

要 旨

1. ホヤの新疾病（被囊軟化症）の疫学的研究

宮城県水産技術総合センター・
宮城県水産技術総合センター気仙沼水産試験場

2007年冬季から宮城県内のマボヤ養殖で発生している被囊軟化症の原因究明と防疫対策の確立を目的として、本病の発生状況を調査し、感染性を検討した。2007年と2008年にそれぞれ3地点と6地点（うち2地点は2年連続）で発症が確認された。6月以降急速に病勢が拡大し、7～8月には全滅した群もあった。発症個体は回復せずに死亡したが、8月下旬にはほぼ終息した。軟化被囊を水槽に垂下する方法により実験感染が成立し、感染症であることが確認された。感染実験の結果から、凍結やホモジナイズにより感染性を失うこと、病原体は $0.45\ \mu\text{m}$ を通過しないが $1\ \mu\text{m}$ のメッシュを通過すること、 15°C で病原性が高くなること等が明らかになった。

2. ホヤの新疾病（被囊軟化症）の病因及び診断方法に関する研究

北海道大学大学院薬学研究院

ホヤの被囊軟化症の原因の解明と診断法の確立をめざして本年度は以下の解析を行ない、成果を得た。電子顕微鏡を用いて宮城県の病気および健常被囊の構造の比較を行なったところ、病気被囊は健常被囊に比べ被囊繊維が粗く、不均一であり、部分的に繊維構造が壊れている部位があることが明らかになった。一方、表皮細胞や被囊細胞の形態には大きな違いはなく、微生物や寄生虫はいずれの被囊でも観察されなかった。同様に韓国の病気被囊の電子顕微鏡観

察を行なったところ、韓国と宮城県の病気被囊の構造はよく似ており、両海域で発生している病気は同じ被囊軟化症である可能性が高いと考えられた。また、宮城県の病気被囊を用いた感染実験を行ない、病気の発症過程の観察とサンプリングを実施した。宮城県の病気被囊を健常ホヤの水槽に1週間垂下したところ健常個体に被囊軟化症が発生した（発生率26%）。被囊の軟化は口から始まり、短時間（1日程度）で被囊全体が軟化し、数日で死亡した。本疾病が感染症であることが確認された。さらに、被囊軟化症の簡便な診断方法の開発を行ない、被囊の厚さおよび被囊の破けやすさ（張力測定値）の数値を用いることにより、病気被囊の診断法が確立できた。病気被囊および健常被囊の成分分析（水分、蛋白質、脂質、炭水化物、灰分、食物繊維、セルロース）を行なったところ、被囊100gあたり（健常2.5個体、病気4個体分）の成分組成に大きな違いは見いだされなかった。

3. サケ科魚類冷水病の垂直感染防除に関する研究

宮城県水産技術総合センター・
宮城県水産技術総合センター内水面水産試験場

実験感染における冷水病菌の卵内への侵入条件、卵消毒による垂直感染の防除方法を検討するとともに、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、 10^6CFU/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・吸水することで卵内感染が成立した。その後、卵内の生菌数は 10^7CFU/mL まで経時的に増加したが、実験感染卵は死亡しなかった。冷水病菌の増殖部位は主に卵膜の内側（囲卵腔）であった。実験

的には、媒精前に卵表面の冷水病菌をヨード剤 (50ppm) で消毒する方法により、卵に影響を与えることなく垂直感染を防除することが可能であったが、媒精前のPBSによる洗卵やヨード剤吸水のみでは防除できなかった。

2006～2008年に合計13道県のサケ科魚類7種、66ロット、5160尾の体腔液と精液から、冷水病菌の分離を試みた結果、11道県、46ロット (70%)、932尾 (18%) が陽性であった。体腔液中の生菌数は平均 $10^{1.9}$ CFU/mL ($10 \sim 10^{7.7}$ CFU/mL) と低く、 10^6 CFU/mL以上の個体は陽性個体の1%と少なかった。また、サケマス類の未受精卵約1700粒、発眼卵約6900粒の卵内容物を検査した結果、一部の輸入卵を除き、冷水病菌は分離されず、国産卵における卵内感染の可能性は非常に低いと考えられる。この原因として卵内感染が成立する可能性のある高濃度の冷水病菌を保菌した親魚が少ないことが考えられる。

4. 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

昨年度に引き続き、養殖アユの「ボケ病」の病態生理を検討し、簡便な診断法を開発するために以下の研究を実施した。1) 199尾の養殖アユの鰓パラフィン切片にH&E染色等を施し、光学顕微鏡下で病型判定した結果、細菌性鰓病型が12尾、異型細胞型が40尾、混合型が68尾であった。199尾中、*Plecoglossus altivelis* Poxvirus - PCR (PaPV-PCR) に陽性を示したのは146尾であり、それらのうち異型細胞が観察されたのは108尾であった。2) 1.0%塩水浴を健常アユに施し、血清電解質 (Na^+ , K^+ , Cl^-), アンモニア (NH_3), 血中尿素態窒素 (BUN), 尿素 (UA) を経時的に測定したが有意な結果が得られず、塩水浴中の累積死亡数等

の変化等から供試魚の健康状態に問題があったと考えられた。3) 病型判定に供試したものと同じアユの鰓エタノール固定標本および健常アユの生鮮鰓組織に種々の染色を直接的に施し、異型細胞が検出可能か検討した。エタノール固定標本では0.05～0.1% Toluidine blue 染色, Acetocarmine 染色および0.5% Giemsa 染色で異型細胞が検出された。また、生鮮鰓組織では0.1% Toluidine blue 染色およびAcetocarmine 染色で呼吸上皮細胞が明瞭に検出されたことから、異型細胞の検出も可能と考えられた。

5. アユ「ボケ病」の細菌学的研究

栃木県水産試験場

県内アユ養殖7経営体で47症例のボケ病を確認した。その内訳は異型細胞型38症例、細菌性鰓病型3症例、混合感染型6症例で、BGDの関与なき症例が多かった。

1経営体の飼育施設でPaPVとBGD原因菌の消長を2ヶ月間追跡したところ、6面で異型細胞型、5面で混合感染型のボケ病が発生したが、物理的に離れた飼育池で散発的に発症した。

塩水浴では、一時的にアンモニア態窒素濃度は高くなるが、数時間後には減少する。塩水浴時に水面上には多量の泡が発生するが、この泡のアンモニア態窒素濃度はきわめて高く、水面上の泡除去で塩水浴中のアンモニア態窒素濃度上昇を抑制できる可能性が示唆された。

6. 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

感染実験、野生生物や親魚等のPaPV保有検査、ボケ病全国調査などを実施した。その結果、大量死の再現や感染源の特定には至らなかった

が、PaPV がアユ個体間で水平感染し、親子感染の可能性があり、河川棲息のアユからも検出され、日本の広範囲に分布することが明らかになった。また、ボケ病は水温 16℃ から 25℃ で発生し、魚体サイズや収容密度に無関係に発生し、病魚の特徴として体を斜傾させ、水面付近を遊泳する傾向にあることが判明した。養魚場では塩水浴処理がしばしば行われ、死亡率全体の平均を見ると処理した方が低かったが、処理を行っても 70% 程度の死亡率になる場合もあり、その効果は判然としなかった。

7. アユのエドワジエラ・イクタルリ感染症の疫学的研究

広島県立総合技術研究所
水産海洋技術センター

2008 年 7～11 月、アユおよびその他 9 魚種を対象に *E. ictaluri* の保菌検査を行った。その結果、*E. ictaluri* は 5 回全ての検査でアユから検出され、9 月には 67.2% の保菌率であった。また、ギギ 1 尾からも同菌が検出された。ナマズ、ギギ、アユ、オイカワへの感染実験の結果、ナマズの感受性が高く、これと比べてアユやオイカワの感受性は低いことが明らかとなった。さらに、アユへの同居感染、浸漬感染実験の結果、死亡が見られず感染も成立しなかった。

8. アユのエドワジエラ・イクタルリ感染症の細菌学的研究

広島大学大学院生物圏科学研究科

2007 年および 2008 年に全国各地の河川アユから分離された菌株について、それらの細菌学および遺伝学的特性を検討した。供試した 106 株はすべて、グラム陰性の微弱な運動性を有する短桿菌で、チトクローム・オキシダー

ゼおよびインドールを産生せず、その他、糖分解能などの生化学的性状において既報の *E. ictaluri* の性状と一致した。また、16S rDNA、TypeI 線毛遺伝子、および *dnaJ* の塩基配列においても既報の *E. ictaluri* 株と 99.7-100% の相同性を示した。一方、近縁種である *E. tarda* とは、遺伝学的にも血清学的にも区別された。

9. 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

2003 年以降、愛媛県宇和海の養殖ブリに異常遊泳・脳に発赤を伴う原因不明の死亡が発生している。病理組織学的検査を行ったところ、病魚の脳および脊髄にグリオーシスおよびグリア結節、うっ血または出血、神経細胞の変性、神経線維の膨化を特徴的な症状とする高度な病変が認められた。さらに、脊髄からは寄生虫シストが確認された。また、5 月から定期的に宇和海より、加えて四国、九州から病魚を集め病理組織学的な検査をした結果、本寄生虫はすでに四国、九州に広く存在していること、発病は 8 月の高水温期からピークを迎えるが、病変や寄生虫シストは 7 月中旬から認められることが明らかとなった。さらに、*in situ* hybridization (ISH) を行い、H-E 染色で確認されていた寄生虫シストを組織切片上で特異的なシグナルとして検出することができた。PCR 診断によって増幅した断片が、この寄生虫を増幅したものであり、それは粘液胞子虫であろうと強く示唆された。H-E 染色を用いた病理組織学的検査では、寄生虫シストを見るだけであったが、シスト形成前あるいはシストが崩壊した後と考えられる単一細胞の存在も明らかにすることが出来た。また本病寄生虫は、ISH の特異的なシグナルから脊髄・延髄・中脳被蓋に存在することが明らかとなった。

10. 養殖ブリの不明病の疫学的研究

愛媛県農林水産研究所水産研究センター

愛媛県の養殖ブリでは脳の発赤、異常遊泳、吻端部や体表のスレ、肥満度の低下などを特徴とする死亡が発生している。本病の発生状況等を調べるため、養殖ブリ全小割を対象にアンケート調査を行なった。本病の原因とされる粘液胞子虫 *Myxobolus spirosulcatus* の感染状況を調べるため、特定小割の種苗を定期的にサンプリングし、PCR 検査と病理組織学的検査を行なった。本病は脳の発赤や異常遊泳に伴って吻端や腹部にスレの症状を呈し、夏の高水温期に発症し、水温の低下とともに死亡は終息するが、感染耐過魚の肥満度は低く推移し、翌年の高水温期に再度発症しやすいことが分かった。PCR 検査では、流れ藻から採捕した種苗では陰性であったが、漁場導入約1ヶ月後には陽性になり、高水温期に向かって PCR 陽性率や病理組織学的検査による神経病変のスコアが高まる傾向にあり、本病の発生時期とも合致した。漁場の付着生物やプランクトンの PCR 検査でも陽性となり、漁場内で感染が起きている可能性が示された。

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、愛媛県等の養殖ブリにおいて異常遊泳や脳脊髄炎を特徴とする不明病が問題になっている。その原因体と示唆されている粘液胞子虫 *Myxobolus spirosulcatus* の疫学調査を PCR 法により行うことを目的とした。西日本各地の養殖ブリとカンパチを調べた結果、この寄生虫は四国、九州地方に幅広く分布しており、外観的に発病していない健康魚からも高率で検出され

る場合があった。ただし、解剖所見と PCR の診断結果を個別別に照合すると、脳の発赤と寄生との相関関係は高かった。採集された寄生虫株の SSU rDNA を系統解析したところ、2つの遺伝子型があるように見えたが、ITS 領域の解析結果からは種苗の由来や養殖場との関連は認められなかった。病ブリ脊髄組織に対して DIG 標識オリゴヌクレオチド・プローブを用いた迅速 *in situ* ハイブリダイゼーションを試みた結果、栄養体に陽性反応が見られたことから、今回得られた粘液胞子虫の DNA は組織学的に検出される栄養体由来のものであることが確認された。2年間の全体成果としては、不明病の原因が *M. spirosulcatus* であることが強く示唆され、現場的に応用できる PCR 診断法が開発された。しかし、異常遊泳するほどの発病に至るにはさらにまた別の要因が関与すると思われる。

12. 養殖ブリの抗酸菌症に関する研究

鹿児島県水産技術開発センター

Mycobacterium marinum を原因菌とする養殖ブリ類の抗酸菌症は南日本の養殖場で発生が確認されており、2004年以降は増加傾向にある。本研究では実態調査、菌株同定、MIC 測定による薬剤感受性試験、エライザ法と蛍光抗体法を用いた感染時期の推定を行った。養殖ブリでは9月～11月に1才魚以上での発生が多く、菌株は性状試験から全て *M. marinum* に同定され、MIC 値はストレプトマイシンが他の薬剤と比べて低い値を示した。抗体価と菌体観察からブリは0才魚の種苗導入直後には *M. marinum* に感染し、翌年までの長い感染期間を経て1才魚で発病することが推測された。

13. 魚類病原性ウイルスの防除技術に関する

る研究

広島県立総合技術研究所 水産海洋技術センター

種苗生産過程での病原性ウイルス病（ウイルス性表皮増生症およびウイルス性神経壊死症）の発生を防除する目的で、吸着体によるウイルスの感染防除効果についての技術開発を行った。原因ウイルスの検出系を準備した後、特にウイルスの体内増殖や放出に関する知見に乏しい表皮増生症ウイルス（FHV）についての実験を行い、感染3日目には 10^{10} copies/尾にFHVが増殖し、その1%程度（ 10^8 copies/尾）が体外に放出されることを明らかにした。また、垂直感染防除の観点から、罹患魚のウイルス保有量を追跡し、180日後には体内からウイルスが検出されなくなることを明らかにした。FHVは、植物性多糖類（フコイダン5.0 g/L）に吸着し、感染性がなくなった。また、同様に粉体（カオリン、ハイドロキシアパタイト）にも吸着性を示し、ヒラメに対する感染性がなくなった。一方、神経壊死症ウイルス（NNV）は、一部がフコイダンや吸着体に結合するものの、感染力価は若干低下するにとどまった。多糖類や粉体のウイルス吸着効果を説明するために、表面電位（ゼータ電位）を測定したところ、ほとんどの粉体が負に帯電しており、その絶対値が大きいほどウイルス吸着効果が大きい傾向がみられた。これらのことから、種苗生産水槽に吸着体を投入することは、積極的な疾病防除策とは言えないが、感染症リスクの低減に繋がると考えられる。

14. 養殖ヒラメの新型レンサ球菌症 (*Streptococcus parauberis* 感染症) に関する研究

大分県農林水産研究センター水産試験場

養殖ヒラメの*S. parauberis* 感染症の発生状況、薬剤感受性を調査し、実験感染法の検討を行った。本症は、大分県では2005年に顕在化し、日間死亡率は0.1～1.8%、発生時水温は14～25℃であった。罹病魚の主な症状は、鰓の退色やくされ、肝臓の退色や肥大、腎臓の腫大であった。薬剤感受性試験の結果、供試菌株の41.5%がOTCに対して低感受性～耐性であった。その他の供試薬剤に対しては、比較的感受性が高かった。実験感染法の検討の結果、腹腔内接種法および浸漬法ではヒラメの死亡を再現できなかったが、背鰭基部付近皮下に接種した際に、接種菌量に応じた死亡がみられ、自然感染魚と類似した症状が再現された。