

# 要 約

## アコヤ貝の大量斃死に関する病理学的原因究明及びその防除法に関する研究 愛媛県水産試験場

- 1) 病貝血球をPBSを用いて処理すると病原性が消失するが、滅菌海水を用いて処理を行えば病原性が維持された。また、病貝血リンパ上清に等量のPBSを添加することで病原性が消失した。
- 2) ポアサイズの異なるフィルターを用いて病原体サイズの検討を行った結果、0.45  $\mu$  mのフィルターは通過するが0.22  $\mu$  mのフィルターは通過しなかった。
- 3) 病貝血リンパ上清の超高遠心分離による分画について病原性の検討を行った結果、沈査、30%シュクロロクッション沈査に病原性が認められた。
- 4) 無病地区から感染地区への月別移動試験を行った結果、2月～5月に移動した区は、8月に、6.7月に移動した区は9月に、8月に移動した区は10月に赤変化が確認された。
- 5) 4) のことから、5月区入時以前の22℃以下の水温では、赤変化発生の要因が欠如していると考えられた。

(P3～17)

## 養殖アコヤ貝の大量斃死に関する病理学的研究 長崎大学水産部

蒲江漁場で1998年から2年間にわたってアコヤガイの飼育実験を行い、経年的な斃死状況について検討した。蒲江では年2回(夏期と秋～初冬)大量死が発生し、供試貝はある期間順調に成長した後死亡した。越冬母貝では移入母貝と比較して赤変化の発生時期が早く、かつ長時間続いた。死亡率は貝の由来(系統)に強く依存し、年齢にはほとんど依存しないと推定された。以上の結果から、アコヤガイの大量死は漁場環境条件と貝の生理的適応能力に密接に関係していることが示唆された。

(P27～35)

## トラフグのやせ症に関する研究

### 宮崎県水産試験場

- 1 「やせ症」トラフグの腸管内にみられる粘液胞子虫には *Myxidium* sp.1, *Myxidium* sp.2, *Leptotheca* sp. (= *Ceratomyxa* sp.) の3種がいることが明らかとなり、このうち *Myxidium* sp.1 は粘膜上皮組織表面に、残りの2種は粘膜上皮組織中に寄生することが明らかとなった。
- 2 陸上種苗生産施設からトラフグ稚魚を直接陸上施設へ移行後、17ヶ月間継続飼育した結果、「やせ症」の原因と考えられる粘液胞子虫類の寄生は認められなかったが、同じ種苗生産施設で生産され、養殖場に搬入された種苗は搬入後感染を受けていることから、これらの粘液胞子虫が養殖場でトラフグ種苗に感染している可能性が強く示された。
- 3 *Myxidium* sp.1 と *Myxidium* sp.2 の経口感染魚と未感染魚との水槽内での同居による感染が成立することが明らかとなり、これらの粘液胞子虫が魚から魚へ水平感染する可能性が示された。また、飼育水槽内での「やせ症」発生の傾向から「やせ症」の発生の水温が関与する可能性が示された。
- 4 標本漁家における「やせ症」の発生状況調査では、疾病の発生が11月頃からみられはじめ、1月頃をピークに、2・3月には発症魚が減少する傾向がみられた。「やせ症」発症魚の腸管には、*Myxidium* sp.1, *Myxidium* sp.2 の栄養体及び *Leptotheca* sp. の胞子及び栄養体がいずれも頻りに観察された。
- 5 試験飼育と養殖場で「やせ症」の発生時期にズレが生じる結果となったが、これについては、感染時期や宿主の生理状態、あるいは粘液胞子虫の増殖速度等の要因が考えられるが現在のところ不明である。
- 6 「やせ症」の発生には *Myxidium* 属の2種のうち、粘膜上皮組織中に寄生する *Myxidium* sp.2 が強く関与する可能性が示された。このこと等から、粘膜上皮組織中に寄生する *Leptotheca* sp. についても、「やせ症」の発生に関与することが推察された。

(P47～57)

## 養殖ブリにおけるワクチンの効果を抑制する要因に関する研究 大分県水産研究センター

ワクチンの有効な利用方法を普及することを目的に、その効果を抑制する要因について本年度は飼料の代替タンパク質・代替油脂源の影響について検討した。

大豆粕やしょうゆ油等の代替原料を配合し魚粉量を35-40%に削減し、魚油添加量を40-50%削減した代替飼料を製しブリ0才魚の飼育を行い、飼育成績や血液性状を測定するとともに、養成魚の免疫機能や抗病性について抗体産生能、白血球機能検査および感染実験から検討した。飼育成績、養成魚の血液性状および抗体産生能において、代替飼料は魚粉・魚油飼料に比べ大きな違いはみられなかったが、白血球機能検査では代替油脂添加飼料の食能やPK活性が魚油単独飼料に比べ高い傾向があった。感染試験では代替油脂添加飼料の生残率が高く、魚粉量35%の代替タンパク飼料の生残率が低い傾向がみられた。

以上のことから、少なくとも魚粉量40%までの代替タンパク、魚油削減率50%程度までの代替油脂の利用は、ワクチンの効果を抑制するものではないことが推察された。

(P71～79)

## 養殖アコヤガイの大量へい死に関する病理学的研究

### 大分県水産研究センター

今年度の感染実験は病原体のサイズ推定および冷凍凍結期間による病原体の感染能力について実施した。またこれまで3カ年の成果をとりまとめ、今後の対策について検討した。フィルター孔径別の感染実験から、ろ過性病原体の可能性が高く、かなり小さな病原体ではないかと推察された。冷凍凍結期間による病原体の感染能力については明確にできなかった。本症病原体はろ過性であることが示唆されており、また、冷凍凍結で病原体の感染性が失われないことからウイルスが疑われている。現時点の対策として、病貝の廃棄、持込、移動の禁止等感染症対策があげられる。また、この疾病は水温依存性が高く、低水温海域へ養殖場を移動することも対策として考えられる。将来的には対症療法的な対策、疾病に強い貝の生産も現場から望まれおり、その成果がまたれる。

(P19～26)

## クロアワビ筋萎縮症の防除技術の開発と診断技術の研究

### 京都府立海洋センター

原因体の特定が未だできていない、クロアワビ筋萎縮症の診断手法の開発には原因体の特定が不可欠である。そこで、原因体の絞り込みに必要な知見を得るため、病貝の磨砕濾液をクロアワビ血球細胞の初代培養に接種し、得られたCPE(+)細胞を健常貝に筋注することにより、本症の再現ができるかどうか検討した。その結果、CPE(+)細胞の接種により、10個体中1個体で再現できた。しかし、陽性対照区で10個体中2個体でしか感染せず、人為感染実験がうまく成立したとは言えなかったため、原因体の絞り込みはできなかった。本症の防除技術の開発では、従来からの受精卵の丁寧な洗浄法に加え、紫外線殺菌海水による一貫したクロアワビ種苗の試験生産を実施した。現在育成を継続中であり、試験結果は平成12年5～6月に出る予定である。

(P37～44)

## アマミクドア症に関する研究

### 沖縄県水産試験場

沖縄県内におけるアマミクドア症の発生状況を調査し、本部海域が他の海域に比べて有意に高い陽性率で、プリとカンバチでそれぞれ100と30%であった。本部の月別飼育試験では周年に渡り3～90%程度の陽性率であり、特に9～10月に高い傾向が見られたが、年変動も認められた。また運天原、今帰仁、糸満、安室島、および知念で1～9%の陽性例が年により見られた。陽性率の低い海域でも1個体当たりの寄生強度に高い例が見られた。*Kudoa amamiensis* は魚体内に侵入してから2～3ヶ月後に径0.1mm程度のシストを形成する。*Kudoa iwatai* も各海域で時々散発的に観察されたが、いずれの例でも寄生強度(シスト数/筋肉重量g)は低かった。

(P61～67)

## PAVの予防対策技術開発研究

### 山口県水産研究センター内海研究部

クルマエビ養殖池内で採集されたカニ類、および瀬戸内海産小型エビ類のキシエビ、トラエビ、アカエビおよびサルエビについてPCR法によりPRDVの検出を行った。カニ類からはPRDVは検出されなかった。小型エビ類のPRDV保有率は、キシエビ0.7%、トラエビ1.9%およびアカエビ5.9%であった。PCR陽性個体のクルマエビに対する病原性は経口法では認められなかったが、アカエビの磨砕濾液の筋注により死亡した個体は1ステップで陽性、実験終了時の生残個体の1尾は2ステップで陽性の結果を示した。

(P83～90)

#### 天然海域におけるクルマエビPRDV保有状況の把握に関する研究

##### 静岡県水産試験場浜名湖分場

浜名湖内の2ヶ所に水揚げされる天然クルマエビのPRDV保有状況を月別に調査した。6月及び7月にはPRDVは検出されなかったが、8月には3%検出された。9月には検出率は42%に増加し、その影響が懸念されたが、10月には6%に減少し、11月には4%と例年並になった。PRDVの検出率増加に先立ち、6月末から8月末にかけて、浜名湖周辺のクルマエビ養殖場や種苗生産施設でPAVが発生し、大きな被害がでていた。養殖場に近い調査地点で検出率が高かったことや、種苗生産施設では平成7年から毎年PAVが発生しているが、浜名湖内のクルマエビのウイルス保有状況に影響を与えた事がないことから、9月の検出率の増加は養殖場でのPAVの影響であると考えられた。浜名湖内のクマエビ、ヨシエビ、ユビナガスジエビ、イシガニ、ガザミ及び養殖場に生息するアシハラガニについてPRDV保有状況を調査したところ、ユビナガスジエビ、イシガニ及びアシハラガニから検出された。

(P91～99)

#### アユ冷水病、特にその病原菌 *Cytophaga psychrophila* に関する研究

##### 広島県水産試験場淡水魚工場

1. 冷水病の自然発病魚を用いた同居感染、飼育排水による感染は容易に成立し、同居、飼育排水による実験感染系の確立は可能であると考えられた。
2. 注射による人為感染病魚からの排菌量は20℃より10℃の方が1オーダー多く、最大  $5.4 \times 10^6$  cfu/fish/min であった。
3. 排出菌量は死亡時には多量の菌が排出されるが、経過時間とともに減少した。
4. 自然発病魚からの排菌量、自然発病魚による同居感染試験の排水中の菌量はほとんど検出限界以下であった。最大は  $1.4 \times 10^4$  cfu/fish/min であった。測定した排菌量と同居感染の成立との関連は明らかではなかった。
5. 培養菌の注射法による感染試験ではワクチン有効率 (RPS60) はアジュバンド添加ワクチンが高く50%であった。
6. 自然発病条件では有効率は28.6%であった。
7. 自然発病魚の飼育排水による感染試験では有効率は50%であった。
8. 培地による病原性の違いは明らかでなかった。

(P115～130)

#### アユ冷水病に対する治療技術に関する研究

##### 滋賀県水産試験場

アユ冷水病は養殖場で多発し、深刻な被害を出しているほか、河川放流後に発病することもあり、アユ養殖業のみならず我が国内水面漁業振興上、最も緊急かつ重要な問題となっている。本研究では再発防止を念頭に置き、アユ冷水病に対する治療技術の確立を目指すことを目的とした。昨年度は、アユ種苗の健全化を図るため、アユに対して化学療法剤や食塩による薬浴を行い、一部の薬浴処理、すなわち、1%食塩+スルフィンゾール (以下、SIZと示す)、400ppmの2日間浴や1%食塩の5日間浴で試験期間中に冷水病の発生がみられないといった有効な例が認められた。しかし、上記の薬浴では処理中に1%食塩の影響と考えられる急激なへい死が発生した。そのため、本年度はそのへい死を緩和するとともに、より効果を高めることを目的に、昨年度の薬浴処理に改良を加えた条件で薬浴試験を行い、どの程度の治療効果があるか検討を行った。また、治療研究の基礎資料を得るため、魚体各部位における冷水病原因菌の動態や水平感染試験における感染状況についても検討を行った。

その結果、薬浴試験については、全ての実験区において薬浴期間中、処理に伴うへい死は発生せず、NaClの影響と考えられる急性毒性の緩和の目的は達成されたものと思われた。しかし、今回最も有効と考えられたNaClとSIZを添加した実験区では冷水病発症に対する遅延効果は認められたものの、薬浴終了後、短期間のうちに冷水病が発生し、十分な治療効果は認められなかった。

魚体各部位における冷水病原因菌の動態については、内臓諸器官の冷水病原因菌の分離率は感染初期には低かったが、冷水病による日間死亡率が上昇するにつれて、その分離率は上昇した。

水平感染試験における感染状況においては、冷水病の経験のない魚群のアユに対して、冷水病が水平感染しやすいことが示唆される、一方、冷水病の重篤な経験をした魚群の生き残ったアユに対しては、冷水病が水平感染しにくいことが示唆された。冷水病経験魚が、水平感染しにくかった原因としては、自然免疫、または、冷水病を一度経験したことによる獲得免疫等、様々な要因が考えられるが、その詳細は不明である。

(P139～148)

#### PAV検査におけるPCR診断に関する手法等の改良に関する研究

##### 愛知県水産試験場漁業生産研究所

近年、クルマエビ急性ウイルス血症 (PAV) は養殖業、栽培漁業に大きな被害を与えている。今回、この原因ウイルスPRDVのPCR検査法の改良を行った。

DNA抽出法として、フェノール抽出法とカラム抽出法の比較検討を行った。血リンパと稚エビ頭胸部を材料として行った場合、いずれもカラム抽出法が高い検出率を示し、また抽出にかかる時間も血リンパの場合1時間45分、稚エビ頭胸部の場合も1時間15分カラム抽出法が短く、抽出法としてカラム抽出法が有効であることが示された。

PRDV特異的配列の増幅法については、増幅装置、増幅酵素、増幅プログラムによる感度の相異はみられなかったため、それぞれの検査機関の状況にあわせてこれらを選択するのが望ましいと考えられた。

(P101～111)

#### アユの冷水病、特に *Flavobacterium psychrophilum* に関する研究

##### 群馬県水産試験場

*Flavobacterium psychrophilum* を病原体とするアユの冷水病の、ワクチンによる予防を目標に、注射法によるワクチン接種の効果を検討した。その結果、特に2種類のオイルアジュバンドを添加した区で、それぞれ有効率76および100%の高い効果が認められた。また、浸漬法によるワクチン接種の予備試験も併せて行い、有効な結果が得られた。

加えて、河川における冷水病の感染経路を明らかにする目的で、1河川においてアユおよび他魚種の定期的な保菌調査を行った。サンプル数の不足から感染源を明らかにすることはできなかったが、アユ漁解禁前にアユの保菌が確認された。

(P131～140)

#### 天然水域のアユ冷水病に関する研究

##### 新潟県内水面水産試験場

放流種苗の保菌状況を把握する目的で調査した結果、人工産・琵琶湖産種苗とも保菌魚であった。またそれらを河川放流後の追跡調査を行った結果、放流後2週間では斃死魚や弱魚がみられ、患部から冷水病原因菌が検出された。保菌検査の結果から天然遡上産アユの河川生活期における稚魚、成魚、親魚、卵、仔魚の各发育段階全てで原因菌が検出された。また、環境としての餌料生物である付着藻類、河川水から低水温期にPCR法により原因菌が検出された。

(P149～157)

## アユ冷水病防除技術開発と診断手法の研究

神奈川県水産総合研究所内水面試験場

アユ冷水病ワクチンの早期実用化を目的として、冷水病防除技術開発および診断技術研究を実施した。

(浸漬ワクチン試験)

投与後、最短で59日間、最長で116日間冷水病の発生を抑えることができた。累積へい死亡率では、1回処理区の90.8%に対し、2回処理区および3回処理区でそれぞれ、26.7%、56.2%と低くなった。血中抗体価はいずれの区も0であった。

(注射ワクチン試験)

稚魚に対する試験では、ワクチン区で延命効果が認められた。RPS60の有効率は不活化ワクチン区25%、アジュバント711添加区50%、アジュバント763A添加区58%となり、アジュバント添加ワクチン区で有効率が上昇した。血中抗体価は、無処理区および不活化ワクチン区はいずれ0であったが、アジュバント711添加区で平均3.2、アジュバント763添加区で平均12の血中抗体価が認められた。

親魚に対する試験では、浸漬処理後、アジュバント763A添加注射ワクチンを実施した場合、冷水病の発生は認められなかった。血中抗体価は0であった。一方、浸漬履歴のないアユにアジュバント763A添加注射ワクチンを実施した場合、同様に、冷水病の発生は認められなかったが、血中抗体価は平均で5.6で、免疫を獲得していた。

(攻撃方法の検討)

2日間培養菌液に比べ、4日間培養菌液のほうで攻撃性が高まった。また、水温20℃飼育に比べ、13℃飼育のほうで攻撃性が高まった。

(消毒剤の検討)

塩化ベンザルコニウム溶液0.1%、エタノール70%、次亜塩素酸ナトリウム溶液600ppmは30秒間で効果があった。

(診断手法の検討)

混合感染の病原体の出現率は、シュードモナス菌、エロモナス菌および連鎖球菌の合計で50%となった。混合感染の場合、外部症状のみから判断することは困難であると考えられた。内部症状が肝臓の貧血のみの場合、口の欠損等特徴的な外部症状と併せて判断できる可能性があるが、肝臓の貧血以外の症状がみられる場合は、内臓、鰓および患部からの菌分離、免疫学的手法等による正確な診断が必要と考えられた。

(P159～171)

## ヒラメのネオヘテロボツリウム症および貧血症の対策研究

鳥取県水産試験場栽培増殖部

ネオヘテロボツリウム症とヒラメ貧血症について次の検討をおこなった。(1)10ヶ月齢でネオヘテロボツリウム症が発生した魚群を経過観察した。病魚の斃死は、発症月に集中し、4ヶ月以内に終息した。貧血症は、発症から6ヶ月後まで飼育魚すべてにみられたが、7ヶ月目以降には消失した。ネオヘテロボツリウムの寄生頻度と寄生数は、8ヶ月間高値を維持した。貧血ヒラメ由来ウイルスについても調査した。(2)ネオヘテロボツリウムの保存飼育が完全循環飼育装置で可能であった。(3)濃食塩水浴によって1歳魚の駆虫を実現し、予防的な駆虫方法も検討した。(4)ヒラメ貧血症の耐過魚と推定される親魚から種苗生産実験を開始した。

(P185～196)

## ヒラメの貧血症に関する研究

北海道立中央水産試験場

平成11年6月から11月にかけて天然魚と人工種苗由来魚のヒラメについて北海道内のA、B、C、D、Eの5地点から鮮魚683尾および活魚43尾の計726尾を採取し、「ヒラメ貧血症」の有無について調べた。鮮魚では鰓の色とネオヘテロボツリウム *Neoheterobothrium hirame* sp. nov.の有無について、活魚ではさらに「適過性病原体」に対する抗血清による蛍光抗体法、末梢血液のヘマトクリット値および赤血球の形態と染色性について調べた。その結果、現時点で「ヒラメ貧血症」と診断された個体はなかった。すなわち、活魚で調べた43尾中A地点の3尾ではヘマトクリット他が12%から15%と低かったが鰓の色と赤血球の形態および染色性に異常は認められなかった。鮮魚の683尾でも調べた項目で異常はみられなかった。また、蛍光抗体法による観察では一部の白血球で偽陽性反応がみられたが、赤血球に反応はみられなかった。ネオヘテロボツリウムはA地点の活魚9尾でみられた。これら9尾のうち2尾ではヘマトクリット値の低下が(それぞれ12%)みられたが、他の調査項目で異常は認められなかった。ネオヘテロボツリウムがみられた個体で「ヒラメ貧血症」の症状が見られず検査項目でも異常がみられなかったことは、発症原因として「適過性病原体」やネオヘテロボツリウムだけでなく他の何らかの要因も関与しているかもしれない。

(P211～218)

## アユの冷水病および細菌性出血性腹水病(シュードモナス病)に関する研究

岐阜県水産試験場

河川水から分離された冷水病原因菌3株は、アユに対して病原性はないものと考えられた。アユ親魚の冷水病と細菌性出血性腹水病原因菌の保菌状況は、冷水病原因菌では、腎臓が♂46.7% (14/30)、♀70% (21/30)、卵表面90% (27/30)、精巣30% (9/30)から分離されたが、細菌性出血性腹水病原因菌はいずれの部位からも分離されなかった。

冷水病原因菌の消毒剤等に対する感受性については、塩化ベンザルコニウム、次亜塩素酸ナトリウム溶液、エタノールおよびイソプロパノールでは常用濃度よりかなり低い濃度で消毒効果が認められた。また、4℃では次亜塩素酸ナトリウム溶液を除き、有効濃度の上昇が認められた。その他の消毒剤等については、アクリノール、メチレンブルー、グルコン酸クロルヘキシジンおよびポビドンヨード製剤が比較的低濃度で有効であった。

細菌性出血性腹水病原因菌の消毒剤等に対する感受性については、塩化ベンザルコニウムと次亜塩素酸ナトリウム溶液では常用濃度よりかなり低い濃度で消毒効果が認められた。その他の消毒剤等については、アクリノール、メチレンブルー、グルコン酸クロルヘキシジン、過マンガン酸カリウムおよびポビドンヨード製剤が比較的低濃度で有効であった。

アユ卵の消毒に関しては、メチレンブルーとポビドンヨード製剤について、一応の安全性が示された。

(P173～184)

## ヒラメの貧血症に関する研究

和歌山県農林水産総合技術センター水産増殖試験場

感染実験の結果から、正常なヒラメにネオヘテロボツリウムが寄生することにより貧血症状が進行し、変形赤血球や幼若赤血球の出現率が増加したり、細胞質の染色性が低下した。また、貧血症に罹ったヒラメから本虫の成虫と仔虫を除去することにより、HtやHbが上昇したり変形赤血球や幼若赤血球の出現率が低下した。以上の結果から、ヒラメの貧血症はネオヘテロボツリウムが関与しているものと考えられる。

県下の3漁協で実施した市場調査の結果から、貧血魚や本虫成虫の寄生したヒラメが広範囲に出現し、また、時期によってこれらのヒラメの割合が非常に高いことが明らかになった。

(P197～210)