

審査の結果の要旨

氏名 ハウ カフィ

海産白点病は海産白点虫 *Cryptocaryon irritans* の寄生による原虫病で、網生簀養殖場や陸上タンク養殖場の海水魚に大きな被害を与えている。しかし、いまだに対策は確立していない。本論文は、この寄生虫病の対策として、異なる原理に基づいた異なる要素から構成される総合的寄生虫管理 (IPM) を導入しようとする研究であり、IPM を構成する手法として、海産白点虫の異なる発育段階を対象に三つの手法を検討した。

セロントの運動能に基づく物理的防除手法

海産白点虫の侵入ステージであるセロントについて、遊泳能、寿命、トモントからのセロント放出における概日リズムを検討した。加えて、戸外飼育水槽におけるセロントの垂直分布を把握した。その結果、遊泳能を有するセロントの割合は、急速に減少し、12 時間後には 5% にとどまった。また、セロントは正負いずれの走地性も示さず、遊泳速度は最大で 1.6mm/s と低く、かつ時間とともに低下した。さらに、戸外水槽内でセロントのほとんどは水底から 5 cm 以下の層に蓄積していた。また、セロントの放出は深夜に始まり午前 4 時から 6 時の間にピークに達した。セロントのこれらの行動特性と放出概日リズムから、海産白点虫病の発生しにくい水槽を開発できる可能性が示された。また、これらの特性を低溶存酸素がトモントの発育を阻害するという既報の知見を組み合わせるにより、網生簀養殖場において海産白点病の発生を予測できる可能性も示された。

サリノマイシンナトリウム経口投与の魚類への毒性と海産白点病に対する防除効果

マダイにおいて海産白点病に効果があることがすでに報告されているサリノマイシンナトリウムの経口投与に関して、対象魚種の拡大を目指して、マダイを含む 4 種 of 海産魚について、本薬剤に対する嗜好性、本剤の毒性、海産白点病に対する有効投与量を調べた。具体的には、様々な濃度に添加した餌をマダイ、トラフグ、ヒラメ、ヒラマサに 7 日間給餌し、毒性と嗜好性を調べた。その結果、最大安全投与量はマダイとトラフグは 80 mg/kg BW(体重)/day 以上、ヒラメとヒラマサでは 8 mg/kg BW/day 以下であった。海産白点虫で攻撃した後に本薬剤添加飼料を給餌した実験では、マダイとトラフグでは 20 mg/kg BW/day で虫体の宿主体内生残数の減少がみられ、ヒラマサでは 4 mg/kg BW/day で生残数の減少がみられた。また、攻撃試験した後、本剤添加飼料を 7 日間給餌した実験では、マダイとトラフグは対照区に比較して高い生残を示した。これらの結果から、経口投与は魚種によって最大安全投与量が変わるものの、海産白

点病の宿主体内での生残を低下させ、安全投与量の範囲内で海産白点病を軽減し得ることが示唆された。しかし、毒性と有効性は魚種により大きく異なることから、使用にあたってはこれらの点を十分明らかにしておく必要がある。

また、マダイ、トラフグ、ヒラメ、ブリの血液において、サリノマイシンナトリウムの溶血活性を調べたところ、溶血作用は魚種によって異なり、50 ppm・15分でヒラマサでは溶血率が77.4%に達したが、ヒラメでは10.5%にとどまり、本薬剤は魚類の血液を溶血させるとともに、溶血作用は魚種によって異なることが示唆された。ヒラメは経口投与に対して低い耐性を示したが、溶血の程度は低く、本剤は溶血以外にも様々な経路で魚体に影響を与えていると考えられた。

***Tetrahymena thermophila* を用いた海産白点病に対する組み換え不動化抗原ワクチンの作製**

海産白点虫は *in vitro* で培養できないため、不活化ワクチンの作製はできない。また、繊毛虫のコドンは特殊であり、組み換えワクチンの作製にはコドンの変更が必要となるとともに、細菌に発現させて作製したワクチンでは抗原性が変化する可能性もある。そこで、魚を宿主として増殖維持した海産白点虫株(X1)の不動化抗原を培養可能なせん毛虫 *Tetrahymena thermophila* に発現させ、これを抗原としたワクチンの有効性を検討した。まず、RACE法 (rapid amplification of cDNA ends) によって不動化抗原の遺伝子 (1008 bp) を得た。この遺伝子を *T. thermophila* に導入し、不動化抗原遺伝子を発現させた。不動化抗原を発現させた *T. thermophila* あるいは抽出した不動化抗原をワクチンとしてマダイに腹腔内注射し、得られた血清を ELISA によって抗体の存在をチェックするとともに、血清によるセロントの不動化、ワクチン接種後に攻撃した魚における宿主体内生残数ならびに海産白点虫による攻撃に対する耐性を調べた。その結果、不動化抗原を接種した魚の血清は有意にセロントを不動化した。抗原を接種した魚は抗体を産生していることが ELISA によって確認されたが、海産白点虫による攻撃試験では生残に有意な差は示さなかった。これは抗原作成に用いた X1 株の病原性が株の老化によってほぼなくなったため、新たに入手した別の株 (X2) を実験に用いたためと考えられる。ワクチン開発については、多様な血清型の存在が開発の阻害要因となる。今後は、種内で共通な病原因子を標的としたワクチンの開発に注力する必要がある。

これらの研究を総合すると、現状では、サリノマイシンナトリウムの経口投与に、網生質養殖では養殖場の海洋環境のモニタリング、タンク養殖においては水槽の改良を組み合わせることで被害を最小限に抑えるという IPM の実施が有効だと考えられる。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。