

要 約

(1) サケ・マス卵のミズカビ病防除に関する研究

(独) さけ・ます資源管理センター

サケ・マス類の卵に発生するミズカビ病について、サケ卵を対象に検討した。走査型電子顕微鏡により観察した結果、死卵でも形態は死卵発生後長期に維持されるが、表面の微細な構造には差が見られ、これらの変化がミズカビ付着を促進する可能性が示唆された。ふ化用水のCa、Mgイオン濃度とミズカビ病発生に関連について検討したが明確な関連は見られなかった。親魚の成熟までの履歴により死卵の出現率に差が認められ、親魚の催熟蓄養の検討の必要性が示唆された。ミズカビ病との関連が推定される卵膜軟化症の現状把握と発症卵における卵圧や対処方法について検討した。サケ卵における卵圧の変化や卵膜軟化症卵の卵膜表面の変化が明らかになった。

(2) サケ・マス卵のミズカビ病防除に関する研究

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、医薬品を使用しない防除法の確立とマラカイトグリーン(MG)代替薬としての過酸化水素製剤の有効性について検討した。その結果、親魚選別を徹底し、良質卵のみを採卵すること、および吸水後の卵洗浄を十分に行い、余分な精液や潰卵・死卵を除去して収容すること、さらに、ふ化盆を使用するふ化場ではふ化盆への収容密度を90%以下にすること、および毎週1回ずつ死卵を除去することが有効な方法であった。

これら一連の事項を徹底することにより、医薬品を使用しない卵のミズカビ病対策が可能であった。一方、注水量は卵50万粒当たり毎分50Lあれば十分で、ふ化槽の多段式配置による用水の反復利用が発眼率に与える影響も少なかった。さらに、収容1週間後から週2回ずつゆっくりと卵を攪拌しても影響は少ないことが明らかとなった。

過酸化水素製剤については、①900~1200ppm・30分、600ppm・60分の浸漬でミズカビ菌糸の発育を抑制すること、②本剤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、シロサケは弱いこと、③MGほどの顕著な薬効はないものの、イワナ、ギンザケでは900~1200ppm・60分処理で有効性が認められたこと、④薬液循環式により大量の卵の薬浴処理を行った場合、時間経過とともに薬液濃度が低下し、有効性も減少することが明らかとなった。

(3) アユの冷水病ワクチン等に関する研究

福山大学生命工学部

アユにウサギ赤血球膜を結合させた冷水病菌の粗リポ多糖(LPS)あるいはLPS単独で浸漬投与後、またオイルアジュバントを添加したホルマリン不活化菌体(FKC)を腹腔内注射後、実験的感染試験で感染防御効果を調べるとともに、フローサイトメーターで頭腎白血球の貪食能および殺菌能を、また血中抗体価を測定した。

実験的感染試験ではへい死率はFKC区、膜結合LPS区、LPS区、対照区の順で高くなり、有効率はFKC区で高く、膜結合LPS区で低く

なった。頭腎白血球の貪食能は対照区よりも試験区で高く、殺菌能はFKC区、膜結合LPS区、LPS区、対照区の順で低くなった。また、血中抗体価は試験区の間では大きな差異が認められなかった。

(4) アユの冷水病ワクチン等に関する研究 三重大学生物資源学部

冷水病菌のホルマリン死菌懸濁液を洗浄してホルマリンを除去した菌体を抗原とした油球ワクチンとIMSアジュバンド添加油球ワクチンを作成し、徳島県立農林水産総合技術センター水産研究所と神奈川県水産総合研究所内水面試験場において、ワクチンの効果試験を行った。その結果、油球ワクチンとIMSアジュバンド添加油球ワクチンの経口投与区では、一部高生残率がえられたものの、必ずしも有意な効果は認められなかった。しかし、実験魚の病理組織学的観察では、両ワクチン投与区の生残魚はともに、大規模な感染病巣を治癒病巣にかえていた。この所見はワクチン投与がアユの感染防御機構を亢進したことを示しているといえよう。

(5) アユの冷水病ワクチン等に関する研究 長野県水産試験場諏訪支場

抗原のホルマリンを除去した油球経口ワクチンのアユ冷水病に対する有効性を血中凝集抗体価及び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ドワクチンと比較して評価した。油球経口ワクチン区は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。アジュバンドワクチン区は1尾当たり100 μ Lのワクチン液を腹腔内に注射した。油球

経口ワクチン魚に凝集抗体が誘導されたが、アジュバンドワクチン魚に比べ低く、人為感染試験では予防効果は認められなかった。使用された油球経口ワクチンは保存期間が長く、油球が壊れてしまった可能性があり、再評価が必要である。

(6) アユの冷水病ワクチン等に関する研究 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、経口ワクチンおよび浸漬と経口の併用ワクチンの効果向上について、平成14年度から平成16年度の3年間検討を行った。その結果、浸漬ワクチンではワクチン原液と等濃度(10⁸CFU/mL)のホルマリン不活化ワクチンおよび菌体外膜成分ワクチンを検討したが、いずれも効果の向上は認められなかった(H14~15)。経口ワクチンでは、ホルマリン不活化ワクチン(10⁹CFU/mL)内包腸溶性マイクロカプセルを用いた結果、抗体価の上昇が認められた(H14)。さらに、水溶性アジュバンドを添加したワクチンを内包したところ、水溶性アジュバンド添加量の増加に伴い有効率が上昇し、水溶性アジュバンドを80%添加した場合に60.0~80.0%の実用可能な有効率が安定して認められた(H15~16)。水溶性アジュバンドを添加した油球ワクチンにおいては、有効率が高い例および低い例がそれぞれ認められた(H16)。浸漬と経口の併用ワクチンでは、ホルマリン不活化ワクチンの浸漬ワクチン処理後、ワクチン内包腸溶性マイクロカプセルを経口投与したが有効率は低かった(H15)。今後、経口ワクチンの実用化が期待されることから、最少有効投与量、安全性および持続期間等の検討を進める必要がある。

(7) アユの冷水病ワクチン等に関する研究
広島県水産試験場

浸漬ワクチンの有効性を高めるために、プロテアーゼ産生量の増加が報告されているNBF培地と血清添加培地の有効性を検討した結果、両方のワクチンともに従来の方法で作製したワクチンよりも高い有効性が得られた。また、免疫賦活剤である酵母抽出RNAとグルカンの浸漬ワクチン処理前の投与効果を検討した結果、RNAを投与するとワクチンの有効性が高まった。一方、経口ワクチンに関しては油球ワクチンの有効性を検討したが効果は確認されなかった。また、3系統の人工生産アユを用いて浸漬ワクチンの有効性を自然感染試験で検討したが、何れのアユにおいても有意に浸漬ワクチンの有効性が確認され、各系統で同程度の有効率が得られた。

(8) アユの冷水病ワクチン等に関する研究
滋賀県水産試験場

①微量連続注射器を用いたアジュバント(Adj)添加ホルマリン死菌(FKC)注射ワクチン(Adj-FKC)の接種時間の短縮、Adj残留問題の解決、有効性の評価を行った。微量連続注射器は初期状態ではAdj-FKCを排出するには注射器の可動部の摩擦が大きく空撃ち現象が生じたが、メンテナンスにより排出が可能になった。本注射器で10および20 μ L/尾のAdj-FKCを微量接種したところ、20 μ Lで効果が認められた。しかし10 μ L接種でも12週間後までアユ腹腔内にAdjは残留した。ゆえに、微量連続注射器はメンテナンス作業の軽減、ワクチン液は効果、残留の点で改良が必要と考えられる。

②ウサギ赤血球膜(RaRBC)への結合を強

化した冷水病菌体ワクチン(凝集強化ワクチン)、RaRBC結合FKC、RaPBC結合リポ多糖(LPS)のワクチンとしての効果を調べたところ、凝集強化ワクチン、従来RaRBC結合FKCワクチンで有効性が高かった。凝集強化によって効果は上昇できると考えられた。

③冷水病菌体をTween80およびゲラチンを微量含む培地で培養するもしくは通常培養の冷水病菌を酢酸緩衝ホルマリンで固定する水平感染耐過アユ血清中の特異抗体との反応性が上昇した。これらを浸漬ワクチンとして効果を調べたところTween80およびゲラチンを微量含む培地で培養して固定したFKCで有効性が認められた。ゆえに、冷水病水平感染耐過アユ血清との反応性を指標にワクチンを作製すればさらに有効なワクチンが開発できるのではないかと考えられた。

(9) アユ卵の消毒等に関する研究
岐阜県淡水魚研究所

冷水病原因菌(以下、冷水病菌)を対象としたアユ卵消毒方法を開発するため、過酸化水素製剤によるアユ卵消毒の安全性、受精後の消毒時期、卵表面に付着した冷水病菌消毒の有効性及び卵消毒試験方法について検討した結果、アユ卵消毒は受精1時間後に作用濃度・時間2/1000・60分処理を行うことで、効果的且つ安全にアユ卵表面の冷水病菌消毒が可能と考えられた。また、卵消毒試験方法においては付着卵数、付着器材、発眼後の飼育水温について検討を行い、付着卵数を100~150粒、付着器材を罫線入りのスライドガラス、発眼後の飼育水温を15~18 $^{\circ}$ Cの範囲で一定に維持することで円滑な卵消毒試験の実施につながると考えられた。

(10) 養殖ブリの再興感染症（ノカルジア症）に関する研究

鹿児島大学水産学部

【目的】 養殖ブリのノカルジア症の防疫対策として、①疫学情報の収集、②感染初期における投薬治療、③ワクチンの可能性を検討した。

【方法】 ①発生状況をアンケート調査した。②血中抗体の検出と鰓、腎臓中の原因菌を観察し、薬剤治療のために薬剤感受性を調査した。③原因菌の細菌学的な基礎知見を得るため、抗原性と遺伝的多様性を検討した。

【結果】 ①2004年の本症の発生状況は従来と同様であった。②カンパチでは、種苗導入期には血中抗体価が上昇し、鰓に原因菌が確認された。原因菌はフロルフエニコールと硫酸ストレプトマイシンに強い感受性を示した。③原因菌の抗原性は類似していたが、遺伝的に異なった傾向を示す菌株も存在した。

(11) 養殖ブリの再興感染症（ノカルジア症）に関する研究

愛媛県魚病指導センター

本研究では、ブリのノカルジア症の疫学および治療・予防方法について検討を行った。本症は、6月～12月にかけて発生が認められ、10月、11月の水温下降期に多発する傾向が認められた。感染時期は、本症の発病1～2ヶ月前であると抗体価の調査結果から推定された。愛媛県では、ブリ、カンパチ、ヒラメ、シマアジ等の8魚種でノカルジア症の発生が確認された。*N.seriolae*の分離培養には5日間程度時間を要することから迅速診断法の開発が求められている。そこで、PCR法およびLAMP法による*N.seriolae*の検出を試みた結果、LAMP法

の検出時間は45分で、検出感度もPCR法より10倍高いことからLAMP法の有用性が示された。*N.seriolae*の薬剤感受性の動向では、マクロライド系およびLCMの薬剤で耐性菌が確認された。注射法、浸漬法、経口法および経皮法を用いて人為感染手法の検討を行い、臨床病魚に近い症状を呈した手法は、浸漬感染法であった。治療薬および予防法の際の人為感染手法としては、浸漬法が最もよい感染手法であると推察された。治療法の検討では、FFを供試薬剤として試験を行った結果、延命効果は認められたが、完全に治療することは困難であった。予防方法の検討では、FKC、アジュバント添加FKCワクチンおよび感染耐過魚による再感染による有効性の検討を行った。感染耐過魚が最も高い有効性を示し、ノカルジア症のワクチンが開発可能であることが示唆された。

(12) 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

宮崎大学農学部

養殖カンパチにランスフィールドC群レンサ球菌感染症が拡大している。この細菌は、*Streptococcus dysgalactiae*に分類された。ブリ・カンパチを用いた感染試験でも感染魚の尾柄部に壊死病変が再現でき、養殖場で見られる病魚と同様の症状でありこの細菌が病原菌であることを証明した。抗原性、遺伝的に畜産動物由来の*S. dysgalactiae*に類似していたが、パルスフィールド電気泳動による解析の結果、畜産動物由来の菌株とは異なる泳動パターンが認められた。今後、魚類由来菌株の由来について詳しく検討する必要性が示唆された。

(13) 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、 α 溶血性レンサ球菌症と症状が酷似した新たなレンサ球菌症がみられ、原因菌はランスフィールドのC型血清に反応を示す連鎖球菌であることがあきらかにされた。

この病魚は尾柄部の潰瘍が顕著で、眼球の異常はみられず、分離菌はCBB添加の寒天培地で37℃、24時間以上培養すると深青色のコロニーを形成した。また、PCRによる分離細菌DNAの増幅を行った。発生はブリよりカンパチに多く、8月以降の高水温期に多発していたが、最近では周年化の傾向が見られ、鹿児島県内での発生は広域化していた。薬剤感受性試験ではOTC耐性株が多く、従来型の α 溶血性レンサ球菌症原因菌と傾向が異なっていた。

(14) 養殖魚の薬剤吸収・排泄に及ぼす飼育管理技術に関する研究

大分県海洋水産研究センター

パントテン酸添加区、タラ肝油添加区、t-ブチルヒドロペルオキシド (t-BHP) 添加区および対照区の計4区を設定し、OTCを7日間投与後から添加飼料を給餌して、OTCの残留濃度を1, 5, 10, 20, 30, 40日後の計6回調べた。パントテン酸区と対照区はいずれの時点においても残留濃度に差が見られなかった。タラ肝油添加区とt-BHP添加区は30日後にOTCが残留しており、特にt-BHP添加区は対照区と有意差が認められた。このことから過酸化した脂質などの投与により肝機能の低下が引き起こされるとOTCの排泄が遅れる可能性が示唆された。

(15) 医薬品の魚体内濃度推定プログラムの作成に関する研究

九州大学大学院農学研究院

水産用医薬品の効果的使用を計るため、オキシテトラサイクリン (OTC) とオキシリン酸 (OXA) の吸収速度並びに排泄速度定数を文献より調べ、OTC (ニジマス) とOXA (turbot) で得られたパラメーターを用いて体内動態モデルを作成した。またコイ、ウナギ、ブリ、マダイ及びヒラメへのフロルフェニコール (FFC) 投与実験の結果から得られた水温に対する吸収及び排泄速度定数の関係からコイ、ウナギ、ブリ、マダイ及びヒラメの温度変化を考慮した体内濃度推定プログラムを作成することにより、体内濃度の予測が可能となった。シミュレーションを行った結果、連続投与するとニジマス (11℃) でOTCの濃度が、ヒラメ (13℃) でFFCの濃度が上昇することが予測された。

(16) 二枚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

アサリの原虫症に関する基礎的知見を集積することを目的に、平成16年6月から12月の間、瀬戸内海産アサリ計210個体について組織切片の観察とRFTM培地によるパーキンサスの定量的検出を行った。その結果、全てのアサリからパーキンサスの寄生が検出されるとともに、1個体には*Marteilioides* sp.の寄生が認められた。パーキンサスの寄生強度はほぼ一定であったが、11月のみは、寄生強度の有意な低下ならびに寄生強度と肥満度に負の相関が認められた。北海道厚岸産アサリを未感染貝として、飼育水にRFTM培地で培養した感染アサリの鰓を添加することで感染実験に成功した。また、アサリのパーキンサスの培養株を作出した。