境科学研究所

ホヤ被囊軟化症の原因が、原生生物の寄生によるものかどうか解明するための基礎的知見を得ることを目的として、ホヤの発症個体・健常個体の血球からのDNAを解析した。パラミクサおよびケルコゾアに特異的なプライマーによるSSU rRNA遺伝子のPCRによる増幅や、コロニーハイブリダイゼーションを利用した手法により、ホヤ血球内の寄生原生生物の配列の検出を試みたが、その存在を示唆する配列は検出されなかった。さらに、光学顕微鏡および電子顕微鏡観察でも原生生物の存在を支持する結果は得られなかった。しかし、コロニーハイブリダイゼーション法では、コントロールとして用いた他の生物ではプローブが結合していないことから、原生生物の存否を確認するための有効な手法であると考えられる。

#### 5. ホヤ新疾病（被囊軟化症）の病因及び診断方法に関する研究

##### 北海道大学創成科学共同研究機構

宮城県養殖場で発生したマボヤ被囊軟化症の原因を解明し、簡便な診断方法の確立を目的として以下の解析を行なった。健常個体の組織および体液、病気個体（軽症）の体液を用いてセルロース分解酵素活性を調べた結果、肝臓に高いセルラーゼ活性が検出された。病気の有無にかかわらず体液にはセルラーゼ活性は検出されなかった。また、病気発症海域および非発症海域のモニタリング用ホヤ16個体の被囊および内部組織の重量を測定し、被囊重量指数（=被囊重量/内部組織重量）を求めて比較したところ、病気個体の指数が一番低いこと、また、病気発生海域のホヤの指数が経時的に低くなっていく傾向がみられた。

#### 6. アユ「ボケ病」の病態生理および診断技術に関する研究

##### 日本獣医生命科学大学獣医学部

アユ「ボケ病」の病態生理を明らかにし、簡便な診断手法を開発するために以下の研究を行った。1) 病理組織学的検査による病型判定のため、503尾の病アユの鰓切片にH&E染色等を施し、光学顕微鏡下で観察した結果、細菌性鰓病型が29尾、異型細胞型が63尾、その混合型が31尾であった。2) 155検体の病アユ血清の血清電解質、アンモニア、尿素態窒素、尿酸を自動測定装置を用いて測定した結果、細菌性鰓病型および混合型では電解質バランスが損なわれ、窒素代謝産物が増加していることが判明した。3) 異型細胞の染色特性を明らかにするため、鰓切片に17種類の染色を施して光学および蛍光顕微鏡で観察した結果、異型細胞は光顕観察ではGill's hematoxylin No. 5染色、蛍光顕微鏡観察ではAcridine orange染色によく染色され、実用的な簡易判別に使用しうると考えられた。

## 7. アユ「ボケ病」の細菌学的研究

栃木県水産試験場

養殖現場で発生しているアユ「ボケ病」とされる症例について飼育状況や死亡状況、処置方法の調査を実施した。併せて細菌性鰓病原因菌*Flavobacterium branchiophilum*のPCRや、新たに開発されたアユポックスウイルス(PaPV)のPCRによる検査も実施し、ボケ病研究としては初めて病原体に着目した症例調査を行った。その結果、生産者がボケ病と自己診断した7症例全てでPaPVが検出され、そのうち4症例で発症時に*F. branchiophilum*が検出された。病理組織学的に観察される長桿菌と*F. branchiophilum*との関連については明らかにはできなかったが、PaPVと*F. branchiophilum*がボケ病発症に強く関与していることが示唆された。

## 8. アユ「ボケ病」のポックスウイルスとの関連に関する研究

東京海洋大学海洋科学部

アユポックスウイルス(仮称PaPV)の感染とボケ病との因果関係を明らかにする目的で、主として栃木県でボケ病と判断された症例についてPaPV感染の有無を調査するとともに、アユに対する感染実験を行った。その結果、PaPVは少なくとも栃木県、岐阜県、熊本県に分布し、栃木県ではボケ病の発生と強く関連していた。一方、PaPVはアユ体内で少なくとも10℃～25℃の範囲で増殖するが、PaPV感染を原因とする死亡は確認できなかった。栃木県ではボケ病非発症群からもPaPVが複数例検出されたことから、PaPVはアユを宿主とするウイルスであるが、その感染単独では大量死を引き起こさず、大量死の誘因として関与しているも

のと推定された。

## 9. 養殖ブリの不明病の疫学的研究

愛媛県魚病指導センター

愛媛県の養殖ブリに数年前から発生している異常遊泳、肥満度の低下、吻端部から腹部にかけてのスレや発赤、腹腔内および脳の発赤を主な症状とする原因不明の死亡について、疫学調査により発生状況を調べるとともに、養殖現場で経験的に知られている本病発病と給餌方法の関連を飼育試験により調べた。疫学調査の結果、稚魚では愛媛県内外の種苗餌付け漁場のほか、愛媛県内の養殖漁場においても感染している可能性が示唆された。成魚では、稚魚期に感染した群では、再度発病しやすいことが明らかとなった。飼育試験では、飽食給餌に比べて制限給餌では、脊髄の病変が軽度であり、制限給餌が本病の症状進行の抑制に有効なことが示唆された。

## 10. 養殖ブリの不明病の病理組織学的研究

東京海洋大学海洋科学部

昨年度および本年度に得られた病理組織学的所見から、不明病に特徴的な診断基準を4つ設けた。すなわち、脳と脊髄における1. グリオシスとグリア結節、2. 神経食現象を伴う大型神経細胞の変性、3. うっ血または出血、4. 神経線維の膨化と断裂である。また、愛媛県産ブリでは、不明病に特徴的な病変および寄生虫シスト様構造物は7月から確認され始め、病状の程度のピークは8～9月であった。昨年度の結果も考え合わせると、この疾病は愛媛県のほかに、高知県や鹿児島県でも発生していると考えられた。大分県や宮崎県では未発生であるが、種苗を愛媛県に導入し、養殖すると発生することが分かった。越冬した越冬病魚にも特徴的な病変と寄生虫シスト様構造物が確認された。

## 11. 養殖ブリの不明病の遺伝子解析およびPCR診断法に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科

近年、脳脊髄炎を特徴とする養殖ブリの「不明病」が問題になっている。その原因体と疑われている粘液胞子虫の遺伝子を解析して、分類学的位置を推定すること、およびPCR診断法を確立することを目的とした。ブリ病魚の脊髄から粘液胞子虫のSSU rDNAをシーケンスして系統解析した結果、ブリやカンパチの胆管に寄生する*Myxobolus spirosulcatus*の塩基配列と約99%以上一致した。得られた遺伝子情報に基づき、種特異的で検出感度の高いPCR法を開発した。しかし、外観・剖検による診断結果とPCRによる診断結果が必ずしも一致しなかったことから、この粘液胞子虫と不明病との因果関係の証明についてさらに調査が必要と考えられた。

## 12. 養殖トラフグの血管内吸虫に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科

2007年12月に5県の養殖トラフグ0～1歳魚の26ロット、計124尾について*Psettarium*属血管内吸虫の寄生の有無を調べたが、寄生は確認できなかった。前年度同様、中国産種苗とともに日本に持ち込まれた血管内吸虫の生活環が国内で完結しているという証拠は得られなかった。しかし、2007年10月と12月に調査した中国の養殖トラフグ2ロットのうち、1ロットのすべての脾臓に少数の虫卵が確認され、中国においてはいまだに血管内吸虫の感染があることがわかった。2007年4月～2008年1月に4県の天然トラフグ属フグ7種、計338尾を調査した結果、ヒガンフグ、クサフグ、コモンフグ、ショウサイフグに*Psettarium*属血管内吸虫の寄生を確認した。虫体が得られなかったショウサイフ

グを除く3種のフグでは、魚種ごとに寄生種は異なり、中国や若狭湾産のトラフグ寄生種とも異なった。寄生率は調査地点ごとに大きく異なった。トラフグ、ヒガンフグ、クサフグ種苗を2007年7月から12月まで香川県において網生け簀で飼育し、その間に4回、各魚種それぞれ42尾を採材したが、血管内吸虫の寄生は確認できなかった。

## 13. ブリの再興感染症（ノカルジア症）に関する研究

大分県農林水産研究センター水産試験場

近年のノカルジア症の増加要因として、飼育魚の体表損傷機会の増加と修復機能の低下が関与しているとの疑いがもたれたことから、本症の感染助長要因の検討、体表の強化を目的とした飼料添加物による抗病性向上の検討を行った。また、養殖環境における原因細菌の分布調査による感染機会の多寡の評価とあわせて、飼育管理技術の改良によって本症被害の低減を図ることを目的とした。その結果、体表の損傷は本症の感染助長要因となることが示され、また、ハダムシの寄生も本症感染を助長することから、本症を防ぐ上で寄生虫対策も重要であると考えられる。飼料の面からは、安易な魚粉含量の低下は、飼育魚の体表修復機能を低下させ、本症感染のリスクを高める恐れがあると考えられる。また、低魚粉飼料を給餌しても、V. C、パントテン酸を強化すれば、体表修復機能を維持・充進することで、本症感染をある程度予防できる可能性が実験的に示された。

## 14. 魚類病原性ウイルスの防除技術に関する研究

広島県立総合技術研究所水産海洋技術センター

種苗生産過程でのウイルス病発生を防除するために、ヒラメ仔魚に発生する表皮増生症をモデルとした技術開発を行った。原因ウイルスの定量PCR系を用いて罹患魚のウイルス量の経時的検討を行い、感染から90日後までは $10^{10}$  copies/尾を保有していること、その後ウイルス量は急減し、180日後には検出限界以下となることを明らかにした。水中のカオリンがウイルスを吸着する量を調べるため、感染実験を行ったところ、カオリン1.6 g/L以上で疾病の発生が抑制された。また、カオリン量が0.8 g/L、原因ウイルスの量が $10^{43}$  copies/mLの時に50%の確率で感染が成立した（カオリン非投入の場合は $10^{32}$  copies/mL）。さらに、ウイルス吸着能がある吸着体の表面電位（ゼータ電位）は負に帯電していることを明らかにした。

## 15. アユ冷水病の高度診断技術等に関する研究

### 群馬県水産試験場

昨年度に引き続き、*Bsp119I*を用いたPCR-RFLP法による冷水病菌株の遺伝子タイピングと、鰓洗浄液等からの*gyrB*（新規法）および*parE*（従来法）を標的としたPCR法による冷水病菌の検出を行った。冷水病菌の新規遺伝子タイピング領域として、トポイソメラーゼⅣのAサブユニット領域（*parC*）を選択し、冷水病菌27株においてその塩基配列を決定した。アマゴ由来の2株に12塩基（4アミノ酸）の挿入配列が見られ、これがアマゴ由来株の特徴的な遺伝子型を示すものと考えられた。冷水病を実験感染させたアユの飼育排水を冷水病菌フリーの藻類が付着した植木鉢にかけ流して、冷水病発生河川の付着藻類の状況を実験的に再現した。その結果、従来のPCR法によって付着藻類から冷水病菌を検出することができた。

## 16. サケ科魚類冷水病の垂直感染防除に関する研究

### 宮城県内水面水産試験場

13道県のサケ科魚類7種（ニジマス、ヤマメ、イワナ、アマゴ、ギンザケ、ヒメマス、シロサケ）、35ロット、2,687尾の体腔液と精液から、冷水病菌の分離を試みた結果、9道県、20ロット、411尾が陽性で、体腔液中の生菌数が $10^{7.7}$  CFU/mLの個体もみられた。一方、輸入ギンザケ卵内から冷水病菌が分離（180粒中4粒）されたが、5種の国産卵（未受精卵660粒、発眼卵1,380粒）はすべて陰性で、前年に保菌親魚から生産した稚魚を追跡調査したが、垂直感染は確認されなかった。実験的には、媒精前に卵表面の冷水病菌をヨード剤（50ppm）で消毒し、媒精後に200ppm以下の濃度のヨード剤で吸水する方法により、卵内感染を防除することが可能であった。

## 17. サケ科魚類の未侵入病原体に関する調査

### 宮城県内水面水産試験場

特定疾病に指定されているサケ科魚類のピシリケッチア症とレッドマウス病が宮城県内に未侵入であるか否かを明らかにする目的で、2007年3～12月にピシリケッチア症を対象に海面養殖ギンザケ（正常遊泳魚3ロット180尾、病魚24ロット、200尾）を、レッドマウス病を対象に内水面養魚場で養殖されているニジマス等のサケ科魚類（正常遊泳魚12ロット720尾、病魚37ロット501尾）をそれぞれ培養法およびPCR法を用いて検査した。その結果、いずれの個体からも両疾病の病原体は確認されなかったことから、未侵入であると判断された。

## 18. クルマエビ類の特定疾病に関する疫学的調査

### 水産大学校生物生産学科

持続的養殖生産確保法において、特定疾病に指定されたエビ類の重大疾病の原因ウイルスが、輸入冷凍エビから生活排水等を介して、養殖クルマエビや天然資源に伝播することが懸念されている。そのため、クルマエビが養殖されている3県のスーパーマーケットの輸入冷凍エビ、生活排水が流入する河川の野生甲殻類および養殖クルマエビについて、WSV、IHHNV、YHV、TSVの保有状況をPCR法によって調べた。その結果、輸入冷凍エビ580尾の35.9%からWSVが、11.0%からIHHNVが、また5.5%からYHVが検出されたが、TSVは検出されなかった。また、野生甲殻類および養殖クルマエビの、それぞれ14.6、11.0%からWSVのみが検出された。