

(6) 観賞魚養殖技術試験

疾病対策試験

(キングョヘルペスウイルス病の人為感染方法の確立)

能嶋光子・澤田知希・本田是人

キーワード；キングョヘルペスウイルス性造血器壊死症，感染方法の確立

目的

キングョヘルペスウイルス性造血器壊死症（以下GFHN）は，キングョヘルペスウイルスを原因とする疾病である。本病の特徴は，鰓や腎臓に観察される重度の貧血であり，発病魚は摂餌不良，異常遊泳を呈し，やがて衰弱してへい死する。そのへい死率は極めて高く，有効な対策がないことから，金魚養殖業者のみならず，流通業者にとって最も重大な病気となっている。

ウイルス病に対してはワクチンが最も有効な対策であるが，ワクチンの有効性を正確に評価するためには，再現性の高い感染方法の確立が必須となる。

そこで昨年度は，ARF細胞¹⁾で大量培養したGFHNVを用いて人為感染を試み，100%のへい死を引き起こすことを示した。²⁾

平成23年度はさらに，供試魚の攻撃部位やサイズの検討を行い，再現性の高い人為感染方法の確立を試みた。

材料及び方法

(1) 攻撃部位の検討

再現性の高い感染実験を確立するために，攻撃部位を変えた場合の影響について検討した。

攻撃に用いたウイルス液は，昨年と同じ方法で培養，調節し²⁾，使用まで-80℃で凍結保存したものをウイルス原液（ウイルス感染力価 $3.0 \log \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ）とした。供試魚は，水試内で生産したGFHNVに感染歴のない2歳魚のリュウキン(4g/尾)10尾とし，感染実験まで約20℃の止水で7日間飼育した。試験区は，ウイルス液で攻撃するエラ区，体表区，尾ビレ区と，陰性対照区を設けた。

いずれの試験区も攻撃は，滴下法によった。供試魚は水槽から取り上げてFA-100（田辺製薬(株)）で麻酔し，各攻撃部位にウイルス原液を培養液（MEM） 10^5 倍希釈したウイルス液（ウイルス感染力価 $2 \log \text{TCID}_{50} / \text{mL}$ ）の滴下を行い（ $10 \mu\text{L}/\text{魚体重}(\text{g})$ ），3分間放置後に元の水槽へ戻した。なお，陰性対照区には，培養液（MEM）を尾ビレに同量滴下した。攻撃後は各試験区とも25℃の止水

で飼育し，給餌は週5回，アユ用配合飼料（日本配合飼料）を1%魚体重/d投与した。毎日観察してへい死数をカウントするとともに，へい死魚は蛍光抗体法によりへい死の原因を確認した。

(2) 供試魚のサイズの検討

再現性の高い感染実験を確立するために，供試魚のサイズを変えた場合の影響について検討した。

攻撃に用いたウイルスは，(1)と同じウイルス液を用いた。供試魚は，水試内で生産したGFHNVに感染歴のない2歳または3歳のリュウキンを用い，感染実験まで約20℃の止水で7日間飼育した。試験区は，魚体重2g/尾区(2歳魚)，魚体重6g/尾区(2歳魚)，魚体重8g/尾区(3歳魚)，魚体重20g/尾区(3歳魚)と，陰性対照区（魚体重2g/尾2歳魚）を設けた。いずれの試験区も攻撃部位は尾ビレとし，感染方法および攻撃後の飼育管理，へい死原因の確認は(1)に準じた。

結果及び考察

(1) 攻撃部位の検討

攻撃部位の検討で行った感染試験の結果を図1に示す。試験期間中，陰性対照区ではへい死は見られなかった。一方，ウイルスで攻撃したエラ区，体表区，尾ビレ区は，攻撃開始11日後までに全ての魚がへい死した。なお，へい死魚は本病の特徴である重度の貧血が認められ，蛍光抗体法で重度のGFHNと診断された。

このことから，エラ，体表，尾ビレのいずれの部位にウイルス液を滴下しても，GFHNVによる100%のへい死を引き起こすことが示された。しかしながら，個体によっては，エラ蓋欠損や，作業による体表の鱗の欠落等がある。従って，感染実験の再現性を高めるためには，これらの影響を受けにくい尾ビレを攻撃部位とするのが最も適切であると判断した。

(2) 供試魚のサイズの検討

供試魚のサイズの検討で行った感染実験の結果を図2に示す。試験期間中，陰性対照区ではへい死は見られな

った。一方、ウイルスで攻撃した区は、魚体重 2g/尾が最もへい死に至る期間が短く、攻撃開始から 7 日後に全ての魚がへい死した。魚体重 6g/尾、魚体重 8g/尾は攻撃開始 6 日後からへい死が始まり、攻撃開始から 9 日後に全ての魚がへい死した。魚体重 20g/尾は攻撃開始 11 日後からへい死が始まり、他の区に比べ遅くなったが、攻撃開始から 16 日後に全ての魚がへい死した。なお、へい死魚は本病の特徴である重度の貧血が認められ、蛍光抗体法で重度の GFHNV と診断された。

このことから、魚体重 2~20g/尾の個体であれば、どのサイズでも 100%のへい死を引き起こすことが示された。しかしながら、使用するウイルス液の量や飼育スペースを考慮し、魚体重 2~8g/尾のサイズが最も適切であると判断した。

以上により、再現性の高い感染実験方法には、魚体サイズが魚体重 2~8g/尾の供試魚(水試内で生産した GFHNV に感染履歴のないリュウキン)の尾ビレに、ARF 細胞で培養したウイルス液(力価 $1 \times 10^6 \text{logTCID}_{50} / \text{mL}$ 以上)を、 $10 \mu\text{L} / \text{魚体重}(\text{g})$ 、滴下して行うのが最も適していると評価された。今回の実験で再現性の高い感染実験法が確立できた。

今後は、この方法を用いて、ホルマリン不活化ワクチンなどの有効性を評価していきたい。

- 1) 能嶋光子・松村貴晴・田中健二(2010)疾病対策試験—キンギョヘルペスウイルス培養に適した初代細胞の樹立—。平成 21 年度愛知県水産試験場業務報告, 40-41.
- 2) 能嶋光子・松村貴晴・田中健二(2011)疾病対策試験—キンギョヘルペスウイルス病の人為感染方法の検討—。平成 22 年度愛知県水産試験場業務報告, 43-44.

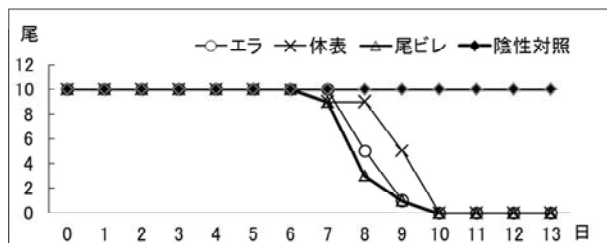


図 1 : GFHNV 攻撃後の生残尾数の推移 (攻撃部位の検討)

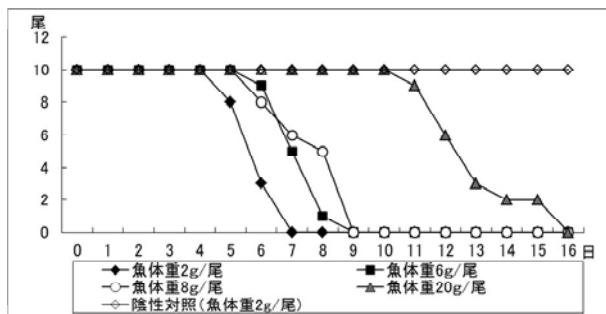


図 2 : GFHNV 攻撃後の生残尾数の推移 (供試魚のサイズ検討)

疾病対策試験

(キンギョヘルペスウイルスホルマリン不活化ワクチンの有効性の評価)

能嶋光子・澤田知希・本田是人

キーワード；キンギョヘルペスウイルス性造血器壊死症，ホルマリン不活化ワクチン

目的

キンギョヘルペスウイルス性造血器壊死症（以下GFHN）は、キンギョヘルペスウイルスを原因とする疾病である。本病の特徴は、鰓や腎臓に観察される重度の貧血であり、発病魚は摂餌不良、異常遊泳を呈し、やがて衰弱してへい死する。そのへい死率は極めて高く、有効な対策がないことから、金魚養殖業者のみならず、流通業者にとって最も重大な病気となっている。

ウイルス病に対してはワクチンが最も有効な対策である。そこで今年度は、GFHNVのホルマリン不活化ワクチンを作製し、その有効性を評価した。

材料及び方法

1 ホルマリン不活化ワクチンの作製

ホルマリン不活化ワクチン（以下「ワクチン」）は以下のように作製した。まずウイルスをARF細胞で2代継代培養し、ほぼすべての細胞が細胞の委縮や球形化といった細胞変性（CPE）を示した時点でウイルス培養液の上清を回収した。その後、遠心分離（2,000×g, 15分, 4℃）して得られた上清を回収し、ホルマリンを終濃度0.3%となるように加え、4℃で2日間不活化した。なお、遠心分離して得られた上清のウイルス感染価は3.8 log TCID₅₀/mLであった。

2 ホルマリン不活化ワクチンの有効性評価

(1) ワクチン1回接種

供試魚には、水試内で生産したGFHNVに感染歴のない2歳魚のリウキン（5g/尾）10尾を25℃の止水で平成23年8月15日から7日間飼育したものを使用した。

試験区は、ワクチン区①、ワクチン影響区①、陽性対照区①、陰性対照区①の4つを設けた。

ワクチン区①とワクチン影響区①にはワクチン、陽性対照区①、陰性対照区①には培養液を5μL/魚体重(g)/尾、腹腔内注射により投与した。その後、25℃で止水飼育した。

ワクチン効果を判定するために、ワクチン区①、陽性対照区①には、ワクチンまたは培養液（MEM）接種14日

後に人為感染試験を行った。人為感染は、キンギョを水槽から取り上げて麻酔した後、尾ビレにウイルス液を滴下し、（10μL/魚体重・g）、3分間放置後に元の水槽へ戻した。攻撃後は各試験区とも25℃で止水飼育し、へい死魚は蛍光抗体法によりへい死原因を確認した。ウイルス攻撃に用いたウイルス液の感染価は、1×0 TCID₅₀/mLであった。

なお、ワクチンの有効率（RPS）は次式によって計算した。

$$RPS = \{1 - (\text{ワクチン区の死亡率}(\%) / \text{対照区の死亡率}(\%))\} \times 100$$

(2) ワクチン2回接種（追加免疫）

供試魚には、水試内で生産したGFHNVに感染歴のない2歳魚のリウキン（6g/尾）10尾を25℃の止水で平成23年8月1日から7日間飼育したものを用いた。

試験区は、ワクチン区②、ワクチン影響区②、陽性対照区②、陰性対照区②の4つを設けた。ワクチン区②、ワクチン影響区②には、ワクチンを、陽性対照区②、陰性対照区②には培養液を5μL/魚体重(g)/尾、腹腔内注射により投与し、2回目は14日後に同量接種した。その後、25℃で止水飼育した。

ワクチン効果を判定するために、ワクチン区②、陽性対照区②には、2回目のワクチンまたは培養液接種14日後に人為感染試験を行った。

なお、使用したワクチン、人為感染に用いたウイルス力価、人為感染方法、ワクチンの有効率は2(1)と同様とした。

結果及び考察

(1) ワクチン1回接種

感染実験の結果を図1に示す。試験期間中、ワクチン影響区①、陰性対照区①のへい死は見られなかった。陽性対照区①では攻撃開始8日後からへい死が始まり、攻撃開始14日後にはすべての魚がへい死した。一方、ワクチン区①は攻撃開始10日後からへい死が始まったものの、攻撃開始17日後以降はへい死がなく、試験終了時である攻撃開始28日後の生残尾数は4尾であった。

なお、すべてのへい死魚は本病の特徴である重度の貧血が認められた他、蛍光抗体法で重度のGFHNと診断された。

(2) ワクチン2回接種

感染実験の結果を図2に示す。試験期間中、ワクチン影響区②、陰性対照区②のへい死は見られなかった。陽性対照区②では攻撃開始7日後からへい死が始まり、攻撃開始15日後にはすべての魚がへい死した。また、ワクチン区②は攻撃開始10日後からへい死が始まり、攻撃開始18日後にはすべての魚がへい死した。なお、すべてのへい死魚は本病の特徴である重度の貧血が認められた他、蛍光抗体法で重度のGFHNと診断された。

不活化ワクチンの有効性を評価するには、ワクチン接種群が対照群（ワクチン未接種群）より生存率が統計上有意に高くなる、または生存率の差が所定の基準より高くなることを確認することが必要である。¹⁾ 今回の実験では、ワクチンを1回接種した場合、2回接種した場合のRPSはそれぞれ40%、0%となり、いずれもワクチンが有効と評価される60%を大きく下回っていることから、ワクチンの有効性は確認できなかった。

また、ワクチンの2回接種（追加免疫）が、1回接種と比べて生残率が低くなった。この原因として、腹腔内接種によるホルマリンの魚体への影響が考えられた。予備実験では、作製ワクチンを10 μL/魚体重(g)/尾、腹腔内に接種すると、数時間で80%のへい死を確認している。

そのため今後は、魚体に対するホルマリンの影響を少なくするために、ホルマリンの終濃度を0.1%程度に下げたワクチンを作製し、その有効性を評価していきたい。

また、無胃であるキンギョでは、経口投与した性腺刺激ホルモンがその生理活性を保持したまま、体内に取り込まれ、排卵、排精を誘起することが報告されている。

^{2), 3)} 今後は、ワクチンの接種方法として腹腔内注射だけでなく、魚体への負担の少ない経口投与についても検討し、その有効性を評価していきたい。

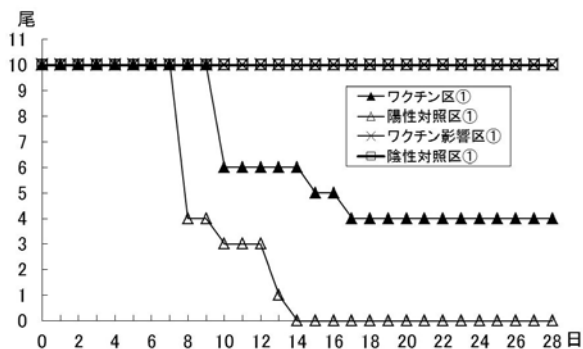


図1：GFHN 攻撃後の生残尾数の推移（ワクチン1回）

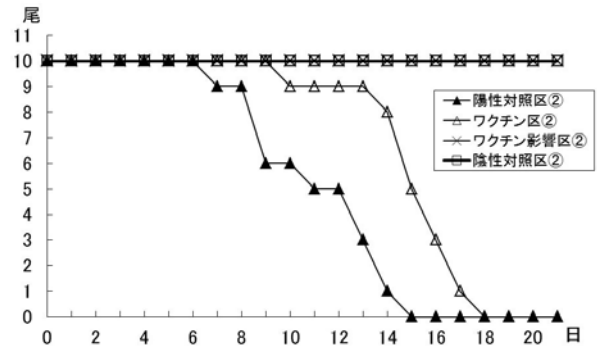


図2：GFHNV 攻撃後の生残尾数の推移（ワクチン2回）

- 1) 中西照幸・乙竹充（編）（2009）水産用ワクチンハンドブック，恒星社厚生閣，100.
- 2) Suzuki, Y., M. Kobayashi, K. Aida, I. Hanyu (1988): Transportation of physiologically active salmon gonadotropin into the circulation in goldfish, following oral administration of salmon pituitary extract. *J. Comp. physiol. B*, 157, 753-758
- 3) Suzuki, Y., M. Kobayashi., O. Nakamura, K. Aida., I. Hanyu (1988): Induced ovulation of the goldfish by oral administration of salmon pituitary extract. *Aquaculture*, 74, 379-384

新品種作出試験 (優良形質クローンの作出及びアルビノ頂天眼の作出)

澤田知希・能嶋光子・本田是人

キーワード；キンギョ，クローン，アルビノ頂天眼

目 的

県内キンギョ養殖業界は，都市化による養魚面積の減少，高齢化による労力不足等の問題を抱え，効率的な養殖手法が求められている。

キンギョ養殖では，規格外の魚を除外する選別作業を何回か行う必要があるが，規格外が少ない，歩留まりの高い系統を作出できれば，作業能率の向上につながる。そのため，クローン作出技術¹⁾を応用し，良体型，高歩留まりの系統の確立を作出する。

また，少ない養殖面積で高収益を得るためには，単価の高い希少品種を生産することが効果的であり，新品種開発に対する養殖業者の要望は強い。このため新品種の開発を行っており，これまでにアルビノリュウキン²⁾，アルビノランチュウ³⁾の開発に成功したほか，アルビノ頂天眼など新たな品種の作出を進めている。

材料及び方法

優良形質クローン作出試験

クローン作出の親魚には，平成 20 年に第 1 卵割阻止型雌性発生により作出したリュウキンと，平成 19 年に第 1 卵割阻止型雌性発生により作出した親魚を用い平成 21 年に第 2 極体放出阻止型雌性発生により作出したリュウキンの 2 系統を使用した。これらの系統の 1 尾ずつから採卵し，第 2 極体放出阻止法により発生させて，クローン候補 3 系統を作出した。これらの系統を便宜上 08-ITK5，08-ITK6，09-ITK1 とした。

発生開始後は通常どおり⁴⁾に飼育し，体長約 25 mm に達した時点で，体型測定及び尾鰭の調査を行った（平成 23 年 12 月）。⁵⁾ 全長，体長，体高，体重を計測し，尾鰭長割合，体高比，肥満度を求めた。また，尾の開き具合や奇形の有無などを調査し，そこから尾の開き正常率，製品率を求めた。

クローン化の確認は鱗移植法によって行った。⁶⁾ 飼育群の中から体色の赤い個体 3 個体，白い個体 3 個体の計 6 個体を取り上げ，赤い個体と白い個体を一組のペアとしてそれぞれの個体の鱗 2 枚をそのペアの間で交換移植した。移植後は 15℃以上で止水，微通気で飼育し，約 1

ヵ月後に移植鱗の有無とグアニン色素の脱落の有無を観察した。

アルビノ頂天眼の作出

平成 18 年にアルビノランチュウと頂天眼を交配して F1 を作出，その後継代して平成 21 年に得た F3 を用いて人工授精により F4 を作出した。また，F3 と通常の頂天眼を人工授精により交配した F1 を 2 系統作出した。通常の方法⁴⁾により飼育し，眼球の向きが真上を向く形質（頂天眼性）が良好なものを選抜した。

結果及び考察

優良形質クローン作出試験

今年度作出のクローン候補 08-ITK5，08-ITK6，09-ITK1 は鱗移植の結果，全ての個体で約 1 ヶ月後の移植鱗の脱落や移植鱗上のグアニン色素の脱落が確認された。このことから，各系統とも鱗移植は不成立と判定され，クローン化されていないことが明らかとなった。

08-ITK5，08-ITK6，09-ITK1 の体型測定の結果を表 1 に示す。3 系統中最も形質が良好な 08-ITK6 でも製品率 65.9%，体長体高比 62.5%，尾の開き正常率 75.8% であり，実用化にはさらに形質の良好な系統の作出が必要で

表 1 08-ITK5，08-ITK6，09-ITK1 の諸形質

	08-ITK5	08-ITK6	09-ITK1
試験尾数	134	132	222
体長(mm)	27.8	27.4	27.8
尾鰭長割合(%)	40.3	39.5	32.7
体高比(%)	60.4	62.5	55.9
肥満度	109.1	107.1	83.8
尾の開き正常率(%)	62.7	75.8	63.1
製品率(%)	59.0	65.9	44.6

あると考えられた。

アルビノ頂天眼の作出

アルビノ頂天眼 F4 は選別を経て体型・頂天眼性が良好な個体 71 尾を得た。F3 と通常の頂天眼を交配した F1 の 2 系統については，頂天眼性が良好な個体をそれぞれ 58 尾，28 尾得ることができた。

今年度から，頂天眼性の評価に際し，図 1 に示す指標

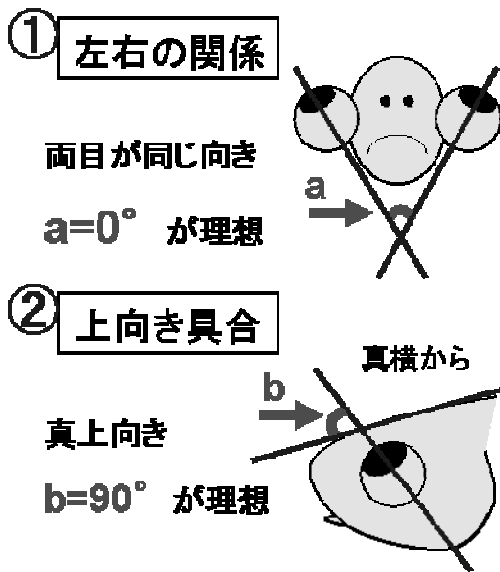


図1 頂天眼性の指標

表2 F4の頂天眼性

左右角度 (a)	上下角度(b)		計
	90°	60°	
0°	2	1	3
30°	4	10	14
60°	6	48	54
計	12	59	71

を用いることとした。選別後のF4の頂天眼性について、この指標による計測結果を表2に示す。

理想の頂天眼性は左右の眼球が同じ向きかつ真上を向いている $a=0^\circ$, $b=90^\circ$ で表される。

F4の頂天眼性は71尾中 $a=0^\circ$, $b=90^\circ$ のものが2尾、

$a=60^\circ$, $b=60^\circ$ のものが最も多く48尾となっており、今後さらに優良形質個体の選抜交配や通常の頂天眼との交配が必要と考えられた。

今回作出したF1については、継代と選抜を行い良形質系統の作出を目指す。

引用文献

- 1) 松村貴晴・山本直生・岩田靖宏 (2008) 優良形質クローン作出試験. 平成19年度愛知県水産試験場業務報告, 45-46.
- 2) 鯉江秀亮・高須雄二・村松寿夫 (1997) 交雑による新品種(アルビノリュウキン) 作出試験. 平成8年度愛知県水産試験場業務報告, 29-30.
- 3) 水野正之・鯉江秀亮・都築基 (2001) 雌性発生技術を利用したアルビノランチュウの作出. 平成12年度愛知県水産試験場業務報告, 49-50.
- 4) 松村貴晴・五藤啓二・岩田靖宏 (2006) 優良形質クローン作出試験. 平成17年度愛知県水産試験場業務報告, 41-42.
- 5) 松村貴晴・五藤啓二・岩田靖宏 (2006) 作出クローンの特性評価. 平成17年度愛知県水産試験場業務報告, 43-44.
- 6) 松村貴晴・五藤啓二・日比野学・岩田靖宏・間瀬三博 (2009) キンギョのクローン化初動判定法へのRAPD-PCR法の適用. 愛知水試研報, 15, 13-19.

(7) 観賞魚新用途開発技術試験

能嶋光子・澤田知希・本田是人

キーワード；水泡眼, 抗原抗体反応, 抗体医薬, IgM

目的

近年の金魚養殖業界は、需要の減少等により、苦しい経営を強いられている。このような状況のもと、経営を改善する手段として、キンギョの需要を増大させる観賞以外の新たな用途の開発が必要である。

キンギョの一品種である水泡眼は、眼の周囲に水泡を形成する性質をもつ。我々は、キンギョヘルペスウイルス病（以下、GFHNV 病）に対する感染と治療を経ることで、キンギョヘルペスウイルス（以下、GFHNV）に対する中和作用がこの水泡の内部に蓄積するリンパ液様の体液（以下、水泡内液）に獲得されること、またその中和作用の正体が魚類の免疫分子 IgM であることを間接蛍光抗体法による組織染色により突き止めた。^{1, 2)} このことにより、水泡眼を用いて、IgM を効率的に生産・回収できる可能性が示された。

そこで、平成 23 年度は、水泡眼が今後、有望な抗体産生動物となるかその可能性を確認することを目的とし、①水泡内液中 IgM の特定抗原に対する免疫獲得、②水泡内液由来 IgM による蛋白質定量系の確立、③水泡内液由来 IgM を用いた抗体医薬の可能性について調査した。

材料及び方法

実験 1 水泡内液中 IgM の特定抗原に対する免疫獲得 (1) 卵白アルブミン

卵白アルブミンを抗原として水泡眼に投与し、水泡内液中に抗原特異的な IgM が得られるかどうか ELISA 法により確認した。免疫誘導は注射法により行い、25 μ g/魚体重(g)を腹腔内（腹腔内区：5 尾）、水泡内（水泡内区：5 尾）、筋肉（筋肉区：5 尾）に 2 週間間隔で 2 回投与し、いずれにより有効な IgM が得られるかを比較した。同様に水泡内に PBS (-) を投与したものを対照区（5 尾）とした。なお、ELISA には各試験区から得られた水泡内液（40 倍希釈）と、抗コイ IgM マウスモノクローナル抗体、ビオチン標識抗マウス IgG ヤギ抗体を用い、水泡内液中の抗アルブミン抗体価を測定した。

(2) VAP2

他の蛋白質でも同様に、水泡内液中に抗原特異的な IgM が得られるかを VAP2（ニシダイヤガラガラヘビ由来

の出血性毒素 名古屋大学提供）を抗原として調べた。VAP2 の投与は注射法により行い、2.5 μ g/魚体重(g)を水泡内に 2 週間間隔で 2 回投与した（VAP2 区：5 尾）。同様に、水泡内に PBS (-) を投与したものを対照区（5 尾）とした。なお、ELISA には両試験区から得られた水泡内液（40 倍希釈）と、抗コイ IgM マウスモノクローナル抗体、ビオチン標識抗マウス IgG ヤギ抗体を用い、水泡内液中の抗アルブミン抗体価を測定した。

実験 2 水泡内液由来 IgM による蛋白質定量系の確立

(1) 卵白アルブミン

実験 1 (1) で得られた抗体と抗コイ IgM モノクローナル抗体を用いて抗原である卵白アルブミン検出系の構築を試みた。卵白アルブミン溶液の 3 倍希釈系列を作成したものを、96 穴シャーレに固相化し、1/40 倍に希釈した各水泡内液と抗コイ IgM マウスモノクローナル抗体、ビオチン標識抗マウス IgG ヤギ抗体を用い、ELISA 法により水泡内液中の抗アルブミン抗体価を測定した。また、対象となる卵白アルブミンを正確に測定できているかを、ウエスタンブロッティング法を用いて検証した。

(2) VAP2

実験 1 (2) で得られた抗体と抗コイ IgM モノクローナル抗体を用いて抗原である VAP2 の検出系の構築を実験 2 (1) と同様の方法で試みた。

実験 3 水泡内液由来 IgM を用いた抗体医薬の可能性

特定の病原体（GFHNV）に対する IgM を水泡眼に大量生産させ、それを用いた受動免疫による予防、治療への応用について可能性を検討した。

(1) IgM の作成

GFHNV のホルマリン不活化ワクチン（以下ワクチン）は ARF 細胞で培養し、上清を遠心分離後、上清に終濃度 0.3% となるようにホルマリンを加え、4 $^{\circ}$ C で 2 晩おいたものを用いた。なお、遠心分離後のウイルス上清のウイルス感染価は 3.8 log TCID₅₀/mL であった。供試魚は水試内で生産した GFHNV に感染歴のない水泡眼（3 歳魚、平均魚体重 86.4 g/尾）を 5 尾用いた。ワクチンは 5 μ L/魚体重(g)/尾、腹腔内注射により接種した。ワクチン

接種 14 日後に再度、同量のワクチンを、腹腔内注射により接種した。最初の接種から 4 週間後に水泡内液を全量採取し凍結保存した。また、採取した水泡内液と GFHNV 病に罹患したキンギョの腎臓塗抹標本を用い、間接蛍光抗体法による組織染色で IgM の存在を確認した。

(2) IgM の投与

①腹腔内投与

(1) で作成した水泡内液を別の個体に腹腔投与し、抗体が体内に取り込まれるかを間接蛍光抗体法により調査した。供試魚は水試内で生産した GFHNV に感染履歴のない水泡眼 (1 歳魚 平均魚体重 2.8 g/尾) を各試験区 5 尾用いた。試験区は、IgM 接種区、陽性対照区 (非免疫魚由来水泡内液の投与) とした。投与は、腹腔内に 100 μ L/g (魚体重) となるように 2 日間接種した。

②IgM 餌料投与

(1) で作成した水泡内液を、別の個体に餌に混ぜて経口投与し、抗体が体内に取り込まれたかを間接蛍光抗体法により調査した。餌料は、アユ用配合飼料 (日本配合飼料) に、免疫魚由来水泡内液を重量比 1:1 で混ぜたものを、IgM 餌料、非免疫魚由来水泡内液を重量比 1:1 で混ぜたものを非 IgM 餌料とした。供試魚は水試内で生産した GFHNV に感染履歴のない水泡眼 (1 歳魚 平均魚体重 2.8 g/尾) を各試験区 5 尾用いた。試験区は、IgM 餌料投与区、非 IgM 餌料投与区とした。作成した餌料は、2 % /g (魚体重) となるよう毎日投与した。

(3) IgM の体内への取り込みの確認

腹腔内投与または餌料投与 7 日目に各試験区から水泡内液を採取し、GFHNV 病に罹患したキンギョの腎臓塗抹標本を用い、間接蛍光抗体法による組織染色で IgM の存在を確認した。

(4) 人為感染

①腹腔内投与

ワクチンを水泡内に投与して免疫を誘導した水泡眼から回収した水泡内液を別個体の腹腔内に投与することにより、GFHNV の治療効果が得られるかを検討した。投与は人為感染 20 時間後に行い、実験 3(1) で作成した免疫水泡内液由来 IgM を腹腔内に注射法により 100 μ L/g (魚体重) 投与した (腹腔内投与区)。また、陽性対照区として非免疫水泡眼由来の水泡内液を腹腔内に同様に投与した。人為感染はキンギョを水槽から取り上げて麻酔し、尾ビレにウイルス液を滴下し、(10 μ L/魚体重 \cdot g)、3 分間放置後に元の水槽へ戻す方法で行った。ウイルス攻撃に用いたウイルス液の感染価は、 1×10^5 logTCID₅₀/mL であった。攻撃後は各試験区とも 25 $^{\circ}$ C の止水で飼育し、給餌は週 5 回、アユ用配合飼料 (日本配合飼料) を 1 %

魚体重 / d 投与した。毎日観察してへい死数をカウントするとともに、へい死魚は蛍光抗体法によりへい死の原因を確認した。

②餌料投与

実験 3(1) で作成した免疫水泡内液由来 IgM と餌料を重量比 1:1 で混ぜた餌料 (IgM 餌料) を人為感染後に投与することにより、GFHNV 病の治療効果が得られるかを検討した。なお、IgM 餌料は人為感染 20 時間後から魚体重あたり 2 % となるように毎日投与した。

結果及び考察

実験 1 水泡内液中 IgM の特定抗原に対する免疫獲得

①卵白アルブミン

ELISA の結果を図 1 に示す。水泡眼に卵白アルブミン (抗原) を投与することにより、卵白アルブミンに対する抗原特異的な IgM が得られることを確認した。また、投与部位の比較では、水泡内に投与した場合に最も抗体価が高くなり、水泡内に抗原を投与するのが最も効率的であると考えられた。

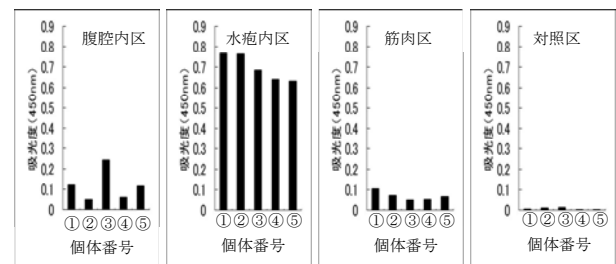


図 1 抗卵白アルブミン抗体価

②VAP2

ELISA の結果を図 2 に示す。水泡内区は対照区に比べて高い抗体価を示し、水泡内に抗原 (VAP2) を投与することにより、水泡内液に抗原特異的な抗体が産生されることを確認した。

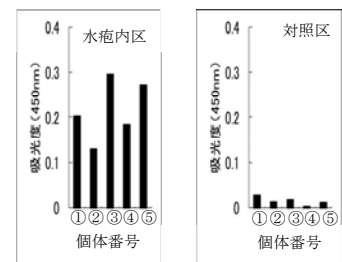


図 2 抗 VAP2 抗体価

実験 2 水泡内液由来 IgM による蛋白質定量系の確立

①卵白アルブミン

実験 1 (1) で得られた抗体 (40 倍希釈) と抗コイ IgM モノクローナル抗体を用いて標準曲線を作製した結果、0.002~2 mg/mL の卵白アルブミンを測定できる標準曲線を得ることが出来た (図 3)。なお、ウエスタンブロッティング法により作製した抗体が卵白アルブミンを正確に測定できていることが確認できた。

②VAP2

実験1(2)で得られた抗体(40倍希釈)と抗コイIgMモノクローナル抗体を用いて標準曲線を作製した結果、0.001~1 mg/mLのVAP2を測定できる標準曲線を得ることが出来た(図4)。

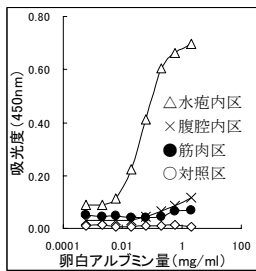


図3 抗卵白アルブミン標準曲線

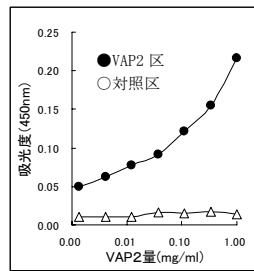


図4 抗VAP2標準曲線

実験3 水泡内液由来IgMを用いた抗体医薬の可能性

(1) 作成IgMの魚体内への取り込み

ワクチンを水泡内に接種し、免疫誘導した個体から採取した水泡内液とGFHNV病に罹患したキンギョの腎臓塗抹標本を用い、間接蛍光抗体法による組織染色でIgMの存在を確認した。その結果、GFHNVに反応する抗体の存在が確認された(図5)。

しかし、この水泡内液を別の魚の腹腔内に投与した場合、投与した魚の血清中や水泡内液中に抗体が取り込まれたことは確認できなかった(図6, 7)。また、IgM餌料を経口投与した場合も同様に抗体の体内への取り込みは確認できなかった。



図5 免疫誘導魚



図6 腹腔内投与(血清)

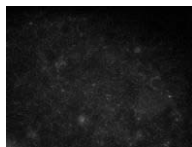


図7 腹腔内投与(水泡内液)

(2) 人為感染

①水泡内液由来IgMの腹腔内投与

人為感染実験の結果を図8に示す。対象区では、人為感染17日後からへい死が始まり、22日後に全ての魚がへい死した。一方、水泡内液由来IgMを投与した区では、人為感染23日後においてもへい死は見られなかった。

なお、へい死魚は間接蛍光抗体法で重度のGFHNV病と診断された。

以上により、水泡内液由来IgMを腹腔内投与することで、GFHNV病の発症を抑制できることが示唆された。

②水泡内液由来IgMの餌料投与

人為感染実験の結果を図9に示す。IgM餌料を投与した区では、人為感染5日後からへい死が始まり、14日後に全ての魚がへい死した。また、通常の餌料を投与した区では人為感染7日後からへい死が始まり、人為感染14日後に全ての魚がへい死した。へい死魚は間接蛍光抗体法で重度のGFHNV病と診断された。

以上により、今回の実験ではIgM餌料投与によるGFHNV病の治療効果は認められなかった。

IgM餌料の効果が確認できなかった原因としてIgMの飼育水中での溶出、体内での消化などが考えられ、魚体内に抗体が十分取り込まれなかった可能性がある。

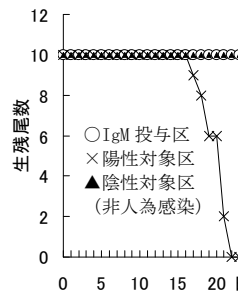


図8 生残尾数の推移 (IgM腹腔内投与)

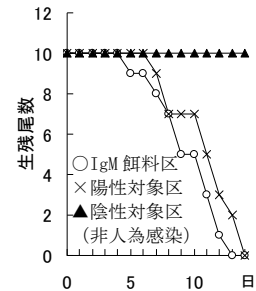


図9 生残尾数の推移 (IgM餌料投与)

まとめ

実験1, 2により、水泡眼が有望な抗体産生動物になる可能性があると考えられた。

実用化に向けては、生きたままIgMを回収できる水泡眼の最大の特徴を生かし、長期にわたって安定したIgM量を回収する技術や、IgM産生量を増加する技術を開発する必要がある。今後は抗原量、免疫回数の検討、抗原接種後のIgM産生の推移を明らかにするとともに、確実に体内に取り込ませる抗体餌料作成方法についても検討していきたい。

なお、本研究は(独)科学技術振興機構 研究成果展開事業 研究成果最適展開支援プログラム(A-STEP) フィージビリティスタディ【FS】ステージ 探索タイプにおける成果である。

引用文献

- 1) 松村貴晴・能嶋光子・田中健二(2010) 観賞魚新用途開発技術試験. 平成21年度愛知県水産試験場業務報告, 44-45.
- 2) 松村貴晴・能嶋光子・田中健二(2011) 観賞魚新用途開発技術試験. 平成22年度愛知県水産試験場業務報告, 47-48.

(8) 希少水生生物増殖技術開発試験

服部克也・高須雄二・鈴木貴志

キーワード；ネコギギ，ペアリング，産卵，仔魚

目的

ネコギギは国の天然記念物に指定されている淡水魚で、伊勢湾及び三河湾に注ぐ河川にのみ生息している。三河湾に流下する豊川水系においては、生息環境等の変化に伴い、その個体数が減少する可能性があるため、遺伝資源保護の観点から、ネコギギの人工繁殖が必要とされている。このため、ネコギギの人工繁殖を可能とする成熟、産卵、仔魚の飼育等に関する手法を開発する。

材料及び方法

平成 22 年度の産卵試験に供した 3 年魚 (C1 グループの雄 5 個体, C2 グループの雌 10 個体) を養成親魚として用いた。平成 22 年度の産卵試験で LHRHa (黄体形成ホルモン放出ホルモン・アナログ) のコレステロールペレットを投与した雌 5 個体については、平成 23 年度も同様に LHRHa のコレステロールペレットを体側筋に埋設投与した。平成 22 年度は、ペレットを挿入した切開部を瞬間接着剤で縫合したが、短時間で切開部が開き、ペレットが体内に留まっていたかが不明となった。このため、平成 23 年度は、22 ゲージの注射針の先端部にペレットを装着し、これを体側皮下に刺し入れて、シリンジに満たした PS (生理食塩水) で押し入れる方法とした。投与量は、体重 (g) 当たりペレット 30 μ g を目安とした。投与は、産卵期の 1 カ月前に行った。また、平成 22 年度の報告において、新月または満月の前後で、照度の低下が起こった場合に産卵例が多い傾向が見られたことから、産卵期には新月または満月から 5 日間水槽を寒冷紗で覆い照度を下げた。LHRHa を投与した個体については、それぞれ C1 グループ雄 1 個体を収容した 3 つの水槽で、ペアリング I (雌 1 個体)、ペアリング II (雌 1 個体)、ペアリング III (雌 3 個体) として同居飼育した。また、対照として、昨年度 LHRHa を投与しなかった雄 1 個体 \times 雌 3 個体の組み合わせ (ペアリング IV)、雄 1 個体 \times 雌 2 個体の組み合わせ (ペアリング V) を設定し、昨年度産卵期から同居飼育した。

蓄養親魚として、B 淵 5 個体 (雄 3 個体: 7BM, 8BM, 9BM, 雌 2 個体: 7BF, 10BF)、C 淵 9 個体 (雄 8 個体: 1CM, 2CM, 3CM, 5CM, 6CM, 10CM, 11CM, 12CM, 雌 1 個体: 3CF) の計

14 個体を継続飼育していたが、10BF は横臥するなど活性が低下し、ペアリングに供試できた蓄養親魚の雌は 7BF 及び 3CF の 2 個体のみであった。この 2 個体は、昨年度の産卵試験後から相性の良い雄 (7BF は 9BM, 3CF は C2 グループの雄 1 個体) と同居飼育した。

飼育水槽には、市販の観賞魚飼育用上面ろ過装置を設置して循環ろ過飼育とした。餌は、冷凍のアカムシ (クリーン赤虫, キョーリン製) を残餌が出ない程度に毎日給餌した。ペアリング時期には外部形態を観察し、雌では腹部の腫脹で成熟度を推定した。ペアリングは自然産卵の状態で産卵させることを優先して、産卵期の後半まで産卵に至らない場合は、動物用胎盤性生殖腺刺激ホルモン (ゴナトロピン 3000, あすか製薬, 以下ゴナトロピン) を体重 (g) 当たり 10~20 単位を腹腔内注射した。なお、ゴナトロピンは、新月または満月の 2~4 日前を目安に投与した。産卵が確認された場合は、親魚を水槽から取り上げ、卵の水カビ付着防除のためふ化まで用法に従って卵をプロノポール (ノバルティスアニマルヘルス株式会社, パイセス) で薬浴した。卵、ふ化仔魚は流水管理した。ふ化仔魚にはアルテミアのふ化幼生を約 30 日間飽食量給餌し、その後は細切した冷凍アカムシを給餌して養成した。

結果及び考察

平成 23 年度は 5 月に入った段階で、室温の上昇を空調により制御したことから、図 1 に示したとおり、水温は 25°C を越えることはなかった。

5 月 20 日に C2 グループの雌 5 個体に注射針により皮下埋設投与を行った。投与時に成熟の兆候が見られたのはペアリング I に用いた 1 個体 (成熟度 1+) のみであった。平成 23 年度の投与においては、針先にペレットが

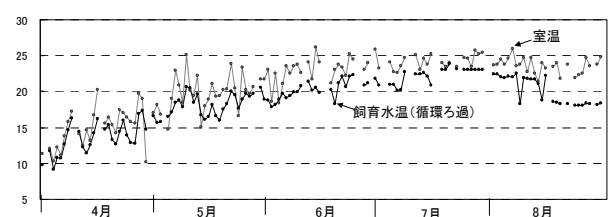


図 1 室温及び飼育水温 (循環ろ過水槽)

固着し、PS ではペレットを体内に押し入れることができなかった。このため、針先でペレットを皮下にこじ入れたが、微量なペレットの挿入であり、血液などでペレットが判別できなくなった。確実に投与するためには筋肉ではなく、アジュバントなどの利用でLHRHaを腹腔内に貯留させることも考えられ、投与方法は今後の課題と思われた。

ペアリングⅠの個体は、6月10日には体重15.2g、成熟度2+、6月23日には成熟度3と順調に体重が増加し、腹部の腫脹は大きくなった。その後、新月2日前の6月29日、寒冷紗での照度低下処理を行っていない状態で産卵が行われ、雄との交尾行動も観察された。産卵は、循環ろ過方式の飼育水中で行われ、放卵数は474粒であった。しかしながら、発眼が確認された卵はわずか5粒であった。碧南海浜水族館でも循環ろ過方式の水槽での産卵では受精率、ふ化率が極めて低いことなどから、飼育水中の窒素化合物や低いpHなどが精子の活性を低下させ、受精率の低下を招いている可能性が考えられ、ペアリング水槽については全て7月6日から流水管理に変更した。飼育水の水温は、注水の水温が19℃であることから、石英管ヒーター(500W)で加温することとし、昼間は23℃、夜間は19℃となるようにタイマー(8時ON、17時OFF)をセットして、河川での水温の昼夜変動を演出した。発眼卵からは4個体がふ化し、アルテミア、細切アカムシを給餌して養成したものの、12月には2個体となった。ペアリングⅡ及びⅢについては、水槽外からの観察で、7月までに腹部の腫脹から成熟度は2程度まで進んでいると思われたが、産卵行動が行われなかったことから、7月14日に雌4個体にゴナトロピンを10単位/体重g投与した。その後も産卵行動はなく、腹部の腫脹も縮小傾向であったため、産卵に向けた処理の継続を断念した。また、ペアリングⅣ及びⅤについては、5月26日に成熟度1と判定されたのが2個体、成熟度0が3個体であった。その後、7月11日には成熟度4が1個体、成熟度3-が1個体、成熟度2+が2個体、成熟度1+が2個体となったものの、産卵は行われず、7月中下旬には腹部の腫脹は縮小した。

循環ろ過方式でペアリングしていた7BFについては、6月中旬まで腹部の腫脹が発達することなく経過していたが、6月下旬から急速に腫脹が大きくなった。しかしながら、産卵行動は行われず、腫脹も縮小傾向となった。その後、流水掛け流し方式、ヒーターによる水温管理を行ってペアリングを継続、7月下旬に縮小していた腫脹が再度大きくなる傾向が認められたため、新月(8月1日)4日前の7月28日にゴナトロピンを20単位/体重g

投与した。翌日の7月29日には産卵行動が行われ、319粒の放卵が確認された。このうちふ化したのは30個体、12月に24個体となった。3CFについては、5月下旬から腹部の腫脹が確認され、成熟度2程度と判定された。その後、腫脹は大きくなり7月上旬には成熟度4となった。しかしながら、7BF同様に7月上旬から腫脹の縮小が見られ、8月上旬には縮小していた腫脹が再度大きくなる傾向が認められたため、満月(8月15日)の3日前の8月12日にゴナトロピン20単位/体重gを投与した。翌々日の8月14日には産卵行動が行われ、896粒の放卵が確認された。このうちふ化したのは31個体、12月に15個体となった。

平成23年度は、産卵刺激として月齢と照度低下を組み合わせる方法を検証したが、照度低下の処理を行っていない期間に産卵が行われたことから、ネコギギの産卵効率を高める方法として、照度低下の効果は低いと判断された。一方、新月及び満月前に産卵したことで、月齢を目安に産卵率を向上できる可能性が認められた。このため、昨年度の検討に用いた12例(三河一宮指導所、碧南海浜水族館)の産卵に、平成23年度の三河一宮指導所での3例、碧南海浜水族館での4例の産卵を加え、19例の産卵で月齢と産卵頻度を調べ、図2に示した。半月の時期前後の産卵例は少ないものの、新月、満月前後の産卵が多く、特に新月前後数日間に頻度が高い傾向が認められた。

飼育環境下では、自然環境下で起こる変化の多くがスポイルされてしまうことから、確実に産卵させるための方策として、スポイルされない刺激の中から効果的なものを選択利用する必要がある。その刺激には月齢を目安として、排卵促進ホルモンの投与することが効果的と思われる。なお、ゴナトロピンの投与量を20単位/体重gを投与した個体で産卵し、10単位/体重gを投与した個体では産卵しなかったことから、ネコギギに効果的なゴナトロピン投与量は20単位/体重gと思われた。また、受精率、ふ化率を低下させないために、ペアリングは循環ろ過方式ではなく流水管理とし、水温はヒーターで加温、スイッチのON、OFFで昼夜変動を演出することが必要と思われた。

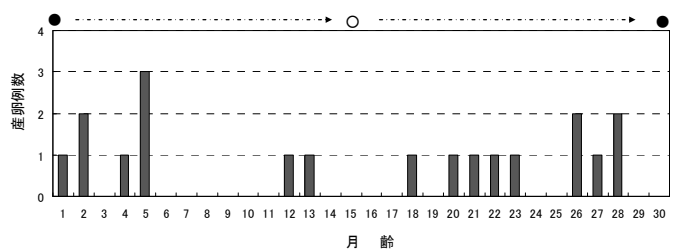


図2 月齢と三河一宮指導所、碧南海浜水族館での産卵例数

3 水産資源調査試験

(1) 漁場調査試験

漁場調査

青山高士・白木谷卓哉・大澤 博・塩田博一
壁谷信義・松本 敏和・松澤忠詩・古橋 徹

キーワード；魚礁，利用状況

目的

渥美外海沿岸域及び内湾域に設置されている魚礁の利用状況を調査し，効果的な魚礁を設置するための基礎資料とする。

方法

漁業調査船「海幸丸」75トンを用いて月1回，魚礁周辺における漁船の操業実態をレーダー及び目視で調査した。

結果

各魚礁周辺海域での漁業種類別操業隻数を表に示

した。伊勢湾南部のコボレ礁・沖ノ瀬は一本釣り操業のみ確認され、延べ隻数は91隻であった。渥美外海赤羽根沖の比較的水深の浅い黒八場・高松の瀬の周辺（水深約20-30m）では、船びき網が延べ135隻と多いが、操業は8月と12月のみ確認された。渥美外海赤羽根沖の水深のやや深い人工礁・沈船礁（水深約50-100m）では、一本釣りが延べ20隻、底びき網が延べ19隻とほぼ同数であった。渥美外海豊橋沖の鋼製魚礁・東部魚礁は船びき網が延べ隻数150隻と多く、底びき網は46隻であった。月別では、6月に延べ170隻、8月に延べ139隻と多く、全体として春夏期に操業が多いことが示唆された。また、各魚礁の合計操業隻数は538隻と欠測はあったものの、昨年（769隻）に比べやや少なめであった。

表 魚礁周辺海域の漁業種類別操業隻数

月		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計	
航海回数		1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	11	
日数		2	2	2	2	2		2	2	2	2	2	2	22	
魚	コボレ礁 沖ノ瀬漁場	調査回数	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	11	
		一本釣り	20	20	6	3	10		5	12		3	3	9	91
		底びき網													0
		船びき網													0
	集計数	20	20	6	3	10	0	5	12	0	3	3	9	91	
	黒八場 高松の瀬	調査回数	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1		10
		一本釣り	20	4	2	4	17			1	1				49
		底びき網		11			12								23
		船びき網									30				30
		刺し網													0
	集計数	20	15	2	16	122	0	0	1	31	0	0	5	212	
	人工礁漁場 沈船礁漁場	調査回数	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1		10
		一本釣り			12	8									20
		底びき網	6									3	4	6	19
		船びき網													0
		まき網													0
集計数	6	0	12	8	0	0	0	0	0	3	4	6	39		
鋼製魚礁 東部魚礁	調査回数	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1		10	
	一本釣り													0	
	底びき網	7	2		14	7					1	5		46	
	船びき網			150										150	
	まき網													0	
集計数	7	2	150	14	7	0	0	0	0	1	5	0	10	196	
月別集計数		53	37	170	41	139	0	5	13	32	11	7	30	538	

内湾再生産機構基礎調査

青山高士・大澤 博・塩田博一・壁谷信義
松本敏和・松澤忠詩・古橋 徹

キーワード；カタクチイワシ，産卵調査，水温

目 的

伊勢湾及びその周辺海域は，本県にとってカタクチイワシの主要な産卵場となっている。そこで，この海域のカタクチイワシ卵の分布調査を行い，シラス漁況の短期予測の資料とする。

(2) 海況

伊勢・三河湾の表面水温の年偏差を図4に示した。水温は月により大きく変化しており、4月、9月で低め、6月、8月、10月で年並み、5月、11月でやや高めから高め、7月は日照の影響から極めて高めであった。

材料及び方法

調査は，図1に示した19定点（伊勢湾15点，三河湾4点）で，4～11月の各月中または下旬に改良ノルパックネット鉛直びきによる卵採集とCTDによる観測を行った。

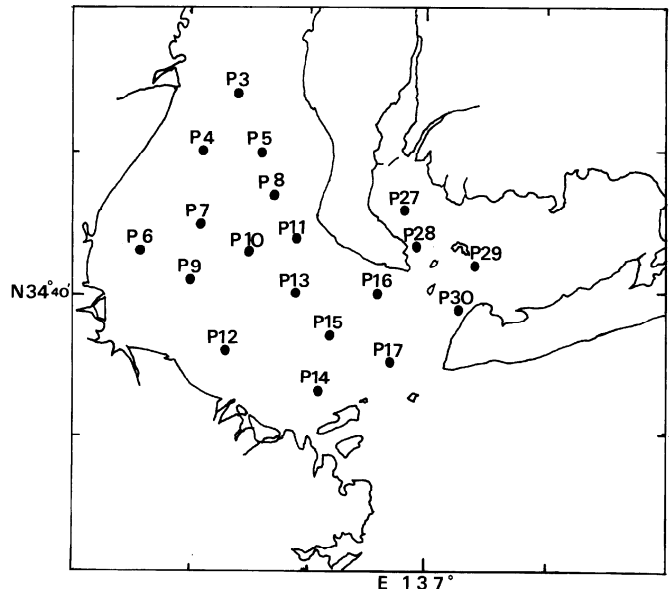


図1 カタクチイワシ卵採集調査点

結 果

(1) カタクチイワシ卵の月別出現状況

平成23年の月別，定点別の卵採集数を表に，平成21～23年の月別卵採集数を図2に，平成13～23年の年間採集数を図3に示した。

平成23年の年間採集卵数は8,696粒と，過去10年平均（9,023粒）と比較して同程度であった（表，図3）。例年出現が増加する6月から8月における出現量は6,520粒と過去10年平均（7,500粒）よりやや少なめであった。

表 カタクチイワシ卵月別出現状況（粒／曳網）

月	St	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P27	P28	P29	P30	合計
H23.	4										3			1		3					7
	5		1	7	14	9	42	16	40	27	60	67	127	957	63	161	5	2	1	31	1,630
	6	121	48	43	130	172	184	393	465	138	59	312	57	291	207	149		6	3	18	2,796
	7	8	248	6	23	409	152	106	570	14	265	945	58	670	47	44	3		6		3,574
	8	2	13		14	47	2	21	25	6	2	34		3	17						186
	9	3		4	96	194	2	26	48			31	21	1	1	1					428
	10	1				3	3	3	2	1					1					3	17
	11		8	6		13	5			1		2					5	4	6	8	58
	合計	135	318	66	277	847	390	565	1,150	187	389	1,391	263	1,923	336	358	13	12	19	57	8,696

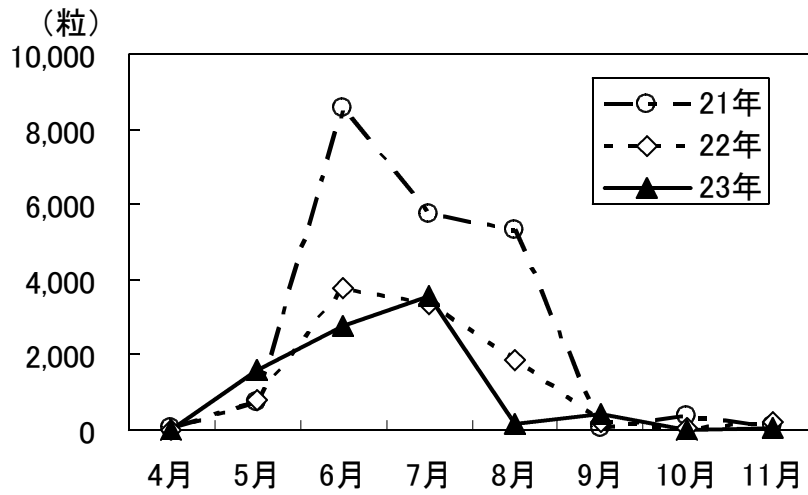


図2 カタクチイワシ卵月別採集数

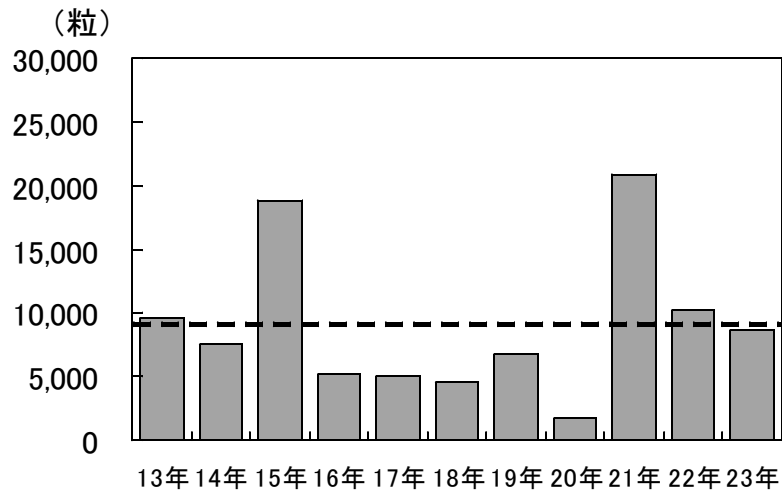


図3 カタクチイワシ卵年間採集数 (点線は平成13~22年平均)

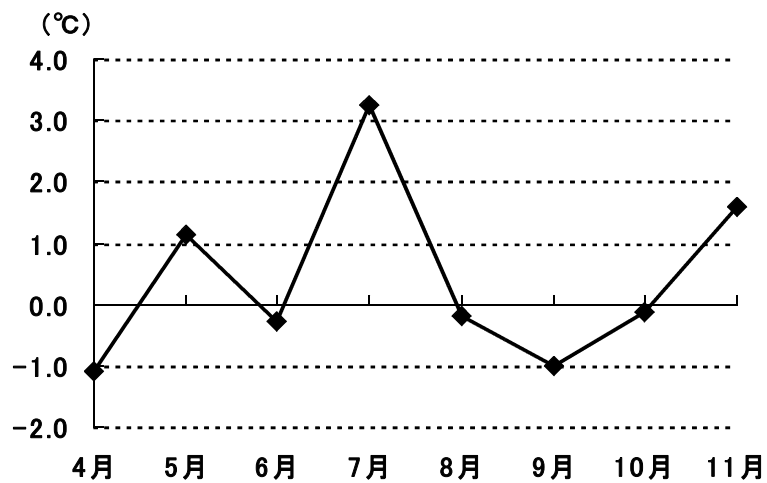


図4 平成23年の伊勢・三河湾表層水温の平年偏差 (平成13~22年)