

増養殖研究レター

第2号（2012年2月）



JICA 受入研修生実習風景

編集 増養殖研究所



独立行政法人
水産総合研究センター

巻頭言

- 先端技術を用いて魚病の予防と被害軽減をめざす 3

研究情報

- 病気に強いヒラメをつくる
ー遺伝子解析を用いた育種方法の開発ー 4
- カンパチのキリキリ舞い病の原因を探る
ー意外!! 犯人はカビの仲間ー 5
- ブリ黄疸病の克服
ー遺伝子組み換え技術を用いたワクチン開発ー 6
- 海外からの伝染病を防ぐために
ーリスク評価法を用いた危機管理ー 7

所の動き

- 新体制のもと研究開発推進会議を開催しました 8

表紙写真説明

平成21年11月25日～12月25日の間、魚病診断・研修センターにて、トルコ農業・地方省農業研究局地中海水産研究・生産・研修センター魚病診断員をJICAからの依頼研修生として受け入れました。

写真はウイルス分離作業中の様子です。

先端技術を用いて魚病の予防と被害軽減をめざす

(病害防除部長：乙竹 充)



増養殖研究所では、魚介類の病気による被害を低減するために、全国対応の研究を続けています。本号では、その中から最新の研究課題4つをと

りあげ、御紹介いたします。いずれも、都道府県や大学との共同研究で、効率的な研究の推進を目指しています。

最初の尾崎らの「病気に強いヒラメをつくる」では、遺伝的に病気に強い家系（抗病性系統）の樹立を効率的に行う「マーカー選抜育種」の現状を御紹介します。この方法を利用しますと、耐病性に複数の遺伝子が関わっている場合でも、あるいは、耐病性と高成長のような複数の優良な性質を目指す場合にも、従来の方法に比べて格段に短期間に目的とする系統を作製する事ができます。耐病性系統の育種（いわゆる品種改良）は、農作物や家畜では、病気に対する最も効果的な対策の一つであり、水産においてもその成果が期待されます。

当所ではマーカー選抜育種とは別の方法でも耐病性系統の樹立を目指しています（<http://www.fra.affrc.go.jp/pressrelease/pr23/230929-3/index.html>）。

2 題目の三輪らの「カンパチのキリキリ舞い病の原因を探る」では、当所で新たに発見した病気を御紹介します。当所の魚病診断・研修センターには、都道府県の魚病担当部署から毎年40件ほどの不明病の診断依頼があ

り、その中から世界初あるいは国内初の病原体が発見されています。これまでに、世界的な重要疾病である、マダイイリドウイルス病やクルマエビの急性ウイルス血症、魚介類のフランシセラ症等を世界に先駆けて発見し、報告しています。また、去年は、世界的に重要な疾病であり国際獣疫事務局への届け出が義務づけられているアワビのキセノハリオチス症を、国内で初めて見つけ、現在日本産アワビに対する病原性を調査中です。

3 題目の中易らの「ブリ黄疸病の克服」では、新たな水産用ワクチンの作製技術を御説明します。現在、魚用のワクチンは、その病気の原因である病原体を、工場で大量に培養して作製しています。そのため、病原体を大量に培養できない病気に対しては、ワクチンを作製できません。魚介類の病気には病原体を培養出来ないものも多く、これらの病気に対するワクチン開発が行き詰まっていました。そこで中易らは、病原体が培養できない病気に対するワクチンを、病原体の遺伝子情報から作製する新たな方法を開発中です。

最後の湯浅らの「海外からの伝染病を防ぐために」では、海外伝染病（国内に未侵入の病気）への対策として、水産分野では比較的新しい概念である「リスク評価法」を分かりやすく御説明します。

当所では、今回御紹介する4課題以外にも、ハタ類種苗の安定生産のためのVNNウイルスの高感度検出法の開発や、ヒラメクドア症に関する検査法の開発や防除法に関する研究、震災対策としても重要なマガキヘルペスウイルス症の病原体調査、KHV病やエドワジエラ症等の詳細研究など、多くの調査研究を実施中です。

病気に強いヒラメをつくる ー遺伝子解析を用いた育種方法の開発ー



(養殖技術部：尾崎照遵)

養殖生け簀の魚がある病気にかかった場合、全部の魚が死ぬわけではありません。その中で生き残った魚はその病気に強い遺伝子（抗病性遺伝子）を持っていると考えられます。この遺伝子がどの染色体のどこにあるか（遺伝子領域）を特定の目印（DNAマーカー）を用いて探しだすことが出来れば、後はそのDNAマーカーを使って抗病性遺伝子を持つ魚を選び育てること（選抜育種）でその病気に強い魚を作り出すことが出来ます。

私たちは、ヒラメ養殖において大きな魚病被害をもたらしているレンサ球菌症（病原菌 *Streptococcus iniae*）に注目し、DNAマーカーによる遺伝連鎖解析^{注1}を行うことにより、レンサ球菌症に対するヒラメの抗病性遺伝子領域を特定し、これら抗病性候補領域を指標として病気に強いヒラメの選抜育種を行いました。この方法を応用することで、病気に強いだけでなく、成長が良い、高温にも耐えることが出来るなどといった複数の優良形質を備えたテーラーメイド育種（養殖現場の要望に合わせた形質を組み合わせた魚の系統をつくること）も可能になるものと考えています。

方法は、まず解析家系の中からレンサ球菌症に対して比較的高い生存率を示す系統と、高い

死亡率を示す系統を交配して作った種苗（雑種第一代（F1））をレンサ球菌症に感染させ、魚の生き残りの数及び死亡日までの経過日数のデータを得ました。これら感染実験データと、私たちが作成したヒラメ遺伝子地図をもとに全ての遺伝子領域をカバーできるように選び出したDNAマーカーとの関係を詳細に解析した結果、4つの連鎖群^{注2}でレンサ球菌症に対する抵抗性に関係すると思われる遺伝子の領域を見つけることが出来ました。

次に、これらの連鎖群の抗病性候補領域をターゲットとしてマーカー選抜育種を行った個体を用いて実証試験を行いました。解析家系F1の兄弟個体の遺伝子解析からそれらの遺伝情報を確認し、抗病性の遺伝子型を持つ魚同士と、抗病性の遺伝子型を持たない魚同士を親にして交配を行い、雑種後代（F2）におけるレンサ球菌症に対する感染実験を行なったところ、抗病性遺伝子を持つ魚同士を親にした試験区（図：■緑）が、抗病性遺伝子を持たない魚同士を親にした試験区（図：▲黄）及び一般の種苗の試験区（図：●青）より実際に抗病性が高いことが確認されました。今後は実際の生産種苗においても交配実験を行い、現場での実用性の検討を行なうことを予定しています。

このような、遺伝子情報を利用したマーカー選抜育種法は、魚種や、ウイルス性疾患、細菌感染症、寄生虫などの症例を問わず適用できるため、今後の魚病対策においても重要な役割を果たすと考え研究を進めています。

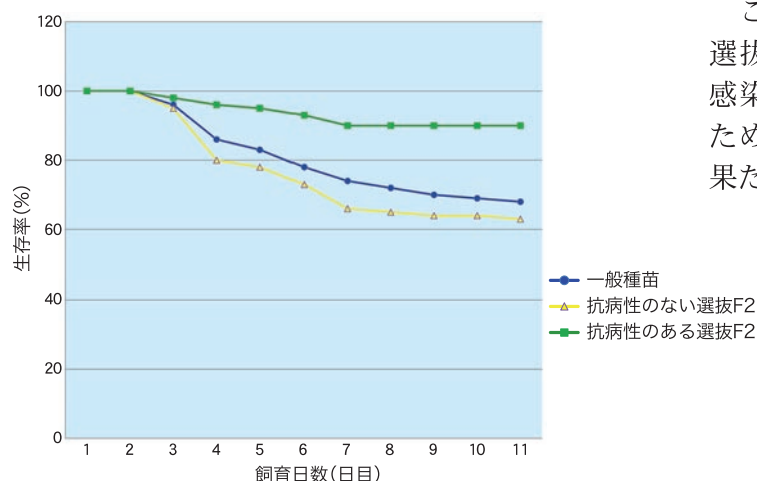


図1. マーカー選抜育種による感染実験結果

注1 遺伝連鎖解析 注2 連鎖群

連鎖とは同一染色体上に互いの遺伝子が位置するため、遺伝子が共に子孫に伝わり、独立した分離が認められない状態。この状態にある遺伝子群を連鎖群と呼ぶ。連鎖解析はDNAマーカーを利用して探索する遺伝子の位置を確定する分析。

カンパチのキリキリ舞い病の原因を探る —意外!! 犯人はカビの仲間—

(病害防除部：三輪 理)



10年以上前から、中国海南島から国内の養殖場へ導入されたカンパチが異常な旋回遊泳をしながら死亡する事例が知られており、カンパチのキリキリ舞いと称されていました。しかし被害がそれほど大きくなかったことから原因の追究はされてきませんでした。ところがここ数年日本の養殖場への導入直後に本疾病で大量死を起こす事例があり、病害防除部と魚病診断・研修センターでは鹿児島県水産技術開発センターの協力を得て原因究明に取り組みました。

微生物学的検査では病魚からは特に病原細菌やウイルスは分離されず、また臨床観察で病魚に共通する寄生虫も認められませんでした。しかし病理組織学的観察により、病魚の脳の延髄から脊髓前端部を中心に激しい炎症と神経組織の変性が観察されました。延髄には運動に関与する神経細胞が集まっているため、この障害によってキリキリ舞いが起こるものと思われました。さらに病変部ではところどころに微胞子虫の胞子と思われる微小な寄生体が観察されました(図1)。次に胞子殻を蛍光染色することが知られているUvitex 2Bで切片を染色して観察したところ、炎症の中心部や変性した神経細胞内に高頻度で胞子が観察されました(図2)。そこで病変部から微胞子虫のリボゾーム遺伝子のユニバーサルプライマーを用いてPCRによる増幅を試みたところ、案の定、未報告の微胞子虫の遺伝子が検出されました。次に、この遺伝子を標的としたプローブを作成し、組織切片で *in situ* hybridization^{注1}を行いました。その結果、通常染色では見過ごしていた、さまざまな形態の、発達ステージの異なる寄生体が観察されました(図3)。また、PCRによる検査では、本微胞子虫はキリキリ舞症状を呈する病魚の脳からは例外なく見つかるが、健康な魚群からは検出されませんでした。したがって、この疾病は微胞子虫による脳脊髄炎であることがほぼ確実となりました。

微胞子虫というのはそれだけでひとつの生物門を形成するかなり大きな生物グループであり、ほとんどが魚類あるいは節足動物の寄生体です。以前は原生生物とされていましたが、近年の研究により菌類(カビの仲間)であるとみなされるようになってきました。

今回観察された胞子塊はごく小さなものしかなく、宿主の免疫反応により崩壊したと思われる寄生体も多くみられることから、カンパチはこの微胞子虫本来の宿主ではない可能性があります。カンパチ種苗は海南島などで蓄養されたのち、日本に輸出されます。したがって蓄養地周辺に本来の宿主が存在し、それから迷入寄生^{注2}を受けているのかもしれません。本疾病に対しては有効な治療法は知られておらず、感染を予防するくらいしか対策がありません。なお、昨年度にはブリでもこの疾病が発生したことから、日本にこの疾病が定着してしまうことが危惧されます。

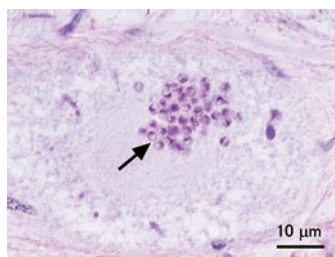


図1. 変性した神経細胞中の微胞子虫の胞子群(矢印)。

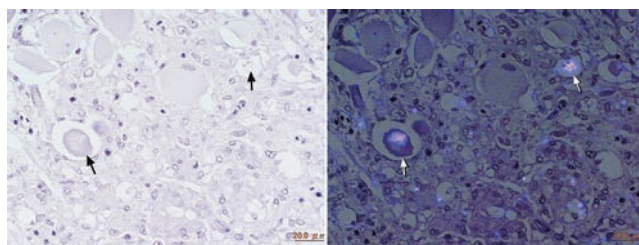


図2. 延髄の病変部。左は明視野像、右は同じ視野にUvitex2B 蛍光観察像を重ねたもの。変性、壊死した神経細胞中に複数の胞子が蛍光染色されて見える(矢印)。

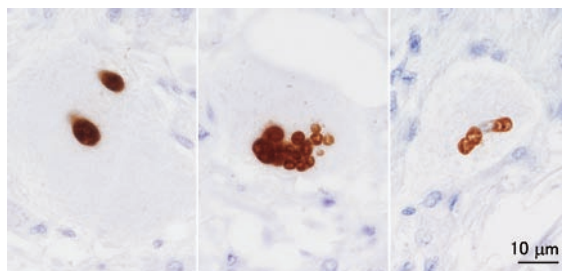


図3. 異なる発達段階の微胞子虫(濃い茶色)。

注1 *in situ* hybridizationとは、組織や細胞において特定の遺伝子を検出する方法。検出に用いられる核酸分子をプローブと呼ぶ。

注2 迷入寄生とは、寄生体が本来の宿主ではない他の生物に寄生すること。

ブリ黄疸病の克服 ー遺伝子組み換え技術を用いたワクチン開発ー

(病害防除部：中易千早)



現在日本で市販されている全ての水産用ワクチンは、化学処理によって不活化したウイルスや細菌を用いた不活化ワクチンです。不活化ワクチンの作製には、病原体を大量に培養することが必須ですが、魚病細菌を含めた海洋微生物の多くは培養が困難なため、ワクチンの開発が進まない事例が多く見られます。例えば、1年で約4億円の被害を出すブリの細菌性溶血性黄疸の病原体も難培養性細菌の一つであり、これまで多くの研究者が培養法の改良を試みましたが、特殊で高価な培地を用いても極少量の増殖が見られるのみで、ワクチン開発の障壁となってきました。しかも、この病原体の性状は培養によって変化するため、品質の一定したワクチンを作製できないのが現状です。

サブユニットワクチンは難培養性病原体に適した手法です。これは、病原体の感染防御抗原の遺伝子情報を元に作製した組換えタンパクを用いたワクチンで、病原体の培養の必要がありません。サブユニットワクチンは、医学や畜産の分野ではすでに一般化しており、開発が精力的に進められていますが、魚病に応用された例はほとんどありません。このため平成22年度新

たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業の「遺伝子情報を利用した難培養性病原体に対するワクチン技術の開発」において、当センターを中核機関とし、東京海洋大学および大分県農林水産研究指導センター水産研究部の協力を得て、難培養性病原体に対するワクチン開発を行なっています。細菌性溶血性黄疸の病原体をモデルに、病原体のゲノム配列を解読し、感染防御抗原の探索を行ない、その情報を元にリコンビナントタンパク^{注1}から試作ワクチンの開発を行います(図1)。

現在、2種類の次世代シーケンサーを用いてブリ黄疸病原体のドラフトゲノム解析(ゲノム配列の概要の解読)に成功し、ゲノムの大きさや、ゲノム上には1,500個以上の遺伝子が存在することを明らかにしました。同時にワクチンの有効成分と成り得るタンパク質をコード(指定)する遺伝子の予測を行い、数百個の候補遺伝子をスクリーニングすることが出来ました。予測された候補遺伝子のうち、リコンビナントタンパクの作製が比較的容易な分子量50kDa以下の成分について、大腸菌を宿主に用いて100種以上のリコンビナントタンパクを発現させ、試作ワクチンを作製しています。これらの試作ワクチンについては、順次ブリに接種し、黄疸病原体による感染試験を行ない、死亡率を観察することで、その有効性について評価を行なっています。この事業を期に、水産用ワクチン開発技術が向上し、より多くの魚類病原体に対するワクチンが開発できるようになると期待されています。

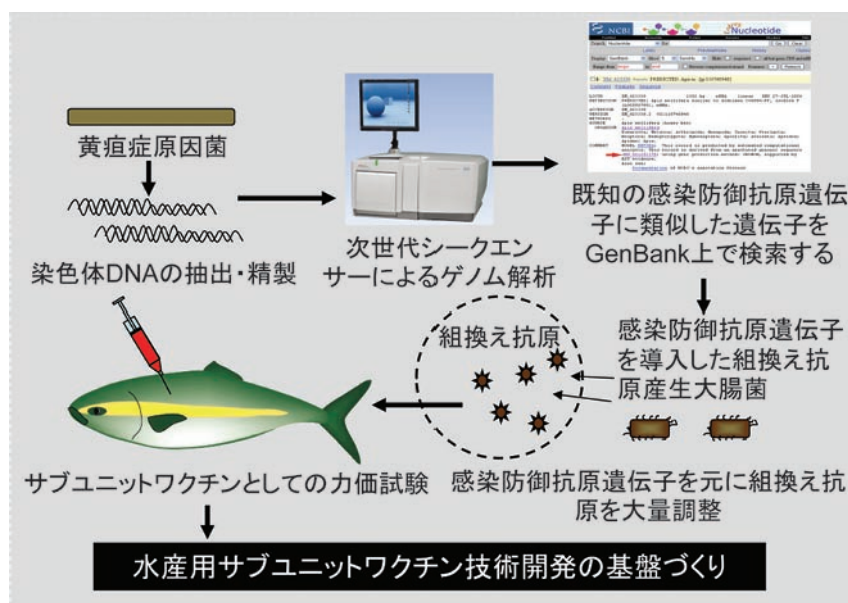


図1. 水産用サブユニットワクチン開発の流れ

注1 リコンビナントタンパク
遺伝子組み換え技術によって人工的に作製されたタンパク質のこと。通常、大腸菌の遺伝子を組み換えてタンパク質を作らせる。

海外からの伝染病を防ぐために ーリスク評価法を用いた危機管理ー



(魚病診断・研修センター：湯浅 啓)

現在の国内養殖産業に甚大な影響を及ぼしている多くの病気が、海外から持ち込まれた伝染病です。クルマエビ類の急性ウイルス血症（ホワイトスポット病）、アユの冷水病、コイのコイヘルペスウイルス病等、一度定着すると長期にわたり被害を及ぼし続けます。農林水産省では魚介類海外伝染病の海外からの侵入を防ぐため、特定疾病を対象に「水産資源保護法」に基づく輸入検疫と、「持続的養殖生産確保法」に基づく病魚の処分・移動禁止等によるまん延防止対策を実施しています。特定疾病とは「持続的養殖生産確保法」で定める、養殖産業に甚大な被害を及ぼすことが予想される海外伝染病であり、現在11種が指定されており、その選定にあたっては、OIE（国際獣疫事務局、動物やその製品の輸出入の際の衛生基準を策定する国際組織）の決めるリストに挙げられた疾病等を対象に、国内在来魚介類への病原性（毒力、感染力）を考慮して決められています。

病害因子による被害を排除するための手法に「リスク分析」があります。この手法は、OIEの他、CAC（Codex Alimentarius Commission；FAOとWHOが共同で策定した国際的な食品規格）やIPPC（International Plant Production Convention；国際植物防疫条約）で採用されており、微生物あるいは化学物質の危険性を適正に評価し（リスク評価）、その評価に基づく原因体の監視体制の構築（リスク管理）を行うものです。

海外で発生している魚病のリスク分析を行う際、リスクコミュニケーション（現場を含む産学官での情報共有・意見交換）を繰り返しながらリスク評価を行います。リスク評価では、海外で同定された病原体が国内に侵入するリスク（侵入評価）、侵入した際に国内在来の感受性魚種がその病原体に曝され、病原体が蔓延するリスク（暴露評価）、その結果引き起こされる被害（重大性評価）について評価します。そして、再びリスクコミュニケーションを行って、監視体制（例えば、農林水産省動物検疫所による輸入検疫）が敷かれ、リスク管理が行われます（図1）。

リスク評価の中で、「暴露評価」に関係する因子には感受性宿主域（病原体が感染する動物の範囲）、

ベクター（病原体を媒介する（生）物）や中間宿主の有無、病原体特性（病原性、環境中での生存性）が含まれ、全てが我々研究者により解明されるべき因子です。この中で、現在検査されている因子は前述の通り、「国内在来魚種に対する病原性の確認」のみで、必ずしも十分なリスク評価が行われているとは言えません。

魚病診断・研修センターでは、本中期計画中に、ウイルス病の防疫体制の構築に向けたリスク評価法の確立を目指しています。上記「暴露評価」の各因子について、変温動物が対象であるが故に重要となる環境水温の影響も考慮しつつ、検査方法を検討していきます。そして、国内未侵入の特定疾病であるコイ春ウイルス血症（SVC）について、リスク評価を試みる予定です。対照として、非常に病原性の高いコイヘルペスウイルス（KHV）、比較的病原性の低いコイ乳頭腫ウイルス（CHV）等のデータも蓄積し、それらとの比較により対象病原体の病原性を評価しようと考えています。将来、新たな海外伝染病が諸外国で発生した際に、その病原体のリスク評価を迅速に実施できるなら、それは農林水産省が特定疾病へ指定する際の、また動物検疫所や都道府県水産試験場が監視体制を構築する上での、有用な情報源になり得ると考えます。その結果、海外伝染病の国内への侵入を未然に防ぐことができ、また万が一国内に侵入した際にも、迅速な対処により、病原体のまん延を阻止できることが期待されます。

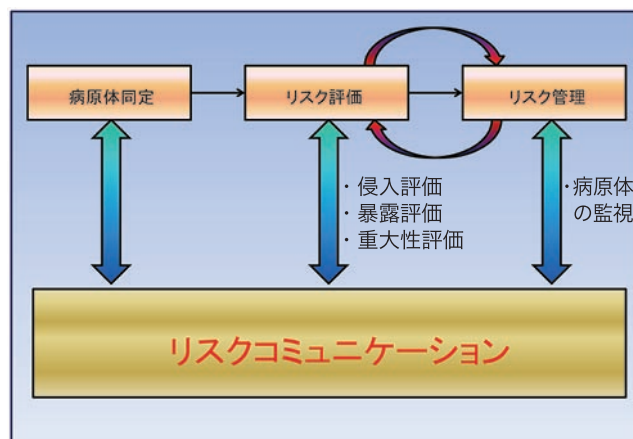


図1. リスク分析の4要素

新体制のもと研究開発推進会議を開催しました



(業務推進部長：伊藤文成)

平成 23 年 4 月 1 日から、(独) 水産総合研究センターは第 3 期中期計画期間に入り、組織改編を行うとともに水産業関係研究開発推進会議の運営体制を変更しました。組織改編に伴い「養殖研究所」は新しく「増養殖研究所」と改称し、これまでの養殖技術を中心とした基礎的研究開発に加え、黒潮浅海域と内水面における資源の維持増大と生態系保全に関する研究分野を受け持つことになりました。このことにより、増養殖研究所はブロック別推進会議として「中央ブロック水産業関係研究開発推進会議」を、分野別推進会議として「内水面関係研究開発推進会議」及びこれまでも担ってきた「水産増養殖関係研究開発推進会議」を受け持つことになりました。なお、水産資源や海洋環境などの諸問題に対応するため、中央ブロック推進会議は増養殖研と中央水産研究所が連携して担当して参ります。

中央ブロック水産業関係研究開発推進会議

平成 23 年 12 月 7～8 日、愛知県産業労働センターにおいて、ブロック関係都県など 20 機関 40 名の参加により、2 研究所の共催としては初めての推進会議を開催しました。会議では、外部資金獲得のための連携と情報の共有化、アワビのキセノハリオチス症防疫対策、海の貧栄養化問題等につい



写真. 中央水研との初めての合同開催

て意見交換が行われました。今回は開催場所を研究所所在地から離れてブロックのほぼ中心にある愛知県名古屋市としましたが、参加各都県の反応は概ね好評でした。また、開催時期については最も効果的な時期に開催することが重要であり、引き続き検討していくことになりました。

内水面関係研究開発推進会議

平成 23 年 12 月 13～14 日、栃木県総合文化センターにおいて、内水面関係都道県など 24 機関 45 名の参加により推進会議を開催しました。会議では、内水面水産業における最大の関心事であるアユの資源量推定や遡上量予測、原発事故に伴う放射性物質の生態系への影響等に関する意見交換が行われました。また、内水面推進会議での議論は増養殖推進会議との接点が多いことから、両推進会議の連携強化方針が説明されました。

水産増養殖関係研究開発推進会議

増養殖関係の推進会議では本会議は開催せずに、傘下の「養殖産業部会」及び「魚病部会」のみを開催し、部会での協議を経て増養殖研から関係するブロック及び分野別推進会議の協議に参加することで本会議の協議に代えています。これは増養殖が全国にまたがる研究分野を対象としているためであり、より効率的に諸問題に対応するための措置です。このことにより、各ブロックや分野における増養殖全般にわたる問題点や研究開発ニーズ、増養殖研に対する要望をよりの確に把握し、対応できるものと考えています。

今年は新体制での初年度でもあり、これまでのスタイルに沿って開催しましたが、今後は、組織改編による統合及び中央水研との連携メリットを最大限に活かした推進会議を運営し、実りある会議にしていきたいと思ひます。

【編集後記】

- 初めて、刊行物編集作業に携わりましたが、数頁のものでも多くの人が関わり、大変さを肌で感じました。また、今までなんとなく見ていた印刷物も編集者の目線で見えるようになりました。(Y.N)

増養殖研究レター No.2(平成 24 年 2 月)

編集・発行：

(独) 水産総合研究センター増養殖研究所 業務推進部
(伊藤文成、澁野拓郎、中島幸人)

〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦 422-1
TEL：0599-66-1830 FAX：0599-66-1962
URL：<http://nria.fra.affrc.go.jp/>