

要 約

1. サケ・マス卵のミズカビ病防除に関する研究

独立行政法人 さけ・ます資源管理センター

薬剤を使用しないミズカビ病防止方策の開発を目指して研究を実施した。親魚蓄養条件の卵に与える影響、ふ化用水中のミズカビ遊走子の動態、滅菌サケ卵を用いたミズカビ増殖速度、卵膜軟化症について検討した。サケ親魚の蓄養条件により死卵率が変化することが明らかになった。ふ化用水中の遊走子数は94個/L以下であったが、ふ化槽の排水部では増加すること、ミズカビの滅菌サケ卵での増殖はふ化場により差があること等の水カビ病の疫学的知見を集積した。卵膜軟化症が茶カテキンにより防止できる可能性があることも示された。

2. アユ卵の消毒等に関する研究

岐阜県河川環境研究所

主に冷水病原菌（以下、冷水病菌）を対象としたアユ卵消毒方法の実用化に必要な基礎データの収集を行った。過酸化水素製剤処理に対してアユ卵（湖産系卵、海産系卵）が影響を受けない作用濃度・時間の上限は過酸化水素濃度2700ppm・60分であった。また、受精0.5～6時間後であれば1500ppm・60分の処理においてもアユ卵に影響はなかった。過酸化水素製剤処理に対してアユ卵への過酸化水素の残留は認められなかった。一方、冷水病発病履歴のある親魚由来卵の冷水病菌汚染レベルは最高で1CFU/粒であり、人為的にその10倍以上の16.9CFU/粒で汚染されたアユ卵に対しても600ppm・60分で消毒処理が可能であった。以

上より、アユ卵消毒方法として「過酸化水素濃度600ppm・60分処理を受精1時間後に行う。」を提案した。アユ卵消毒試験水槽実験操作マニュアル作成のためにアユ卵消毒試験方法及び条件について8件の検証実験を行った。そして、得られた知見、これまでに報告されている知見及びアユ種苗生産における経験則を基にアユ卵消毒試験水槽実験操作マニュアルの作成を行った。本報告を基にアユ卵消毒の実用化を行う場合、過酸化水素製剤処理に対するアユ卵の安全性の評価基準が必要となるが、現在明確化されていない。そのため、魚卵消毒剤の魚卵に対する安全性評価基準の早急な提示が求められる。

3. 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

現在採用されている冷水病PCR診断法は環境由来のサンプルに対して特異性や感度の点で問題がある。本課題では、これらの問題点を改良した方法を開発し、冷水病の早期高精度診断や感染経路の解明に資することを目的とする。本年度は、冷水病PCR診断の新標的領域を探索し、新規診断用プライマー設計を行った。新標的領域を冷水病菌の*gyrB*として、冷水病菌29株と冷水病菌類似菌35株の*gyrB*の塩基配列解析の結果、冷水病菌特異的プライマーを設計することができた。その過程で、従来冷水病菌の*gyrB*とされていた領域はトポイソメラーゼIVのBサブユニット領域（*parE*）であったことを明らかにし、アユ生息環境水中には冷水病菌近縁の*Flavobacterium*属と思われる非常に多種の細菌が多数存在することがわかった。

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

本年度は、アユにより多くの*Flavobacterium psychrophilum*包埋油球ワクチンを経口投与することを目指して、ペレット飼料への添加に際して吸収性を高めるため水分散性に優れた油球包埋ワクチンを作成した。アユにおける免疫賦与効果を、徳島県立農林水産総合技術支援センター水産研究所の協力を得て、検討した。作成した不活化菌体包埋油球ワクチン、破壊菌体包埋油球ワクチン、アジュバント添加破壊菌体包埋油球ワクチンの経口投与では、注射ワクチンよりも劣る免疫効果しか得られなかった。

5. 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）あるいはホルマリン不活化菌体（FKC）を浸漬投与後、血中抗体価および頭腎白血球の殺菌能を測定した。また、浸漬投与前の供試魚の体表粘液レクチン活性について調べた。

血中抗体価は膜結合LPS区でわずかに高い傾向を示した。頭腎白血球の殺菌能は膜結合LPS区で最も高くなった。浸漬投与前の供試魚の体表粘液レクチン活性は1:4以下の低い値を示した。したがって、膜結合LPSのほうがFKCよりもアユに対する免疫原性は高いと考えられる。しかし、体表粘液レクチン活性が低かったことから、レクチンのオプソニン効果が弱かったと思われる。

6. アユの冷水病ワクチン等に関する研究 神奈川県水産技術センター内水面試験場

アユ冷水病の予防対策として、微小な油球中にアユ冷水病ワクチン（冷水病菌PH9304株のホルマリン死菌）を包埋した油球ワクチンおよび水溶性アジュバントを添加したアユ冷水病ワクチンを包埋したIMS油球ワクチンの予防効果について検討した。平均体重1.5gおよび2.7gの人工アユ（継代数28）に油球ワクチンまたはIMS油球ワクチンを4 g/kg（BW）/日として配合飼料に吸着させて延べ10日間投与したところ、油球ワクチンのRPSは8.7~37.5%、IMS油球ワクチンのRPSは-66.7~25.0%であり、いずれも高い予防効果は認められなかった。実用化にはさらに予防効果を高める必要があった。

7. 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

アユ冷水病に対するウサギ赤血球膜結合LPS（RaRBC-LPS）浸漬ワクチンおよび培養時間の異なる経口ワクチンの有効性を評価することを目的とした。RaRBC-LPSワクチンは、ワクチン処理後に冷水病が自然発生したため、有効性を評価することができなかった。培養時間の異なる経口ワクチンは、24時間、36時間および50時間培養を行った3種のホルマリン不活化菌体ワクチンの有効性を血中凝集抗体価および攻撃試験の結果から評価した。血中凝集抗体価の上昇は全ての試験区で認められなかった。攻撃試験では、対数増殖期後期に当たると考えられる24時間培養経口ワクチンにおいて有意なワクチンの有効性が確認された。

8. 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

浸漬および経口ワクチンの有効性を向上させる試験を行った。浸漬ワクチンでは、ウサギ赤血球結合LPSワクチンの有効性について検討したところ有効性は確認されなかった。酵母抽出RNAの事前経口投与によるワクチン有効性の向上を検討した結果、高濃度短期間投与（2%添加、1週間連続）で効果があった。市販の飼料添加物を1カ月間投与して効果を検討したところ、有効性は向上しなかった。経口ワクチンでは、油球ワクチンの効果を検討したところ水溶性アジュバントを加えた超音波破碎FKBワクチンにおいて、対照として用いた他の油球ワクチンよりも有効率が高かった。油球ワクチンと酵母抽出RNAを混合して経口投与することで有効性が向上した。

9. アユの冷水病ワクチン等に関する研究
徳島県立農林水産総合技術支援センター水産研究所

冷水病の自然発病に症状に近い浸漬攻撃法により、安定したLD₅₀の測定が可能な方法を検討した。生残魚の血清抗体価の上昇等により感染の成立を確認したが、菌濃度に比例した安定的な結果は得られなかった。

抗原の取り込みを向上するために破壊菌体を包埋したものと、水溶性アジュバントを添加した油球ワクチンの効果を、2段階の投与量で検討するとともに免疫の持続期間を検討した。菌体を破壊することで有効率はわずかに向上した。アジュバントを添加することで効果に有意な差が認められたが、注射ワクチンには及ばなかった。49日後の有効率は14日後に比べて低下した。投与量の増加による効果は明らかではなかった。

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

養殖ブリのノカルジア症の防疫対策として疫学情報の収集をし、感染初期におけるフロルフェニコールによる投薬治療、原因菌の遺伝的多様性および原因菌の大量培養法を検討した。疫学調査の結果、05年のノカルジア症の発生は例年よりも少なかった。投薬治療試験では、05年6～11月までブリを飼育したところ、試験期間中、実験魚群には本症が発生せず、その効果を明らかにすることはできなかったが、投薬により腎臓中の原因菌数の減少が観察された。また、投薬による成長の阻害は認められなかった。遺伝的多様性を明らかにするため、1990年以前分離株8株と1997年以降の17株を調べた結果、最近の分離株は1990年以前の分離株とは異なった遺伝的多形性を示した。また、原因菌は、バツフル付フラスコにガラスビーズを加え、BHIあるいはTHBを用いて、25℃で7日間、旋回培養（100～200rpm）することによって大量培養が可能であった。

11. 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の感染助長要因について、物理的な体表損傷の影響の調査を行った。また、養殖環境中の原因細菌の分布について、調査方法の検討を行った。ブリ体表にBCG注射針を用いて一定の損傷を与えた区と未処理区を設定し、*N. seriolae* 024013株を用いて浸漬感染を行った。感染実験の結果、体表損傷区で死亡が早く進む傾向が見られ、体表の損傷部分に潰瘍が形成された。よって、体表損

傷が感染助長要因の一つであることが明らかとなった。また、ノカルジア症発生のある2養殖漁場において底泥を採取し、抗酸菌培養用培地による培養法とPCR法及びLAMP法による分子生物学的手法によって原因細菌の検出を行った。その結果、LAMP法のみで*N. seriolae*遺伝子が検出され、養殖漁場における分布調査が可能となった。

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

鹿児島県水産技術開発センター

新型レンサ球菌症は尾柄部の潰瘍が顕著で、眼球に異常が無いことや脳組織内からの菌体確認が困難であると昨年度に報告したが、本年度の調査では尾柄部に症状が無く、脳から容易に菌体を確認出来る事例がみられた。また、ブリでの発生が増え、カンパチでは当歳魚での発生が増えるなど新たな傾向がみられた。

本疾病の原因菌は、*Streptococcus dysgalactiae*に分類され、畜産動物由来の同種菌株との性状比較でも類似していることは既に報告したが、部分塩基配列、遺伝子多型、SOF活性をみた結果、魚類由来菌株と畜産由来菌株には明確な違いがあることが判明し、PCRでは魚類由来菌株のみを確認することが可能になった。

13. 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

二枚貝類の液性生体防御因子のうち殺菌素およびリゾチームについて検討した。マガキ外套膜の殺菌活性およびリゾチーム活性には似たような季節的変化が見られ、殺菌活性は*Micrococcus luteus*を代表とするグラム陽性菌

に対して発揮されたことから、その主体はリゾチームであると判断された。マガキのリゾチームは消化盲嚢（二次導管および細管）および外套膜に存在することが免疫組織化学的手法により確かめられた。

14. 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*Perkinsus*原虫についてITS1-5.8S rRNA-ITS2領域の塩基配列の解析ならびに病理組織像の観察により、アサリの*Perkinsus*原虫はヨーロッパアサリや豪州のアワビ類の死亡原因となっている*Perkinsus olsenii*と同定された。瀬戸内海のアサリにおける*Perkinsus*原虫の寄生状況、生殖度、肥満度の季節変化を調べた結果、*Perkinsus*原虫がアサリの生残や生殖に与える影響は低いこと、また、自然感染したアサリを用いて感染強度がアサリの生理状態（潜砂能、ろ水量、高温耐性）に及ぼす影響を調べた結果、影響は非常に小さいことが示唆された。さらに、アサリを*Perkinsus*原虫で人工的に攻撃したところ、FHM培地では3日後に、病理組織標本では29日目に感染が確認できた。FHM培地による定量的検出では、虫体数は33日目には 10^5 (cells/g gill wet weight) に達したが、組織学的に検出される虫体数はきわめて少なく、感染初期にはきわめて小型のまま増殖することが推察された。

2005年にアサリから組織化学的に確認された*Marteilioides chungmuensis*様原虫は、PCR反応の結果、*M. chungmuensis*とは別種であると考えられた。

15. 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

トラフグにおける血管内吸虫の寄生状況を調査し、九州・四国の3県の中国産種苗を用いた養殖トラフグおよび中国から直送されたトラフグで寄生を確認した。寄生種はすべて同一種であった (*Psettarium* sp.)。国産種苗を用いた養殖トラフグ、天然トラフグおよび福井県の蓄養トラフグには血管内吸虫の寄生はみられなかった。今回採集した中国産トラフグの虫体と1993年に採集した福井県産蓄養トラフグの虫体の形態学的比較を行ったが、異同について結論は得られなかった。寄生を受けた中国産トラフグの寄生虫学的・病理組織学的検査の結果、虫体はおもに腹腔動脈にみられたが、組織学的には入鰓動脈や腎動脈内にも観察された。血管は虫体によって栓塞し、血管内腔が拡張していた。脾臓、肝臓、腎臓、消化管等の腹腔内臓器には虫卵のおびただしい集積とその周囲における肉芽腫形成がみられた。寄生虫検査では、虫体よりも虫卵の検出が容易であり、現状では腸管と脾臓の押しつぶしによる虫卵の確認が最も確実な寄生の確認方法と考えられる。