マダイイリドウイルス病に対する 絶食の有効性

田中真二*・青木秀夫¹・井上美佐・栗山 功

(2003年 3 月20日受付)

Effectiveness of Fasting against Red Sea Bream Iridoviral Disease in Red Sea Bream

Shinji Tanaka*, Hideo Aoki¹, Misa Inoue
and Isao Kuriyama

Owase Fisheries Laboratory, Fisheries Research Division,
Mie Prefectural Science and Technology Promotion
Center, Owase, Mie 519-3602, Japan

¹Present address : Fisheries Research Division, Mie
Prefectural Science and Technology Promotion
Center, Hamajima, Mie 517-0404, Japan

(Received March 20, 2003)

ABSTRACT—Effectiveness of fasting against red sea bream iridoviral disease (RSIVD) in juvenile red sea bream *Pagrus major* were evaluated. In an infection experiment, groups which were fasted for 10 or 20 days after challenge showed significantly lower mortalities than a feeding group. In a field trial test, in which a naturally RSIVD-prevailing batch of red sea bream was divided into 2 groups, a fasting group showed significantly lower mortality than a feeding group. These results indicate the effectiveness of fasting after virus infection against RSIVD.

Key words: red sea bream iridoviral disease, fasting, *Pagrus major*, iridovirus, RSIVD

マダイイリドウイルス病 (red sea bream iridoviral disease: RSIVD)¹⁾ は1990年に四国の養殖マダイ *Pagrus major* で最初に発生が確認されて以来、日本国内でスズキ目魚類を中心に3目31種の海産養殖魚類で発生が確認され²⁾、海産魚類養殖業において大きな脅威となっている。

マダイでは、本病の原因ウイルスであるマダイイリドウイルス (red sea bream iridovirus: RSIV) のホルマリ

ン不活化ワクチンの有効性が確認され^{3,4)}、1999年から本ワクチンが市販されている。一方、ワクチンによる予防免疫の他に、養殖現場では給餌制限、低密度飼育およびビタミン剤の投与といった飼育管理技術の改善が本病による被害の軽減に有効ではないかと考えられている。しかし、これらの効果および作用機序に関する報告はない。本研究では、マダイ幼魚を用いた人為感染試験および野外飼育試験により、RSIVD に対する絶食の有効性について検討した。

材料および方法

供試ウイルス: 1993年に三重県内で RSIVD により死亡したマダイ (平均体重 30 g) の脾臓を 9 倍量の Eagle's minimum essential medium (日本製薬) とともに磨碎し、室温で1,500×g, 15分間遠心分離して得た上清を孔径0.45 μmのメンブレンフィルターで濾過し、−80°Cで保存した (RSIVMie93株)。本研究では、RSIVMie93株を浸漬感染させたマダイ病魚 (10~20 g) の脾臓から上記と同様に調製した磨碎濾液を用いた。供試ウイルス液の感染価 (10^{5.8} TCID₅₀/mL) は BF-2細胞を用い、25°Cで 96 well plate (Corning) によるマイクロプレート法に基づいて測定した。

人為感染試験: RSIV 感染後の絶食または給餌量の制限による死亡率低減効果を確認するため、ウイルス感染後に異なる条件で給餌する試験区を設定した。試験は2回繰り返して行った (試験 A, B)。試験区の設定は、ウイルス感染から試験終了まで、市販マダイ用 extruded pellet (EP, マルハ) をほぼ飽食量である日間給餌率 4 %で毎日給餌する区 (4 %給餌区)、日間給餌率を 1 %に制限して毎日給餌する区 (1 %給餌区)、およびウイルス感染から10日間または20日間絶食後に日間給餌率 4 %で毎日給餌する 2 区 (10日間絶食区、20日間絶食区) の計 4 試験区とした。予め EP を日間給餌率 4 %で10日間給餌したマダイ幼魚 (平均体重 16 g) を20尾ずつ 4 区に分け、ウイルス液を 30 μL 添加した 3L の濾過海水 (10^{0.8} TCID₅₀/mL) に収容し、通気しながら1.5時間浸漬感染させた。感染後は供試魚を 4 個の 100 L 水槽にそれぞれ収容して26°Cの流水 (200 L/時) で飼育し、所定の条件で EP を給餌して35日間経過を観察した。死亡魚については脾臓のスタンプ標本を作製し、抗-RSIV単クローン抗体を用いた間接蛍光抗体検査 (IFAT)⁵⁾ によりウイルス特異抗原を検出するとともに、常法により鰓の寄生虫および腎臓の細菌検査を行った。なお、各区の累積死亡率について、χ² 検定により有意差を検定した。

野外飼育試験: 1997年 8 月下旬から RSIVD の自然発病 (日間死亡率0.7%) が確認されたマダイ魚群 (平均体重 11 g) を用いた。9 月 1 日に本魚群のうち2,000尾を互いに隣接した 2 面の網生簀 (2×2×2 m) に1,000尾ずつ

三重県科学技術振興センター水産研究部尾鷲水産研究室

* Corresponding author

E-mail: tanaks09@pref.mie.jp

¹ 現所属: 三重県科学技術振興センター水産研究部

Table 1. Effect of fasting or limited feeding against experimental RSIV infection in juvenile red sea bream

Exp.	Fish group (daily feeding rate after challenge)	No. of fish dead/examined	Mortality (%)	χ^2 test	Average body weight of survivors(g)
A	4% during experimental period	13/20	65		31.6
	1% during experimental period	14/20	70	$P \geq 0.05$	23.2
	4% after 10 days fasting	4/20	20	$P < 0.01$	26.5
	4% after 20 days fasting	5/20	25	$P < 0.05$	18.7
B	4% during experimental period	15/20	75		41.4
	1% during experimental period	11/20	55	$P \geq 0.05$	18.5
	4% after 10 days fasting	7/20	35	$P < 0.05$	27.9
	4% after 20 days fasting	8/20	40	$P < 0.05$	17.8

Fish were bath-challenged with RSIV at a dose of $10^{0.8}$ TCID₅₀/mL.

に分けて収容し、給餌区および絶食区として10月7日まで37日間経過を観察した。給餌区の魚には1週間に1日の休餌日を除き、毎日1回EPをほぼ飽食量給餌した。絶食区の魚は9月16日までの16日間絶食した後、9月17日から給餌区と同様に給餌を再開した。死亡魚については9月4日、8日および17日に各区3～6尾ずつを用いて前記のとおりRSIV、寄生虫および細菌の検査を行った。なお、両区の累積死亡率について前記のとおり有意差の検定を行った。

結果および考察

人為感染試験におけるRSIVDによる累積死亡率および有意差検定の結果等をTable 1に示す。試験A、Bともに、供試魚は4%給餌区でウイルス感染8～17日後頃に摂餌不良であった他は所定量を摂餌した。いずれの区においても死亡は概ねウイルス感染10～17日後に観察され、給餌条件の違いによる死亡時期の大きな違いはみられなかった。全83尾の死亡魚の検査では死因と考えられる寄生虫および細菌は検出されず、これらのうち77尾はIFAT陽性であったことからRSIVDによる死亡と判断された。しかし残りの6尾のうち2尾(1%給餌区および20日間絶食区の各1尾)は極度の痩せによる衰弱死と思われ、また他の4尾は原因不明であり、これらはRSIVDによる死亡尾数から除いた。試験A、Bともに、10日間絶食区および20日間絶食区の死亡率は4%給餌区より有意($p < 0.05$)に低かった。このように、マダイではウイルス感染直後から10日間以上絶食することがRSIVDによる死亡率の低減に有効であることが示された。一方、1%給餌区の死亡率については4%給餌区との間に有意差はなく、ウイルス感染後に毎日の給餌量を制限しても死亡率低減効果はみられなかった。

野外飼育試験における水深2m層の水温と死亡状況をFig. 1に示す。試験期間中の水溫は22.8～27.5℃で推移した。給餌区の魚は試験を開始した9月1日から6日までは日間給餌率2.7～4.5%と良く摂餌したが、7日以降は1.0%以下と摂餌が低下し、日間死亡率も4.7～14.6%

Fig. 1. Cumulative mortalities of juvenile red sea bream by natural RSIV infection in net pens. Fish that experienced 0.7% in daily mortality rate in August were divided into 2 groups (1,000 fish each) and the experiment was started. Fish were fed the commercial pellets to near satiation during experimental period (●) and fed after fasting for 16 days (Sep. 1–16) (○).

と急激に上昇した。15日頃には死亡尾数は減少し、9月23日頃にはほぼ終息した。絶食区では給餌区と同様に9月7日から日間死亡率が上昇したものの、1.4～4.9%と給餌区より低く、15日から17日には1.0%以下に低下した。しかし、17日から給餌を再開したところ、20日から25日にかけて再び死亡率は2.0%前後に増加し、ほぼ終息したのは9月28日頃と給餌区より5日間程度遅かった。死亡魚のうち24尾について魚病診断を行った結果、1尾からRSIVに加えてVibrio属細菌が検出されたものの、他の検査魚は全てRSIVDによる死亡と診断されたことから、試験期間中の死亡はほぼRSIVDによるものと判断された。累積死亡率は給餌区が75.4%、絶食区が44.0%であり、絶食区の方が有意($p < 0.01$)に低かった。このことから、養殖現場でも本病の発生後に絶食することにより、被害の軽減が期待できると考えられる。ただし、上記のとおり、絶食区では給餌再開後に一時的な死亡率の上昇が観察された。養殖現場では人為感染試験と異なり、病気の流行期間中は常にウイルス感染の危険に晒されており、同一生簀内でも個体によりウイルスの侵入時期およ

び体内でウイルスが増殖する時期は異なると考えられる。従って、絶食の終期あるいは絶食終了後にウイルスの感染を受けた一部の魚は、給餌の再開に伴い、絶食による体内でのウイルス増殖抑制作用がはたらかなくなり、発病、死亡したと思われる。このような給餌再開後の死亡を防ぐためには、絶食期間をさらに長く設定する必要性も考えられるが、人為感染試験における20日間絶食区では、極度の痩せによる衰弱死と思われる死亡個体がみられた他、生残魚も著しく痩せていた (Table 1) ことから、魚体が小さい場合は絶食期間を過度に長くしないことが望ましい。

絶食による魚病被害の軽減効果については、マダイのRSIVDの他に、ブリ *Seriola quinqueradiata* のレンサ球菌症においても経験的に知られている。また、レンサ球菌症の原因菌である *Lactococcus garvieae* (= *Enterococcus seriolicida*) の人為感染試験では、感染後に絶食したブリの死亡率は飽食給餌した区に比べて低かったことが報告されている*。このように、絶食には感染症を防御する何らかの効果があると考えられるものの、その作用機序については不明な部分が多い。今後はRSIV感染後に給餌または絶食した魚について、体内でのウイルスの動態および各種生体防御機能を比較する必要がある。

謝 辞

抗-RSIV 単クローン抗体を分与していただくとともに、本報告をまとめるにあたり貴重なご助言をいただきました独立行政法人水産総合研究センターの中島員洋博士に深謝します。また、供試魚を分与いただきました近畿大学養殖種苗センター浦神事業場および三重県尾鷲栽培漁業センターの職員の方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 井上 潔・山野恵祐・前野幸男・中島員洋・松岡学・和田有二・反町 稔 (1992): 魚病研究, **27**, 19–27.
- 2) 川上秀昌・中島員洋 (2002): 魚病研究, **37**, 45–47.
- 3) Nakajima, K., Y. Maeno, J. Kurita and Y. Inui (1997): *Fish Pathol.*, **32**, 205–209.
- 4) Nakajima, K., Y. Maeno, A. Honda, K. Yokoyama, T. Tooriyama and S. Manabe (1999): *Dis. Aquat. Org.*, **36**, 73–75.
- 5) Nakajima, K., Y. Maeno, M. Fukudome, Y. Fukuda, S. Tanaka, S. Matsuoka and M. Sorimachi (1995): *Fish Pathol.*, **30**, 115–119.

* 福田 稔・池田彌生 (1993): 大分県水試調研報, **15**, 46–56.