

学 位 論 文 題 名

養殖サケ科魚類の卵内感染による
垂直伝播の防除技術に関する研究

学位論文内容の要旨

内水面のサケ科魚類養殖では、1970年代前半における伝染性造血器壊死症(IHN)の発生および拡大を契機として消毒法および隔離施設でのふ化飼育を基本とした防疫対策が確立された。これにより、種苗生産におけるIHNの発生が抑止され、養殖生産の安定化が図られてきた。しかし、伝染性腭臓壊死症(IPN)や細菌性腎臓病(BKD)においては、汚染種卵の導入による伝播事例が高い割合を占め、垂直伝播に対する防疫対策が課題として残されている。垂直伝播が問題視されている疾病に、IPN、IHN、BKDおよび細菌性冷水病(以下、冷水病と称す)がある。この中で、BKDおよび冷水病では卵内感染が確認されているが、感染経路やその条件などの感染機序について不明な点が残されている。そのため、本研究では、養殖サケ科魚類に認められる病原細菌の卵内感染機序の解明と防除技術の開発を目的として、第1章では、主に冷水病原因菌(*F. psychrophilum*)を対象に人工感染試験により感染経路および条件を検討した。第2章では等調液洗卵法の除菌効果と卵内感染の防除効果を、第3章では未受精卵消毒による感染防除効果を検討した。

第1章第1節では、産卵親魚の体内における卵内感染を検討するため体腔液および精液中の*F. psychrophilum*、せつそう病原菌(*A. salmonicida*)およびBKD原因菌(*R. salmoninarum*)の生菌数、ならびに排卵された未受精卵内における感染の有無を調べた。その結果、体腔液中の*F. psychrophilum*および*A. salmonicida*の生菌数は

10⁴CFU/ml 以下であり、*R. salmoninarum* は 10⁸~10¹⁰CFU/ml であった。しかし、未受精卵内から病原細菌は分離されず、産卵親魚体内において卵が感染している可能性は低いと考えられた。

第 2 節では *F. psychrophilum* による人工感染試験を行い、卵内感染経路を検討した。卵表面を汚染してから授精・吸水させた卵、授精後に表面を汚染して吸水させた卵および汚染卵を授精せずに吸水させた不受精卵のいずれにおいても卵内感染が成立した。また、人為的に吸水させた未受精卵では、吸水 10 分経過時まで卵内感染が成立した。そして発眼卵も得られた。また、卵内感染は卵表面に存在する汚染菌の濃度に依存し、10⁷ CFU/ml 以上の汚染条件で成立した。以上から、*F. psychrophilum* は授精時ではなく、卵の吸水過程において物理的に卵内へ侵入することが推察された。

第 3 節では、人工感染試験により卵内感染の有無を確認した。*R. salmoninarum* の卵内感染は確認されたが、*A. salmonicida* では卵内感染は確認されなかった。この違いを検討するために、*F. psychrophilum* または *A. salmonicida* で汚染したニジマス卵内における菌の消長を調べたところ、*F. psychrophilum* 汚染卵では、日数の経過に伴い卵内生菌数が増加し、発眼期には 10⁷CFU/粒程度まで増殖していることが確認された。一方、*A. salmonicida* 汚染卵では、吸水後卵内への菌侵入がみられたが、増殖せず、発眼卵では卵内感染が成立していなかった。さらに、卵内から分離された一般細菌 (*Comamonas* 属、*Pseudomonas* 属および *Sphigomonas* 属) を用いた人工感染試験でも、卵内感染が認められた。

第 4 節では、走査型電子顕微鏡 (SEM) によりニジマス吸水卵および病原細菌汚染卵の卵門形態を観察した。飼育水中で吸水させた卵では、10 分後まで卵門管内が開口していたが、30 分以降の卵では卵門管の閉塞が観察された。排卵された未受精卵の卵膜表面には、卵膜孔管は観察されず、卵門の大きさは細菌に比べてはるかに大きいことから、細菌が卵門から十分に侵入できると推察された。

垂直伝播機序として、親魚体内における卵内感染と人工採卵に伴う体外伝播の問題が指摘されているが、体内における感染の可能性は低く、体外伝播の可能性が高いことが考えられた。不受精卵および受精卵ともに感染が成立したこと、吸水 10 分経過までの卵では感染が成立し、発眼卵が得られる時期とも一致すること、さらには卵門管が開口している時期とも一致することから、卵内感染は、精子侵入に伴って起こるのではなく、吸水過程において卵門から細菌が囲卵腔へ侵入することにより成立すると考えられた。また、表面が高度に汚染された条件であれば、*F. psychrophilum* や *R. salmoninarum* 以外の病原細菌および一般細菌でも卵内への侵入が起こるものの、感染成立の可否は菌種によって異なることが明らかになった。この原因として、囲卵腔および卵膜に存在するリゾチーム等の生体防御物質に対する菌の耐性の違いが考えられ、今後感染機序を明らかにする上で重要な課題であると考ええる。

次いで、第 2 章第 1 節および第 2 節では、人工採卵で行われている等調液洗卵法の除菌効果を調べた。その結果、試験規模では 10^4 程度、事業規模でも $10^4 \sim 5$ 程度の細菌またはウイルスが除菌・除去されることが明らかになった。

第 3 節では、長野県内の養魚場における洗卵実態を調べた。調査した 21 養魚場では、主に簡便法 (0.9~1% 食塩水) または標準法による等調液が使用され、濯ぎ洗卵 (8 件) またはシャワー洗卵単独 (6 件)、あるいは両者を併用した洗卵 (7 件) が行われていた。等調液使用量では、卵 1 万粒あたり 1~2L の事例が最も多く (12 件)、1L 以下の事例 (4 件) もみられた。使用量が少ない事例は、在来マスを飼育する養魚場であり、このうち、濯ぎ洗卵の事例が 3 件であった。在来マス養殖では BKD の防除が重要な課題であり、*R. salmoninarum* 保菌魚の体腔液中の生菌数が非常に高いことが本研究で示されたことから、洗卵程度の低い事例については、シャワー洗卵の採用と使用量の増加による改善が必要であると考えられた。

このように、等調液洗卵法は、受精率向上の目的で普及した技術であるが、卵表面を除菌することにより卵内感染の防除に効果があることが示された。しかし、卵表面の汚染程度が高い場合には、洗卵しても菌が残ることから、卵内感染リスクを低下させるために、未受精卵表面を消毒する必要があると考えられた。

最後に、第3章では、ポビドンヨード剤（以下、ヨード剤とする）の消毒効果に及ぼす阻害物質の影響および消毒による感染防除効果を検討した。通常、採卵（搾出）した卵には体腔液および潰卵成分が混じるが、混入率が高い場合には、消毒効果の低下がみられた。無洗卵状態の卵では、*F. psychrophilum* に対してはヨード剤消毒（200 倍液, 15 分）が有効であったが、*A. salmonicida* および *R. s.* に対しては不十分であった。一方、*A. salmonicida* では汚染卵を濯ぎ洗卵またはシャワー洗卵することにより、*R. salmoninarum* ではシャワー洗卵することにより、十分な消毒効果が得られた。また、卵内感染を防除するためには、受精卵をヨード剤液中で吸水させる方法（吸水消毒）では不十分であり、授精前の未受精卵をヨード剤で消毒する方法（未受精卵消毒）が有効であることが示された。

本研究の成果から、養殖サケ科魚類にみられる卵内感染は、人工採卵された未受精卵の表面が細菌で高度（ 10^7 CFU/ml 以上）に汚染されていた場合、卵表面の病原細菌が吸水過程中に卵門を介して卵腔に侵入することにより成立すると考えられる。感染リスクを低下させるためには、等調液洗卵法および未受精卵のヨード剤消毒が有効であり、消毒効果を高めるためにも、等調液洗卵法とヨード剤消毒が一体的に実行されることが重要であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 永 守

副 査 教 授 澤 辺 智 雄

副 査 助 教 笠 井 久 会

学 位 論 文 題 名

養殖サケ科魚類の卵内感染による 垂直伝播の防除技術に関する研究

サケ科魚類の内水面養殖では、1970年代前半における伝染性造血器壊死症（IHN）の発生およびその被害拡大を契機として、卵、飼育用水および施設の消毒、隔離施設での孵化飼育を基本とした防疫対策が確立された。これにより、種苗生産における IHN の発生が防止され、養殖生産の安定化が図られてきた。しかし、伝染性腭臓壊死症（IPN）や細菌性腎臓病（BKD）では、汚染種卵の導入による伝播事例が高い割合を占め、垂直伝播の防止が課題として残されている。垂直伝播が問題視されている疾病には、IPN および BKD のほか、細菌性冷水病（以下、冷水病と称す）が知られている。BKD および冷水病に関しては、卵内感染を起こすことが実験的に証明されているが、感染経路やその条件などの感染機序については不明な点が多く残されている。

本論文では養殖サケ科魚類に認められる病原細菌の卵内感染機序の解明と感染防除技術の開発を目的に、主として冷水病原因菌 *Flavobacterium psychrophilum* を対象とした人工感染試験を行い、感染経路および卵内侵入条件を検討し、等調液洗卵法の除菌効果と卵内感染の防除効果ならびに未受精卵消毒による感染防除効果を明らかにした。

第一章では、まず、冷水病、せつそう病あるいは細菌性腎臓病の感染を耐過した採卵親魚の体腔液中の原因細菌数を測定し、冷水病原因菌 *F. psychrophilum* およびせつそう病原因菌 *Aeromonas salmonicida* は 1 mL あたり 10^4 CFU、BKD 原因菌 *Renibacterium salmoninarum* は $10^8 \sim 10^{10}$ CFU 存在するものの、未受精卵内から、これら病原細菌を分離することはできず、産卵親魚体内において卵が感染している可能性が低いことを明らかにした。次いで、*F. psychrophilum* を用いて卵の人工感染試験を行い、卵表面汚染後に授精・吸水させた卵、授精後に表面を汚染して吸水させた卵および汚染卵を授精せずに吸水させた未受精卵を作成した。卵表面の *F. psychrophilum* 汚染濃度が 10^7 CFU/ml 以上の汚染条件下で、いずれの卵でも卵内感染が成立した。人為的に吸水させた未受精卵では、吸水 10 分経過時まで卵内感染が成立した。しかも、受精卵からは発眼卵が得られた。このように、*F. psychrophilum* は授精時ではなく、卵の吸水過程においても物理的に卵内へ侵入することが明らかにな

った。*F. psychrophilum*汚染卵では、日数の経過に伴い卵内生菌数が増加し、発眼期には 10^7 CFU/粒程度まで増殖した。囲卵腔で *A. salmonicida* は生存できなかったが、*F. psychrophilum* および *R. salmoninarum* は生存し、囲卵腔内で細菌が生存できるかどうか、その後の卵經由感染の重要な要因であることを明らかにした。さらに、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察により、ニジマス吸水卵および病原細菌汚染卵の卵門形態を観察した。飼育水で吸水した卵では、10 分後まで卵門管内が開口していたが、30 分以降の卵では卵門管が閉塞していた。排卵された未受精卵の卵膜表面には、卵膜孔管は観察されず、卵門の大きさは細菌に比べてはるかに大きいことから、細菌が卵門から侵入する可能性が高いことを明らかにした。

第二章では古くから人工採卵で実施されている等調液洗卵法の除菌効果を検討し、試験規模では卵表面に存在した細菌またはウイルスが 10^4 程度、事業規模でも $10^4 \sim 5$ 程度除菌あるいは除去されることが明らかとなり、汚染卵であっても洗卵をすれば卵内感染を防除できることを示した。しかし、卵表面の汚染濃度が高い場合には、洗卵しても菌が残ることがあることから、卵内感染のリスクを低下させるためには、未受精卵表面を消毒する必要があることが明らかとなった。

第三章では、長野県内の養魚場において実施されている洗卵実態を観察した。調査した 21 養魚場では、主に簡便法 (0.9~1%食塩水) または標準法による等調液が使用され、洗卵程度の低い事例については、シャワー洗卵の採用と洗卵液使用量の増加等の改善が必要であることを示した。さらに、ポビドンヨード剤 (以下、ヨード剤とする) の消毒効果に及ぼす阻害物質の影響および消毒による感染防除効果を検討し、洗卵により体腔液および潰卵成分を除去した場合に、十分な消毒効果が得られることを明らかにした。結論として、受精卵をヨード剤液中で吸水させる方法は、卵内感染を防止するには不十分であるが、授精前の未受精卵をヨード剤で消毒する方法が有効であることを示した。

以上、本研究は従来対策が難しいとされてきた、垂直感染を起こす病原体の卵内侵入機序の一端を明らかにし、簡便でかつ有効な防除手法を提案し、同時に受精率の向上と卵消毒効果の向上が図られることを示したもので、これらの成果は水産科学に寄与するところ大と考え、審査員一同は申請者が博士 (水産科学) の学位を授与される資格のあるものと判定した。