

## 要 約

### 1. 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

実験感染における冷水病菌の卵内への侵入条件、養魚場の親魚や発眼卵における冷水病菌の汚染状況を調査した。その結果、 $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL以上の菌濃度で人為的に表面を汚染した未受精卵を定法により受精・吸水させることで卵内感染が成立した。その後、卵内の菌濃度は経時的に増加したが、発眼率は低下しなかった。5施設のサケ科魚類5種、合計8ロットの親魚はいずれも冷水病菌を保菌（検出率48%）し、体腔液中の生菌数が $10^7$  CFU/mL以上の個体もみられた。分離した378株の遺伝子型はBR型かBS型で、両者の割合は魚種によって明確に異なった。サケ科魚類5種の発眼卵、約2,200粒の卵内からは冷水病菌は分離されなかった。

### 2. 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

昨年度開発した*gyrB*を標的とした新規冷水病菌特異的プライマーと従来の*parE*領域を標的としたプライマーによる検出感度の比較、およびアユ鰓洗浄液等を用いた冷水病菌のPCR保菌診断を行った。新規の*gyrB*プライマーは、従来の*parE*プライマーに比べて感度が劣ったが、アユ鰓洗浄液等からの冷水病菌検出結果はほぼ一致した。付着藻類から両プライマーを用いて冷水病菌をPCR検出した結果は、全て陰性であった。また、*gyrB*プライマーによ

るPCR産物と制限酵素*Bsp119I*を用いたPCR-RFLPタイピング法を開発し、分離冷水病菌120株に応用した結果、宿主魚と相関がある遺伝子型を確認することができた。

### 3. アユの冷水病ワクチン等に関する研究

三重大学大学院生物資源学研究所

アユ冷水病対策用ワクチンとして、リポソームワクチンの経口投与による免疫賦与効果を検討した。その結果、ワクチン注射区と比較してリポソームワクチンの体重換算投与区では、有効性は認められなかった。しかし、リポソームワクチンの尾数換算投与区では低いがある程度の有効性が見られた。また、病理組織学的検討において、後者の一部の病魚の感染病巣にマクロファージと思われる炎症細胞の顕著な浸潤が観察され、リポソームワクチン経口投与が免疫賦与に貢献したと判断された。

また、冷水病菌包埋油球ワクチンの改良を行い、経口投与による免疫賦与効果を検討した結果、改良大型油球ワクチンの経口投与では、注射ワクチンより低いものの有意な感染防御効果が得られた。病理組織学的検討において、一部の病魚の感染病巣にマクロファージと思われる炎症細胞の顕著な浸潤が観察され、油球ワクチン経口投与が免疫賦与に貢献したと判断された。

#### 4. アユの冷水病ワクチン等に関する研究

広島県立水産海洋技術センター

リポソームワクチンの経口投与および水溶性アジュバントを添加した浸漬ワクチンの有効性を検討した。リポソームワクチンを配合飼料に混ぜてアユに5日間経口投与し、感染実験を行った結果、小型のアユでは死亡がやや遅れる傾向が見られたものの、ワクチンの有効性は確認されなかった。3種類の水溶性アジュバントIMS1112、1312、2212の浸漬毒性を検討した結果、何れのアジュバントもアユに対する毒性が強かった。比較的毒性の低いIMS2212を用いて免疫試験を行った結果、浸漬ワクチンの有効性がやや高まる傾向は見られたものの、ホルマリン不活化ワクチンを1/2に希釈して5分間浸漬させる方法よりも有効性は低かった。

#### 5. 魚類病原ウイルスの防除技術に関する研究

広島県立水産海洋技術センター

ヒラメのウイルス性表皮増生症の防除のために、定量PCR検出系を開発した。これを利用して病魚のウイルス(FHV)保有量、排出量等について検討した結果、病魚1尾は $10^9 \sim 10^{10}$ copiesを保有しており、 $10^7 \sim 10^8$ copies/尾/hを排出していることがわかった。FHVは海水中に8時間静置した場合、感染性を失い、ポピドンヨード20ppm・10分以上の処理で不活化された。活性炭やカオリンをFHV液と混在させた場合、ウイルスの吸着が起り、ヒラメへの感染は成立しなかった。同様に海藻から抽出されたフコイダンを用いた場合にも感染阻止効果が見られたことから、フコイダンはFHVと結合することで感染性を消失させていると考えられた。また、フコイダンはNNVやOMVに対しても感染

阻止効果を示した。

#### 6. 養殖ブリの不明病に関する研究

東京海洋大学海洋科学部

宇和海を中心として養殖ブリ*Seriola quinqueradiata*に原因不明の大量死が発生している。この不明病の病魚サンプルを宇和海および他の海域から得て、病理組織学的に検討した。その結果、脊髓中央部に空胞化を伴う神経細胞の壊死、神経細胞食現象、グリア結節、出血とうっ血、神経線維の脱髄と強好酸性膨化、断裂などがみられた。その部位をさらに精査したところ、直径4~5 $\mu$ m程度の大きさで1~2個の核様構造を持つ細胞が多数みられる寄生虫のシスト様構造物が認められた。脊髓の激的な病変と脳や他の感覚器系にも広がる病変のため、魚は一時的に突進などの異常行動を示すが、やがて全ての感覚を失って餌を摂れず、衰弱して死亡するものと考えられた。この脊髓の激的な病変と脳や他の感覚器系にも広がる病変を引き起こす原因として、脊髓に認められた寄生虫のシスト様構造物が最も疑わしい。

#### 7. 養殖ブリの不明病に関する研究

愛媛県魚病指導センター

愛媛県の養殖ブリでは、肥満度の低下、異常遊泳、吻端部・鰭基部のスレや発赤、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(以下不明病という)が発生し、被害地域が拡大傾向にあることから問題となっている。このため、疫学調査により不明病発生と漁場環境、飼育管理方法等との関連性を調べるとともに、病魚からの病原体検査、感染実験ならびに関連課題の東京海洋大学の病理組織学的研究と併せ

て、本病が感染症であるか否かを含め、本病の原因について検討した。不明病は、宇和海のほぼ全域のブリ稚魚養殖海域で、水温が22℃～28℃の高水温期に発生がみられた。不明病の発生原因の解明には至っていないが、その発生と種苗の由来に強い関連性がみられ、ブリ稚魚の餌付け育成期間に、特定の海域で何らかの病原体に感染している可能性が示唆された。

#### 8. 養殖ブリの再興感染症（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

養殖ブリのノカルジア症実験感染における、物理的な体表損傷の影響を調べた。魚粉含量を低下させた飼料の給餌、または餌料添加物（ビタミンC、パントテン酸）を投与したブリの体表損傷後の修復過程を病理組織学的に検討した。また、養殖漁場における原因細菌の分布調査を行った。感染実験により、損傷区の死亡率が有意に高くなり、体表損傷が感染助長要因であることが示された。組織観察の結果、魚粉含量低下により修復の遅延傾向が、餌料添加物の投与により修復促進傾向がみられた。養殖漁場の底泥を採取し、培養法とLAMP法により原因細菌の検出を行った結果、LAMP法により8月の試料で*Nocardia seriolae* 遺伝子が検出された。

#### 9. 養殖カンパチの新興感染症（仮称：新型レンサ球菌症）に関する研究

鹿児島県水産技術開発センター

2002年の夏季以降、南九州、四国海域の養殖ブリ、カンパチに $\alpha$ 溶血性レンサ球菌症と症状が酷似した新型レンサ球菌症の発生がみられ

た。原因菌はLancefield C型血清に反応を示すレンサ球菌*Streptococcus dysgalactiae*に分類された。病魚は、尾柄部の潰瘍が顕著で、眼球突出を呈する魚は少なく、脳組織内からの原因菌の確認は困難であった。魚類から分離された*S. dysgalactiae*は、塩基配列等において畜産由来菌株とは明確に異なり、新たに開発したPCR法では魚類由来菌株のみを確認することが可能であった。また、国内の魚類由来菌株間の遺伝子型には多様性があり、海域によって分化している可能性も示唆された。原因菌はEM、LCM、ABPCに感受性であったが、OTCには大半が耐性で、従来の $\alpha$ 溶血性レンサ球菌症原因菌と異なった。鹿児島県では、 $\alpha$ 溶血性レンサ球菌症用のワクチンが普及しており、薬剤使用量も2002年までは減少していたが、2003年以降、新型レンサ球菌症の発生に伴う薬剤の使用量が増加している。

#### 10. 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

1993年に若狭湾の蓄養トラフグに発生した血管内吸虫症と、2005年以降、中国産種苗を用いた養殖トラフグに発生している同症の原因寄生虫は、形態学的特徴から別種と判断された。便宜上、蓄養トラフグ寄生種を*Psettarium* sp. TPJ、中国産種苗由来種を*P. sp.* TPCとした。また、前年度に由来の異なる3群のトラフグから採集した吸虫のrDNA遺伝子ITS2領域の塩基配列は完全に一致したことから、中国産種苗由来の血管内吸虫は遺伝子によっても同一種と判断した。2006年10月、中国大連と寧徳において養殖トラフグの寄生虫検査を実施した。いずれの地点においても*P. sp.* TPCに同定する血管内吸虫の寄生がみられた。寧徳において

はフタツボシフグも検査したが、寄生はみられなかった。国内においては、主要5県で養殖されていたトラフグを調査したが、計128尾のいずれも血管内吸虫の寄生は認められなかった。一方、天然ヒガンフグとクサフグからはトラフグ寄生種とは別種の血管内吸虫が採集された。

## 11. 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、リゾチームは殺菌因子として機能する。一方、消化酵素としても機能しており、生体防御の役割は二次的だとの考えもある。マガキとムラサキイガイのリゾチーム活性の季節変動と体内分布について調べ、その役割を考察した。

宮城県女川湾のマガキとムラサキイガイを材料として、2005年5月から2006年5月まで毎月外套膜と消化盲嚢のリゾチーム活性を測定した。反応は25℃と37℃で行い、活性の高さを比較した。その結果、ムラサキイガイのリゾチーム活性は非常に高く、マガキの36~100倍であった。両種の活性とも大きな季節変動を示したが、その動態はマガキとムラサキイガイでは異なっていた。また、2つの反応温度による活性の違いが認められ、ムラサキイガイでは25℃の方が高い値を示した。

## 12. 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

国内のアサリには、*Perkinsus olseni*が高率に寄生している。この原虫は、ヨーロッパや極東のアサリ類で死亡原因になっていると懸念されていることから、本研究では、本虫のアサリへの影響を評価するため、天然アサリにお

ける感染の季節性や肥満度と寄生強度の関係を調査するとともに、本虫の寄生がアサリの生理に及ぼす影響を実験的に調べた。また、本虫の感染実験法を確立し、アサリ稚貝および国産アワビ類4種への攻撃試験も行った。その結果、本虫がアサリ成貝の生残や肥満度、ならびに生理へ与える影響は限定的であったが、感染実験では、稚貝に高率の死亡を引き起こし、アサリ稚貝の斃死原因となっている可能性が示唆された。また、国産アワビ類に対しても感染は成立したが、感染強度は極めて小さく、アワビ類の生残に影響する可能性は低いと思われた。

## 13. アワビのパーキンサス原虫の診断手法に関する研究

京都府立海洋センター

アワビ類のパーキンサス原虫 (*Perkinsus olseni*) のPCR検査では、非特異反応により診断が困難なため、特異性の高い診断手法の開発を目的とした。

パーキンサス原虫のPCR法に関する文献からプライマーセット10種をリストアップし、その性能比較を行って2種のプライマーセットを選定した。それを用いて、クロアワビ腹足筋肉組織にアサリ由来パーキンサス原虫の前遊走子嚢を混入させ、DNAを抽出したサンプルのPCR試験を行った。2種のプライマーセットのうち1種 (Pat 76, Pat 605r) はパーキンサス由来DNAの検出が可能であったが、確実性に乏しかったため、このプライマーセットを用いたNested PCRを試みた。First PCRには2種のプライマーを併用して比較した結果、PKitsによるFirst PCRとの組み合わせが最良であった。このNested PCRにより、アワビ類のパーキンサス原虫の特異的、かつ確実な検出が可能となった。