

学 位 論 文 題 名

サクラマスのスモルト生産における細菌性腎臓病原菌の
感染環の形成とその防除対策に関する研究

学位論文内容の要旨

サクラマスはシロサケに次ぐ我が国の重要増殖対象魚であるが、その回帰率はシロサケの回帰率と比べ1ケタ低い。サクラマスの回帰率を向上させ資源の増大に繋げるために、稚魚を降海型幼魚となるまで1年以上飼育する「スモルト生産」が実施されているが、近年、秋頃から細菌性腎臓病 (BKD) による慢性的な死亡が発生し問題になっている。死亡は長期間継続し、水平感染が疑われるが、病魚と同じ飼育池の外観健全魚から原因菌 (*Renibacterium salmoninarum*: R.s.) が検出されることはほとんどない。そのため、R.s.の分布状況を正確に把握することが出来ず、感染経路、放流魚の感染の有無は不明であり、防除対策を確立することが困難である。そこで本研究では、従来の R.s.検出法である培養法、IFAT ならびに PCR に加え、抗体検出 ELISA を用いた調査を実施し、サクラマスふ化場における R.s.感染の実態解明を行うとともに、BKD 防除対策を提言した。

まず第1章では、抗体検出 ELISA を用いたサクラマスの R.s.感染状況の実態を把握するため、病歴の異なる3箇所のふ化場のサクラマス幼魚および親魚を対象に、抗 R.s.抗体および R.s.検出調査を実施した。BKD が慢性的に発生しているふ化場の幼魚の43%以上から抗 R.s.抗体が検出され、さらに IFAT により5~7%の検体から R.s.が検出されたことから、幼魚の多くが R.s.に感染している実態が明らかになった。これに対し、BKD 発生歴のないふ化場の幼魚は抗 R.s.抗体陰性であり、IFAT でも R.s.陰性であったことから、抗体検出 ELISA により、飼育群としての R.s.感染あるいは感染履歴の把握が可能であることが示された。一方、親魚の調査では、捕獲直後に抗 R.s.抗体は検出されなかったが、BKD 発生歴のあるふ化場では催熟蓄養後に親魚の33%が抗 R.s.抗体陽性となり、催熟蓄養中に R.s.に感染している実態が浮かび上がった。ところで、本調査の予備試験では、抗 R.s.抗体検出結果、IFAT による R.s.検出結果ならびに BKD 発生状況に一部矛盾する結果が認められ

る個体が存在した。

そこで第2章では、抗 R.s.抗体検出 ELISA および R.s.直接検出法の改良を行った。まず、サクラマスに R.s.ホルマリン死菌を接種し得た抗 R.s.抗体陽性血清を ELISA 発色量の補正基準とし、各検体の抗体量を吸光値比（供試魚血清の吸光値 / 標準陽性血清の吸光値）として求めることで、ELISA 吸光値の再現性を向上させた。また、サクラマスの抗体活性が、4℃あるいは -20℃での30日間の保存および10回以内の凍結融解に対し安定であることを明らかにした。さらに、抗 R.s.抗体吸収試験による発色量の大幅な減少および抗 R.s. ELISA 抗体価と抗 R.s.凝集抗体価との正の相関から、本 ELISA の特異性を明らかにした。次いで、R.s.の直接的検出法として、まず培養法について検討したところ、KDM-2 を用い 15℃で培養したときの R.s.の世代時間は約 18 時間であった。PCR の検出感度は 10^5 cells/mL 程度で、病魚からの R.s.検出には支障は無いものの、感染初期あるいは不顕性感染魚など R.s.が微量しか存在しない場合には検出不可能であった。これは、R.s.の核酸抽出効率が数%程度しかないことに起因することが明らかとなった。そこで、培養法と PCR を併用した増菌 PCR について検討したところ、7日間の増菌により検出感度が 100 倍上昇したが、腎臓からの検出では、組織由来の RNA が多量に混入し、PCR の増幅反応が阻害されることが明らかになった。この問題は、RNase-PEG 沈殿法による核酸抽出で解決されたが、操作が煩雑となり、多数の検体処理が必要な疫学調査には不向きであると考えられた。一方、IFAT の R.s.検出感度は、約 10^4 cells/mL で、増菌 IFAT によりサクラマス健常魚の 8~25% から R.s.が検出された。

第3章では、最適化した ELISA を用い、まず病歴の異なるヤマメ養魚場で抗 R.s.抗体保有状況調査を実施し、ELISA 吸光値の整合性について検証した。その結果、BKD 発生池の瀕死魚では、50%以上の検体から培養法および IFAT により R.s.が検出され、33%の検体が抗 R.s.抗体検出 ELISA の吸光値比が 0.20 以上を、さらに 36%の検体が吸光値比 0.40 以上を示した。一方、発生歴のある養魚場では、27%の検体が吸光値比 0.20 以上を示したものの、0.40 以上を示した検体はわずか 3%であった。これに対し、BKD 発生歴のない養魚場では、多くの検体が 0.20 以下であった。ただし、BKD 発生歴のない養魚場の 2% (2/120) の検体から IFAT 陽性となる細菌が検出されたが、吉水ら (1987) は、R.s.と共通抗原を有する細菌が存在することから、血清学的検出法を用いる際に配慮する必要があることを指摘している。そこで、供試魚の腎臓より R.s.と共通抗原を有する細菌を分離したが、これ

ら交差菌を抗原とした ELISA では、R.s.を抗原としたときの 13 %以下の発色しか認められず、交差菌の存在は抗 R.s.抗体検出 ELISA 結果にほとんど影響しないと考えられた。

以上の結果より、抗 R.s.抗体 ELISA 吸光値比 0.40 以上は発症あるいは発症寸前、吸光値比 0.20 以上は少なくとも抗 R.s.抗体を保有すると考えられ、吸光値比 0.10～0.20 は抗 R.s.抗体擬陽性と判断できると結論付けた。

次いで、BKD 発生歴のあるふ化場と無いふ化場のサクラマス親魚を対象に抗 R.s.抗体保有状況の調査を行った。抗 R.s.抗体陽性率は共に 1～2%となり、親魚が河川遡上後に R.s.に感染することが示唆された。これは、河川にごく僅かに存在する R.s.だけでなく、同じ水系で飼育されている幼魚が主な R.s.感染源となっていると考えられた。一般に R.s.感染親魚は、産卵期に R.s.を放出するとされていることから、採卵場の排水を介した水平感染が起こると考えられる。採卵親魚および一年前に孵化したスモルト生産幼魚が同じ施設内で飼育されると、両者が汚染源となり、孵化仔魚ならびに幼魚に R.s.が感染し、サクラマスふ化場の慢性的な BKD 発生が続いていくものとする。

以上の結果からサクラマスふ化場における BKD 防除対策では、一般的な魚病対策に加え、(1) 親魚の捕獲・催熟蓄養・採卵施設を幼魚飼育施設から可能な限り離すこと、(2) 飼育幼魚の抗 R.s.抗体検査を定期的に実施し、R.s.感染状況をモニタリングし、R.s.感染群を隔離すること、上記 (1)、(2) が不可能な場合、(3) 少なくとも 1 年以上スモルト生産を中止し、R.s.感染環を断ち切ること、(4) 野生魚や放流魚の一部に R.s.感染魚が存在することを前提に、万全の防除対策を実施することが挙げられる。以上の 4 点を実施することにより、サクラマスふ化場から R.s.が排除できると考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 水 守

副 査 教 授 田 島 研 一

副 査 助 教 授 西 澤 豊 彦

学 位 論 文 題 名

サクラマスのスモルト生産における細菌性腎臓病原菌の 感染環の形成とその防除対策に関する研究

サクラマスはシロサケに次ぐ増殖対象魚種として期待されているが、その回帰率はシロサケの約 1/10 程度である。サクラマスの回帰率を向上させ、資源の増大に繋げるために、稚魚を降海型幼魚となるまで 1 年以上飼育する「スモルト生産」が実施されている。しかし、近年、秋口からスモルト生産幼魚に細菌性腎臓病 (BKD) による慢性的な死亡が発生し問題になっている。死亡は長期間継続し、採熟畜養中の親魚への水平感染も疑われるが、病魚と同じ飼育池の外観健全魚から原因菌 (*Renibacterium salmoninarum*: R.s.) が検出されることはほとんどない。そのため、R.s. 分布状況を正確に把握することが出来ず、感染経路、放流魚の R.s. 感染の有無は不明であり、防除対策を確立することが困難である。そこで本研究では、従来の R.s. 検出法である培養法、IFAT ならびに PCR に加え、抗体検出 ELISA を用いた調査を実施し、サクラマスふ化場における R.s. 感染の実態解明を行うとともに、BKD 防除対策を提言した。

まず、抗体検出 ELISA を用いた R.s. 感染状況の実態を把握するため、病歴の異なる 3 箇所のふ化場のサクラマス幼魚および親魚を対象に、抗 R.s. 抗体および R.s. 検出調査を実施した。BKD が慢性的に発生しているふ化場の幼魚の 43 % 以上から抗 R.s. 抗体が検出され、さらに IFAT により 5~7 % の検体から R.s. が検出されたことから、幼魚の多くが R.s. に感染している実態が明らかになった。これに対し、BKD 発生歴のないふ化場の幼魚は抗 R.s. 抗体陰性であり、IFAT でも R.s. 陰性であったことから、抗体検出 ELISA により、飼育群としての R.s. 感染あるいは感染履歴の把握が可能であることが示された。一方、親魚の調査では、捕獲直後に抗 R.s. 抗体は検出されなかったが、催熟蓄養後に親魚の 33 % が抗 R.s. 抗体陽性となり、催熟蓄養中に R.s. に感染している実態が浮かび上がった。ところで、本調査の予備試験では、抗 R.s. 抗体検出結果、IFAT による R.s. 検出結果ならびに BKD 発生状況に一部矛盾する結果が認められる個体が存在した。そこで、抗 R.s. 抗体検出 ELISA および R.s. 直接検出法の改良を行った。まず、抗 R.s. 抗体陽性サクラマス血清

を作出し、これを ELISA 発色量の補正基準とし、各検体の抗体量を吸光値比 (供試魚血清の吸光値 / 標準陽性血清の吸光値) として求めることで再現性を向上させた。また、抗 R.s. 抗体吸収試験による発色量の大幅な減少および抗 R.s. ELISA 抗体価と抗 R.s. 凝集抗体価との正の相関から、本 ELISA の特異性を明らかにした。

次いで、R.s. の直接的検出法として、まず培養法について検討したところ、KDM-2 を用い 15 °C で培養したときの R.s. の世代時間は約 18 時間であった。PCR の検出感度は 10^5 cells/mL 程度で、病魚の診断は可能であるが、不顕性感染魚からの R.s. の検出には不十分であると考えられた。一方、IFAT の検出感度は、約 10^4 cells/mL で、R.s. を増菌培養した後に IFAT で検出する「増菌 IFAT」では、サクラマス健常魚の 8~25 % から R.s. が検出された。

最適化した ELISA を用い、まず病歴の異なるヤマメ養魚場で抗 R.s. 抗体保有状況調査を実施し、ELISA 吸光値の整合性について検証した。その結果、BKD 発生池の瀕死魚では、50 % 以上の検体から培養法および IFAT により R.s. が検出され、69 % の検体が抗 R.s. 抗体検出 ELISA 吸光値比 0.20 以上を示した。一方、発生歴のある養魚場では、30 % の検体が吸光値比 0.20 以上を示したが、発生歴のない養魚場では、多くの検体が吸光値比 0.20 以下であった。ただし、BKD 発生歴のない養魚場の 2 % の検体から IFAT 陽性となる細菌が検出された。吉水ら (1987) は、R.s. と共通抗原を有する細菌が存在することから、血清学的検出法を用いる際に配慮する必要があることを指摘している。そこで、供試魚の腎臓より R.s. と共通抗原を有する細菌を分離したが、これら交差菌を抗原とした ELISA では、R.s. を抗原としたときの 13 % 以下の発色しか認められず、交差菌の存在は抗 R.s. 抗体検出 ELISA 結果にほとんど影響しないと考えられた。以上の結果より、吸光値比 0.20 以上は抗 R.s. 抗体陽性と判断できると結論付けた。

本判定基準に基づき、BKD 発生歴のあるふ化場と無いふ化場のサクラマス親魚を対象に抗 R.s. 抗体保有状況調査を行った。抗 R.s. 抗体陽性率は共に 1~2 % となり、親魚が河川遡上後に R.s. 感染することが示唆された。これは、河川にごく僅かに存在する R.s. だけでなく、同じ水系で飼育されている幼魚が主な感染源となっていると考えられた。一般に R.s. 感染親魚は、産卵期に R.s. を放出するとされていることから、採卵場の排水を介した水平感染が起こると考えられる。採卵親魚および一年前に孵化したスモルト生産幼魚が同じ施設内で飼育されていると、両者が汚染源となり、孵化仔魚ならびに幼魚に R.s. が感染し、サクラマスふ化場の慢性的な BKD 発生が続いていくものとする。

以上の結果からサクラマスふ化場における BKD 防除対策では、一般的な魚病対策に加え、(1) 親魚の捕獲・催熟蓄養・採卵施設を幼魚飼育施設から可能な限り離すこと、(2) 飼育幼魚の抗 R.s. 抗体検査を定期的 to 実施し、R.s. 感染状況をモニタリングし R.s. 感染群を隔離すること、上記 (1)、(2) が不可能な場合、(3) 少なくとも 1 年以上スモルト生産を中止し、R.s. 感染環を断ち切ること、(4) 野生魚や放流魚の一部に R.s. 感染魚が存在することを前提に、万全の防除対策を実施することが挙げられる。以上の 4 点を確実に実施することにより、サクラマスふ化場から R.s. を排除できると考える。