

### 3) 会長賞受賞記念講演

〔愛媛県〕「ウイルス性疾病対策によるハタ類養殖業の振興」  
愛媛県農林水産研究所水産研究センター 山下主任研究員

No.1

## ウイルス性疾病対策による ハタ類養殖業の振興




愛媛県農林水産研究所  
水産研究センター 山下浩史

〈スライド 1〉

ウイルス性疾病対策によるハタ類養殖業の振興に関する研究について発表いたします。

No.2


## 愛媛県の海面養殖業 (2010)



① 全国1位 270億円 @700円

② 全国2位 210億円 @700円

③ 全国2位 10億円 @1,100円



全国一位 43億円

〈スライド 2〉

まず、研究の背景について説明します。

愛媛県の海面養殖業における平成 22 年の年間生産額は約 600 億円であり、ここに示しますとおり、そのうちマダイが 270 億円、ぶり類が 210 億円、真珠養殖が 43 億円となっています。

マダイとブリ類の占める割合が約 80%にも上っています。

近年、これら主要養殖魚種の取引価格の低迷と合わせ、飼料代や燃油代が高騰しているため養殖業者は逼迫した経営を余儀なくされています。このため、利益率の高い養殖魚種の導入が求められています。

なお、ここに示す単価は、おおよその浜値を示しています。

No.3

## 愛媛県におけるハタ類養殖 (2010)



約10億円 @2,500円

約5億円 @4,000円

- 種苗量産技術の向上により人工種苗の入手が容易になった。
- 販売単価が高く、新たな養殖対象種として注目されている。

〈スライド 2〉

まず、研究の背景について説明します。

愛媛県の海面養殖業における平成 22 年の年間生産額は約 600 億円であり、ここに示しますとおり、そのうちマダイが 270 億円、ぶり類が 210 億円、真珠養殖が 43 億円となっています。

No.4

**養成過程で発生するウイルス性神経壊死症  
が安定生産の最大の障害**



ウイルス性神経壊死症: Viral Nervous Necrosis (VNN)

〈スライド 4〉

しかしながら、ハタ類の養殖ではウイルス性神経壊死症、以下、VNNと略します、が安定養殖生産の大きな障害となっています。

ハタ類の VNN は、種苗期から海面での養成期まで発生し、累積死亡率が 50% を超えることもしばしばであり、深刻な経済損失をもたらします。

罹病魚の一部は、腹を上にして力なく泳ぐことから、漁業者の間では“転覆病”と呼ばれています。

No.5

**本日の発表内容**

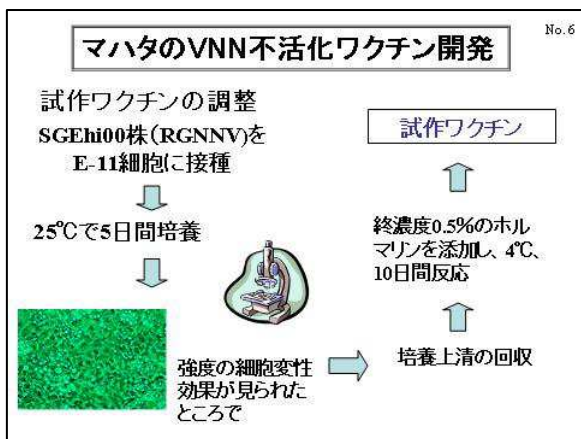
- マハタのVNN不活化ワクチン開発
- 耐病性クエ選抜技術開発

本来であれば、両魚種ともワクチン開発を実施することが望ましいが、クエではこれまでの経験から、耐病性を持つ雄がいると考えられたことから選抜育種にまず取り組みました。

〈スライド 5〉

少し前置きが長くなりましたが、本日の発表内容をお示しします。ハタ類の VNN による魚病被害を軽減するために、ワクチン開発と親魚選抜による耐病性種苗の作出に取り組みました。

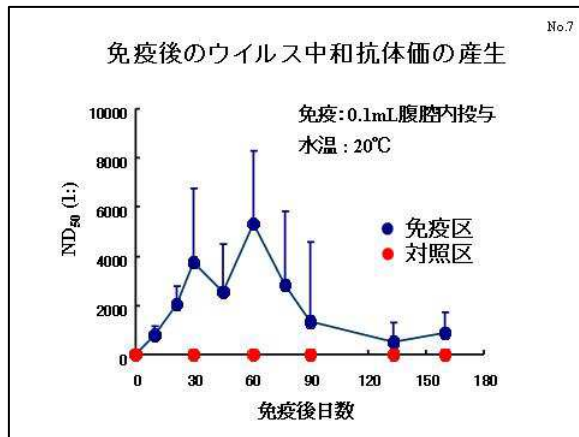
なお、ワクチン開発の一部は、広島大学、水産総合研究センター、三重県水産研究所および日生研株式会社の協力を受けて実施いたしました。また、耐病性クエの開発については、親子鑑定について、愛媛大学の協力をを受けて実施いたしました。この場をお借りしてお礼申し上げます。



〈スライド 6〉

まず、マハタの VNN 不活化ワクチンの開発について説明します。ここにワクチン調整の概略を示します。

2000 年に愛媛県のマハタ病魚より分離した SGEhi00 株を VNN ウイルスの培養が可能な E-11 細胞に接種します。25°C で 5 日間培養し、強度の細胞変性が確認されたところで培養上清を回収します。これに、添加後の濃度が 0.5% となるようホルマリンを添加し、4°C で 10 日間反応させウイルスを不活化します。これを試作ワクチンとして、これ以降の試験に用いました。



<スライド 7>

結果に移ります。先ほど示した試作ワクチン 0.1mL をマハタ稚魚の腹腔内に投与し、経時的にウイルス中和抗体価を測定しました。ウイルス中和抗体価は、血清中の抗体が直接ウイルスの感染力を奪う力を定量的に示しています。

ワクチン区では、免疫後 10 日目より徐々に上がりはじめ、免疫後 21 日から 77 日では平均 1:2000 以上の抗体価が検出されました。その後減少しましたが、免疫後 160 日でも 1:860 の高い抗体価が認められました。対照区では中和活性は認められませんでした。

No.8

### 実験感染による防除効果の判定

免疫後日数	攻撃ウイルス濃度 (log TCID <sub>50</sub> /尾)	死亡尾数 / 試験尾数 (%)		RPS (%)
		免疫区	対照区	
14	4.5	4/50 (8.0)	41/50 (82.0)	90.2
	3.5	1/50 (2.0)	34/50 (68.0)	97.1
35	4.5	11/50 (22.0)	43/50 (86.0)	86.0
	3.5	4/50 (8.0)	44/50 (88.0)	90.9
74	4.5	10/50 (20.0)	43/50 (86.0)	76.7
	3.5	8/48 (16.7)	39/50 (78.0)	78.6

RPS: 免疫有効率

<スライド 8>

感染試験による防除効果の判定です。ワクチン投与後、14 日から 74 日目の感染試験の結果をまとめました。このように、いずれもワクチン区の累積死亡率は対照区と比較して有意に低い結果となりました。また、有効性の程度を示す免疫有効率は実用化の基準と考えられている 60% を越え、平均で 84.3% を示しました。

なお、表中に含まれる TCID<sub>50</sub> という単位は、ウイルス感染力価を示す単位です。そこに含まれるウイルスの量と考えてください。

No.9

### ワクチンの濃度と防除の関係

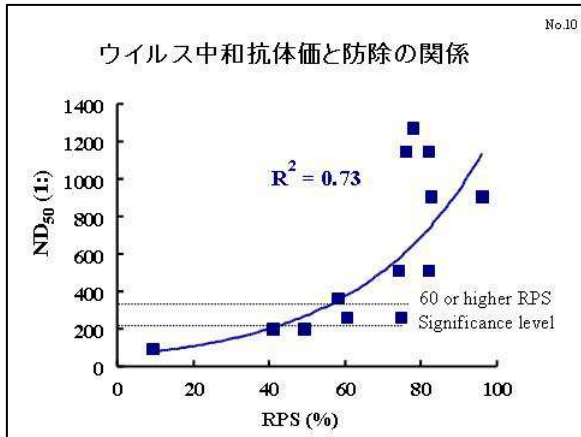
ワクチン投与量 (Log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> )	中和抗体価 ND <sub>50</sub> (1:)	攻撃濃度 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /尾	
		死亡率 %	RPS
8.5	907	15*	82.6
8.0	511	23*	73.9
7.5	259	35*	60.4
7.0	197	52*	40.8
6.5	96	89	—
HBSS	< 80	88	—

\* p < 0.05

<スライド 9>

次に、ワクチンの実用化に必要なステップとして、ワクチンの有効投与量に関する検討を実施いたしました。

これは、ワクチンに含まれるウイルス量と感染防御の関係です。中和抗体価と同様に、ワクチン濃度の低下に伴い免疫有効率が低下しました。対照区と比較し、有意な防御効果が得られるワクチン投与量は、不活化前ウイルスカ価で、10 の 7.0 乗、実用化の目安である RPS60 が得られるのは 10 の 7.5 乗以上でした。



〈スライド 10〉

これまでの試験結果で得られた試験群の中和抗体価の平均値とそのときの実験感染における免疫有効率をプロットしました。このように、 $R$ の2乗=0.73と高い相関関係を示すことがわかります。また、先に述べた中和抗体価が、平均 1:200 以上あれば有意な死亡率低減効果が確認され、1:300 以上で RPS が 60 以上となります。

生産したワクチンの有効性の検定を考えた場合、感染試験は、直接的な方法ではありますが、魚体のサイズや状態など多くの不確定要素を含みます。また、統計的な検定を行うためには多くの試験魚が必要となります。中和抗体価の測定は、不確定要素が少なくなるのみでなく、試験魚の数も少なく済み、魚に優しい検定方法となります。

No.11

### 野外試験

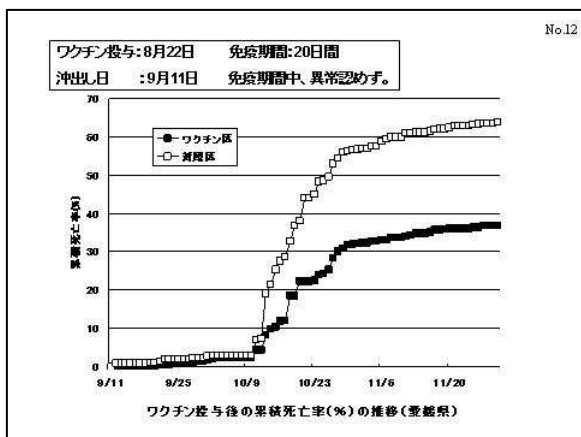
■ 用法・用量

- 魚体重: 8 - 123 g
- ワクチン量:  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/尾
- 腹腔内投与0.1mL

■ 3県、6箇所を実施

〈スライド 11〉

これまでの試験で得られた情報を総括し、ここに示した用法・容量を定めました。マハタ稚魚に不活化前ウイルスカ価で 1 尾あたり 10 の 7.5 乗以上のウイルスを含むワクチン液を腹腔内に 0.1ml 注射して免疫をしました。なお、この試験は、愛媛県をはじめ、三重県、大分県でも実施いたしました。



〈スライド 12〉

愛媛県における累積死亡率の推移は図のようになっています。

野外試験の結果概要 No.13

試験区	試験尾数	安全性 <sup>*1</sup>	有効性 <sup>*2</sup>
A	1,000	◎	◎
B	6,000	◎	◎
C	6,000	◎	◎
D	1,000	◎	◎
E	1,000	◎	◎
F	400	◎	◎

\*1 ワクチン投与後に死亡や異常遊泳は観察されず  
\*2 ワクチン区の死亡率が有意に低い (p<0.05)

〈スライド 13〉

野外試験の結果です。実施した 6 例すべてにおいて安全性と有効性が確認されました。

ワクチン実用化 No.14

平成24年1月に製造販売承認取得  
平成24年8月より販売開始

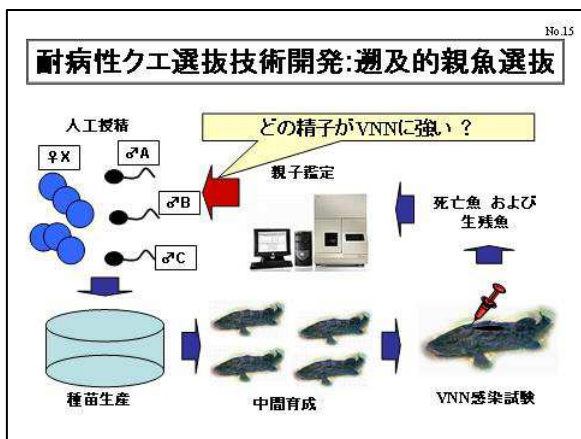
マハタの安定養殖  
生産に活路！

◎ 日本製薬株式会社

〈スライド 14〉

これらの研究の結果、平成 24 年 1 月に製造販売承認の取得、平成 24 年 8 月からの販売にこぎつけました。

本ワクチンが、マハタの安定養殖生産に大きく寄与するものと期待しております。



〈スライド 15〉

つぎに、耐病性クエ選抜技術開発について説明します。

愛媛県ではクエの種苗生産に用いる親魚、特にオス親には天然魚を親魚養成して用いており、使用する親魚の組み合わせにより、成長や抗病性といった形質が大きく異なることが経験的に知られています。

本研究では、VNN に抵抗性を示す遺伝形質を持ったオス親を特定することを目的としました。

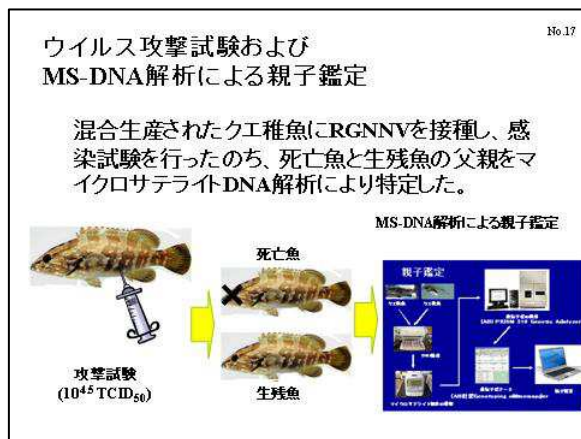
オス親の異なる家系の受精卵を同一のタンクで混合種苗生産し、また、同一の水槽で VNN の実験感染を実施しました。試験終了後、マイクロサテライト DNA 解析による親子鑑定を行って、どの精子が VNN に強いかを解析しました。

この手法により、特に差の現れやすい種苗生産時の水槽間における差などの環境要因を排除し、純粹に遺伝形質の違いのみを検出することが可能となります。



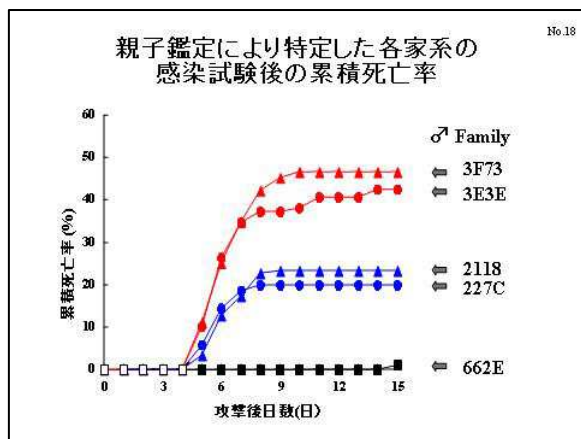
〈スライド 16〉

混合生産の手法について説明します。5尾のオスより精子を採取します。1尾のメスより得た未受精卵を5等分し、個別に受精します。この部分は、精子活性などにより家系間の数に大きな偏りを出さないため、個別に行いました。このようにして得られた5家系の受精卵を同一の種苗生産タンクに収容し、生産を行いました。



〈スライド 17〉

混合生産されたクエ稚魚に VNN の原因ウイルスを接種し、感染実験を行いました。死亡魚と生残魚について、マイクロサテライト DNA 解析による親子鑑定を行い、各家系の VNN に対する抵抗性を解析しました。



〈スライド 18〉

解析結果より、ID3F73 と 3E3E が VNN に弱いオス家系、2118 と 227C が中間の家系、662E が特に VNN に抵抗性を示す家系であることが示されました。

No.19

## 662E はスーパー♂？

♂662E × ♀3362

♂662E × ♀15E3

↓

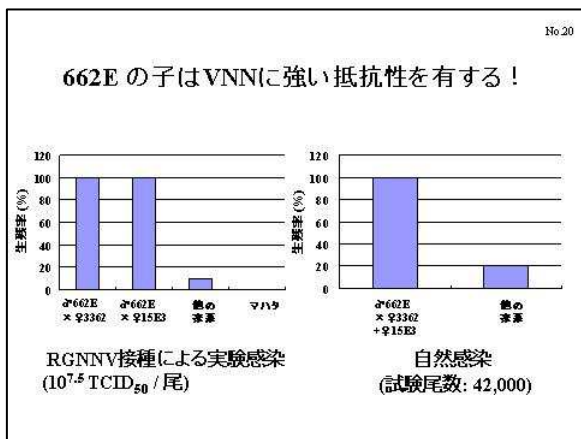
### VNNに対する抵抗性を評価

- 実験感染による評価
- 野外感染による評価

〈スライド 19〉

さて、ID662E のオスから採った精子を使って生産すれば、必ず、VNNに強い種苗ができるのかという疑問があります。当然、一度きりの試験結果では信憑性が低いです。

そこで、今度は、精子を 662E に固定し、メス親魚に 3362 と 15E3 の 2 尾を用いて種苗生産し、実験感染と野外感染により評価しました。



〈スライド 20〉

望んでいた結果が得られました。

実験感染では、1 尾当たり 10 の 7.5 乗のウイルスを注射して検討しました。マハタや 662E の精子以外の家系はほぼ全滅しましたが、662E の精子を用いて生産した家系は、100%の生残率でした。

また、自然感染でも 662E の精子を用いた家系は VNN に強い抵抗性を示すことが明らかになりました。

No.21

### ハタ類養殖の振興に向けて

■ 販路開拓 ⇒ 国内市場の開拓と合わせ、東南アジアを中心とした海外市場の開拓。

### ハタ類養殖の振興による養殖漁家経営の安定化

〈スライド 21〉

マハタではワクチンが実用化され、クエについては、耐病性種苗の開発が成功したことから、ハタ類の安定養殖生産に一定の技術的な目途がつけました。

ここに、ハタ類養殖の振興に向けて今後の可能性を示しました。重要な課題として、販路開拓があります。現在、漁業者や行政サイドと連携して精力的に取り組んでおります。また、ハタ類は国内のみでなく東南アジアでも人気の高い魚種です。海外での販路開拓も残された大きな課題の一つであると考えられます。

今後は、より生産性を高める技術開発を進めるとともに、これら出口を見据えた課題に取り組みながら、ハタ類養殖の振興による養殖漁家経営の安定化に努めてまいりたいと考えています。

〔関係質疑〕

静岡県（鈴木所長）：

ワクチンのことについて、2、3教えていただきたいのですが、ハタのVNNの疾病は稚魚期から成魚期まで発生するということでしたが、今回の研究では、ワクチンを投与した結果74日有効性が認められたとのことでしたが、野外ではどの位、稚魚期に接種して成魚期まで効果が期待できるのかということが1つ。それから、VNNのウイルスは血清タイプが1つだけなのでしょうか、また、いくつか知られているのでしょうかというのが1つ。もう1つは、ヒラメなどでもVNNの存在が非常に大きいという風に聞いておりますけど、他の魚種でも同様に効果が期待できるのでしょうか。もし確かめれているのであれば教えていただきたい。

愛媛県（山下主任研究員）：

効果の持続期間については、実は長く効果を調べたのは最初に試作ワクチンを作って水産試験場でずっと試験をしていたものでしか長いデータというのは今のところないのですが、それにつきましては2年目以降も発生が見られなかったので、推測ではありますが、1年目の夏を乗り切ることによってワクチンによる付加免疫と併せて感染自体による追加免疫というものがあ程度付く可能性があるのではないのかと思っています。実際にワクチンが発売されて今年から大量接種をしてくれる養殖業者で使われるようになっていきますので、正確なところはこれから出てくるのではないかと考えています。

VNNのウイルスの血清タイプについては、血清型としましてはVNNウイルスはA、B、Cの3つあります。今回作ったハタ類が罹るVNNについては、遺伝子型は全てRGNNVというタイプで、血清型はC型に集結されますので基本的にワクチンに対する差異はないのではないかと考えております。

最後に他の魚種ではということですが、確認しているのはクエについては実験的ですがけれども効果があることがわかっています。しかし、ヒラメやその他の魚種についてはまだ確認しておりませんのでこれからの課題ではないかと考えています。