



JFSTA NEWS

NO. 16
2012. 1. 17

目 次

新年のご挨拶・・・・・・・・・・	1
アユのビブリオ病ワクチン開発研究の経緯を振り返って・・・・・・	2
事務局便り・・・・・・	15
シンポジウム「沿岸生態系保全に向けた海の緑化技術の最前線」・・・・・・	17

新年のご挨拶

会長 川口恭一

新春のお慶びとともに、本年もどうぞよろしくお願い申し上げます。

昨年、最も強く印象に残っているのは、3月11日に発生した「東日本大震災」です。観測史上最大の地震が引き起こした災禍は、一瞬にして全てが無に帰するむなしさを感じさせるものでした。

しかしながら、京都の清水寺で発表された2011年を表す漢字が「絆」であったように、人びとはあらためて連帯の必要性を強く感じたのでした。優れた体力や知力をもってしても、己一人で生きていけるものでなく、多くの人びとが、それぞれ周囲の人びとのことを思いやり、この輪が鎖のようにつながり、広がっていくことによってお互いに生きているのであるといえます。大震災は日本人が歴史的に受け継いできた価値観を呼び起こさせたともいえましょう。

全国水産技術者協会は、創設以来満3年が経過しました。東北から沖縄に至る全国各地に70名の会員を擁し、水産の各分野に渡る技術的要請に対応すべく活動を続けてきました。設立当初、外部からの調査や研究開発業務の依頼も少なく、協会の運営に大変苦労してきたところです。3年を過ぎた現在もその構造は変わっていませんが、昨年末頃に二つの明るい大きなニュースがありました。

その一つは、ある民間会社から、火力発電所の建て替え計画に伴うアサリ漁業、ノリ養殖業への影響を調査する業務を受託したことです。今までの協会事業に比べればはるかに大きな調査であり、足かけ3年程度継続するというものです。この実現には、会員のご理解と役職員の努力はもとより、協会を取りまく多くの関係者のご支援の賜と感謝しているところです。

また、二つ目は、地方在住の会員が中心となり、協会の業務として愛媛県伊方町から来年度に継続するアワビの放流効果調査の仕事を受けたことです。調査の規模は百万円

単位と前者に比べ小さいものですが、地方発の、初の調査業務の受託として極めて重要なものと考えています。

これら二つのニュースは協会設立当初構想していたように、地理的に全国を網羅し、かつ、水産関係の技術分野の全てに対応できる技術者を組織し活動することによって社会に貢献するという事に一步近づいたものであるといえます。

引き続き、このような活動の拡充強化に向け取り組んで参りたいと考えています。

新年に当たり、この一年が会員の皆様にとって、また、技術者協会にとって充実した良い年となりますよう心から願っています。

アユのビブリオ病ワクチン開発研究の経緯を振り返って

城 泰彦

はじめに

養殖業が盛んになり生産量が飛躍的に伸びるにつれて、種苗や餌料の安定した確保が課題となった。その一方で、過密飼育や過給餌などによる弊害が散見されるようになり、やがてそれに誘発されるように各種疾病による被害が増加し、養殖漁業のすべてに随伴する最も緊急な課題として魚病問題が登場してきた。このため、魚病問題の解決は養殖漁業の発展と振興を図るために避けて通れない課題になった。

養殖アユに発生する魚病としては、カビ病(ミズカビ病や真菌性肉芽腫症)、寄生虫症(微孢子虫のグルゲア症、単性代吸虫のギロダクチルス類、杯頭条虫や甲殻類のエルガシルス症など)、細菌感染症(ビブリオ病、エロモナス症、出血性腹水症、細菌性鰓病、細菌性冷水病や連鎖球菌症など)が主で、他の養殖魚に比較して種類は少ない。

ワクチン開発研究の取り組みが始まった 1973 年度における水産庁研究開発部の魚病被害水産用医薬品使用状況実態調査結果によれば、養殖アユについて全疾病発生件数の 66% がビブリオ病、12.4% が寄生虫症、5.1% が他の細菌性疾病、4.4% がカビ病の順であった。ビブリオ病による被害額は 3 億円(全体の 88%)を超え、この対策が最大の課題であった。

本稿ではビブリオ病対策への取り組みが開始された 1960 年代後半から、わが国最初の「水産用ワクチン」が誕生した 1988 年ころまでの開発研究の経緯について振り返る。

1 多剤耐性菌の出現がワクチン開発の契機に

ビブリオ病は 1960 年代の半ばに散見されるようになったが、1972 年ころまでは市販の抗生物質(テトラサクリン、クロラムフェニコール)やサルファ剤、ニトロフラン誘導体などの水産用医薬品の使用によって顕著な効果が認められ、深刻な問題にはなっていなかった。しかしながら、その後 R 因子によるビブリオ病多剤耐性菌が原因となった激しい流行が全国的に拡大し、養殖アユ主産県では過去にない甚大な魚病被害を受けた。

これら耐性菌の出現は治療や予防のために薬剤が多用されたことに関連していると考えられ、特定の抗菌剤を反復使用することにより治療効果が低減し、酷い場合には全く効果が認められない事例も多く確認された。魚病の発生は単に養殖経営の悪化をもたらすだけでなく水産資源にも悪影響を与え、病気の多発がもたらす医薬品の濫用は食品衛生及び

公衆衛生上無視し得ない問題になった。

アユ養殖業の健全な発展を期すためにはこれらの魚病対策の確立が喫緊の課題であり、従来のような化学療法による治療に過度に依存するのではなく、予防に視点を置いた技術の開発が求められた。このことが本格的にビブリオ病ワクチン開発研究に取り組む契機となった。併せて適正な養殖管理技術及び良好な養殖環境の維持に最大限努めることも大切であるとして、再認識されたことは言うまでもない。

2 アユのビブリオ病とは

アユのビブリオ病に関する最初の記載は、保科(1957)によるニジマス(V. piscium var. japonicas (*V. anguillarum*))がアユにも感染するという報告であるが、実際の症例については記載がない。室賀・江草(1967)は、浜名湖における海産稚アユが採捕後3～5日目に大量斃死するのは*V. anguillarum*感染症によるものであることを初めて確認した。その後室賀は同じ疾病が利根川河口産アユ(室賀・元信 1967)及び伊豆の海産稚アユ(室賀 1975)にもみられたことを明らかにしている。更に、室賀・江草(1970)は1968年及び1969年に滋賀、長野両県下の淡水養殖場のアユに流行したビブリオ病を調査し、淡水域のアユにも*V. anguillarum*感染症が存在することを確認している。*V. anguillarum*は海水由来の細菌と考えられていることからすれば、これは大変興味深いことである。今ではアユのビブリオ病(*V. anguillarum*感染症)が全国各地に広く分布していることは周知の事実となっている。

3 ビブリオ病の発生状況と病魚の症状

ビブリオ病の発生は海産、河川産及び琵琶湖産など種苗の由来に関係なく、養殖の全ての段階において認められている。いずれの種苗の場合も12～2月ころの低水温期の種苗では発病例が少なく、水温が上昇する4、5月以降に発生例が多くなる傾向にあることは、経験的によく知られている。この時期には解禁前の高価格を狙った出荷作業も始まり、魚の選別や池替えなど魚を移動する機会も多くなることから発病が多くなる。

一方、二期作目の稚アユが搬入されるころにもビブリオ病の発生がよくみられ、夏場にかけて流行の盛期を迎える。その後、発病、流行、終息、再発を繰り返しながら全養殖期間を通して本病が確認されている。

病魚は一般に活動が緩慢になり、群から離脱し、池壁あるいは水面近くを力なく遊泳するが、死亡直前にはしばしば苦悶狂奔する。稚アユでは躯幹部に白濁部分の形成がみられることもあるが、若令魚及び成魚では初期症状として体表に斑紋状ないし帯状の褪色部分が認められ、病状の進行に伴い出血及び潰瘍の形成がみられる。その他眼球の出血や突出、肛門の発赤、拡張などが認められる。内臓諸器官の症状は、腸管の充血、肝臓のうっ血、脾臓・腎臓の腫大、脆弱化などの病変がみられる。

病気の経過は水温などの環境要因によって変動するが、一般的に病勢は急激で感染・発病から死亡までの経過時間はきわめて短く、普通2～4日である。死んだ魚が排水口の金網に吸い寄せられ、これらを1～2時間に1回は取り除かないと池水がオーバーフローしてしまい、徹夜作業になることもしばしばあった程である。

4 原因菌と血清型

ビブリオ病の原因菌は、現在では *Vibrio anguillarum* 及び *Vibrio ordalii* であるとされているが、大多数の発病は前者に起因したものである。ビブリオ病ワクチン開発研究の途中段階で後者が発見されているが、ビブリオ病ワクチン開発研究では *V. anguillarum* 感染症を対象として進められた。

本菌は長さ 1~3 μ の短桿菌で 1 本の極鞭毛を有し活発に運動する。生化学的な性状は省略するが、調査研究で *V. anguillarum* の中には *Vibrio* 属への分類で重要な鍵の一つである *pteridine* 化合物 *O*/129 に対する感受性が陰性を示す例外的な株や、非運動性の株が存在することも分かってきた。

自然界における本菌の分布や生態は必ずしも明らかにされていないが、沿岸水域や海底泥に、琵琶湖では保菌アユ、雑魚あるいはプランクトンなどの中で生存しているものと推測されている。感染経路としては鰓、皮膚及び消化管が挙げられている。自然感染魚や実験感染魚の病理組織学的検討から、細菌の感染門戸は主に皮膚からの経皮感染によるものと考えられている。

ワクチンの実用化を図る上で重要な製造用菌株選定のため、ビブリオ菌の血清型や型別の分布状況等が調査された。加熱死菌による血清型の分類では、表 1 に示すようにほとんどが 3 つの血清型のいずれかに属した（後に海産由来のアユからは極めて稀にこの型以外のものも発見されている）。

表 1 徳島県下の養殖アユ病魚から分離された *Vibrio anguillarum* の血清型

調査年	分離菌株数	各 型 の 株 数 と 頻 度 (%)		
		<i>J-O-1</i>	<i>J-O-2</i>	<i>J-O-3</i>
1977	128	106 (82.8)	13 (10.2)	9 (7.0)
1978	80	47 (78.3)	2 (3.3)	11 (18.3)
1979	68	62 (91.2)	2 (2.9)	4 (4.9)
1980	113	108 (95.6)	2 (1.8)	3 (2.7)
1981	439	405 (92.3)	4 (0.9)	30 (6.8)
1982	301	269 (89.4)	6 (2.0)	26 (8.6)
1983	504	459 (91.1)	0	45 (8.9)
計	1,613	1,456 (90.3)	29 (1.8)	128 (7.9)

1977 年から 1982 年にかけて徳島県下で分離された 1,613 株の生菌抗原と抗血清とのスライド凝集試験の結果では、*J-O-1*、*J-O-2* 及び *J-O-3* 型のいずれかの血清タイプに分類されることが確認された。*J-O-1* 型が 1,456 株 (90.3%)、*J-O-2* 型が 29 株 (1.8%)、*J-O-3* 型が 128 株 (7.9%) であり、*J-O-1* 型が主体をなすことが判明した。

種苗の由来別にみると、*J-O-1* 型は琵琶湖産稚アユを、*J-O-2* 及び *J-O-3* 型は海産稚アユを種苗とした養殖アユから多く分離される傾向があった。また、徳島県以外の主産県でも *J-O-1* 型が圧倒的に多く分離されている。これらの結果を踏まえて、免疫原としての製造用菌株は血清型 *J-O-1* 型を選定した。

5 ビブリオ病ワクチンの開発研究

わが国で薬剤耐性菌の出現によるビブリオ病が多発したのは1973年ころであった。これに前後して米国で実施されたFryerら(1972)によるサケのビブリオ病に対する死菌経口ワクチンの有効性についての報告や、それに続く浸漬免疫、噴霧ワクチン等、次々に新しい方法が発表された。米国における浸漬免疫法の最新情報は、春の水産学会に付随して毎年開催されていた「江草周三先生を囲む勉強会」で帰国直後の先生から紹介された。

従来予防免疫による魚病対策は現場には簡単に応用できないと考えられてきたが、この劇的な研究成果に刺激されて1974年ころから大学やアユ主産県の多くの水産試験場が自家製のビブリオ病ワクチンを用いて開発研究に取り組む機運が生まれ、やがて共同研究が開始されることになった。

6 共同研究体制と国の対応

ワクチン開発研究では、当初基礎的研究及び応用的研究が共通認識のもとで同時進行の形をとり進められた。表2に示したように、アユのビブリオ病ワクチンの本格的な取り組みは、高知大学と徳島県との共同研究(楠田ら、1976)によるが、ここでは経口ワクチンの種類、投与量、投与期間、効果の持続性及びブースター効果などが検討され、一定の成果を挙げた。当時甚大な被害を被った徳島県の小竹子之助水産試験場長は、水産動物に使用することが認められていない動物用医薬品が現場で使用されている事態を憂慮され、研究の効率を高めワクチンの実用化に向けた取り組みを加速するため、「全国湖沼河川養殖研究会」にビブリオ病研究部会の設置を提案し、全国的な規模での試験研究の推進を呼びかけた。これが契機となって、異なった飼育環境条件下で同一の試験方法による実験事例の

表2 アユのビブリオ病ワクチンの試験研究の経緯

年度	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
組 織														
高知大学・徳島県共同研究	○	○												
全国湖沼河川養殖研究会 (ビブリオ病研究部会)			○	○	○	○	○	○						
水産庁指定研究補助事業					○									
水産庁委託研究 (日本水産資源保護協会)						○	○	○	○	○				
アユのビブリオ病研究会									○	○	○	○	○	○

集積を図り、実用化に向けた実験手法の確立、実験技術の習得と参加機関の技術レベルアップ等を目指した取り組みが開始されることになった。

一方、国でもこれまでの経緯を踏まえて、魚類に応用されるワクチンの開発研究から実用化に至るまでの開発手順を明らかにしておく必要性を認識し、これらの動向と並行した形で検討が行われて、1977年に指導通達「水産用生物学的製剤の取扱いについて」が都道府県及び関係諸団体に出された。この中で基礎的資料、基礎的試験を行った後に、研究機関における野外試験、養殖場における野外試験の順に行うとの手順が初めて示された。

アユのビブリオ病ワクチンについては、次第に開発研究も進み、野外試験へ発展し得るものができたこともあって、開発研究の進め方が一層明確にされた。1982 年の通達「水産用生物学的製剤の開発研究について」では、実用化に至るまでの開発手順は概ね図 1 のように進めることとして、当面不活化ワクチンに限定すること、魚病対策総合検討会医薬品等分科会ワクチン部会により野外試験に進めるか否かの判定を行うこと、野外試験を公的試験研究機関に一本化すること等の改善が図られた。

図 1 のフローチャートのように、開発研究は A (基礎的資料)、B (基礎的試験) の知見を集積した後に C (野外試験) を行うこととしている。A では成分及び分量、製造方法、用法及び用量、効能又は効果、貯蔵方法、有効期間、規格及び試験法等々を定め、B では①規格及び試験方法設定に関わる試験、②有効性及び安全性に関わる試験の項目等を定め、有効性試験 (攻撃試験、抗体産生確認試験) 及び安全性試験 (毒性試験、安全性試験) を実施した上でワクチン部会での可否の検討を経て、可と判定されればその後に C を実施することとされている。

国では水産用生物学的製剤の開発研究を推進するため 1978 年に委託研究事業を立ち上げ、(社) 日本動物用生物学的製剤協会 (動生協) に、1) 製造用菌株に関する検討、2) 製造用培地と培養方法の検討、3) 不活化剤及び不活化方法の検討、4) ワクチンの安定性、5) 安全性に対する検討、6) ワクチンの有効性試験等について開発研究の推進を求めた。

参加企業は(社) 日本動物用生物学的製剤協会傘下の北里研究所 (北研)、(社) 日本生物科学研究所 (日生研)、(財) 化学及血清療法研究所 (化血研) 及び共立商事株式会社 (現在の共立製薬株式会社) の 4 社体制でスタートし、後に株式会社微生物化学研究所 (京都微研) を加えた体制になった。

一方、1978 年動生協と同様に都道府県にも当時ワクチンの有効性を判定する方法やその基準は必ずしも確立していなかったことから、飼育施設や室内実験施設を備え各種試験に取り組める体制にある水産試験場に対して、水産庁では指定研究補助事業 (指定調査研究総合補助事業) を予算化しワクチンの効果判定法に関する開発研究を取り上げた。この課題は後に水産庁委託研究 (日本水産資源保護協会) へと引き継がれて実施された (表 2 試験研究の経緯)。

7 ワクチンの効果判定について

ワクチン開発において、再現性のある効果判定法の確立は必須の要件である。従来からワクチンの有効性を判定する方法としては、魚体内に産生された抗体の存在あるいはその力価を測定する方法と、病原菌に対する防御反応を調べる方法とがある。アユのビブリオ病の場合には、前者の方法による有効性の判定は困難であるとされていた。それは、確実に防御能力は認められるが凝集素価の上昇がごく僅かであったり、あるいは全く認められない例が多いためである。一方、後者の方法では、ワクチン投与群と非投与群 (対照区) での自然感染による発症を待ってその効果を判断するか、人為的感染により攻撃の負荷をかけて生残率の差で有効性を判定するやり方が選択されることとなる。この場合には、再現性のある攻撃方法を明らかにしておく必要があった。

生残率の差で効果判定を行う攻撃法には、表 3 に示すような方法が考えられたが、それぞれの攻撃方法には一長一短がある。自然感染による場合、発病がなく試験が成立しない

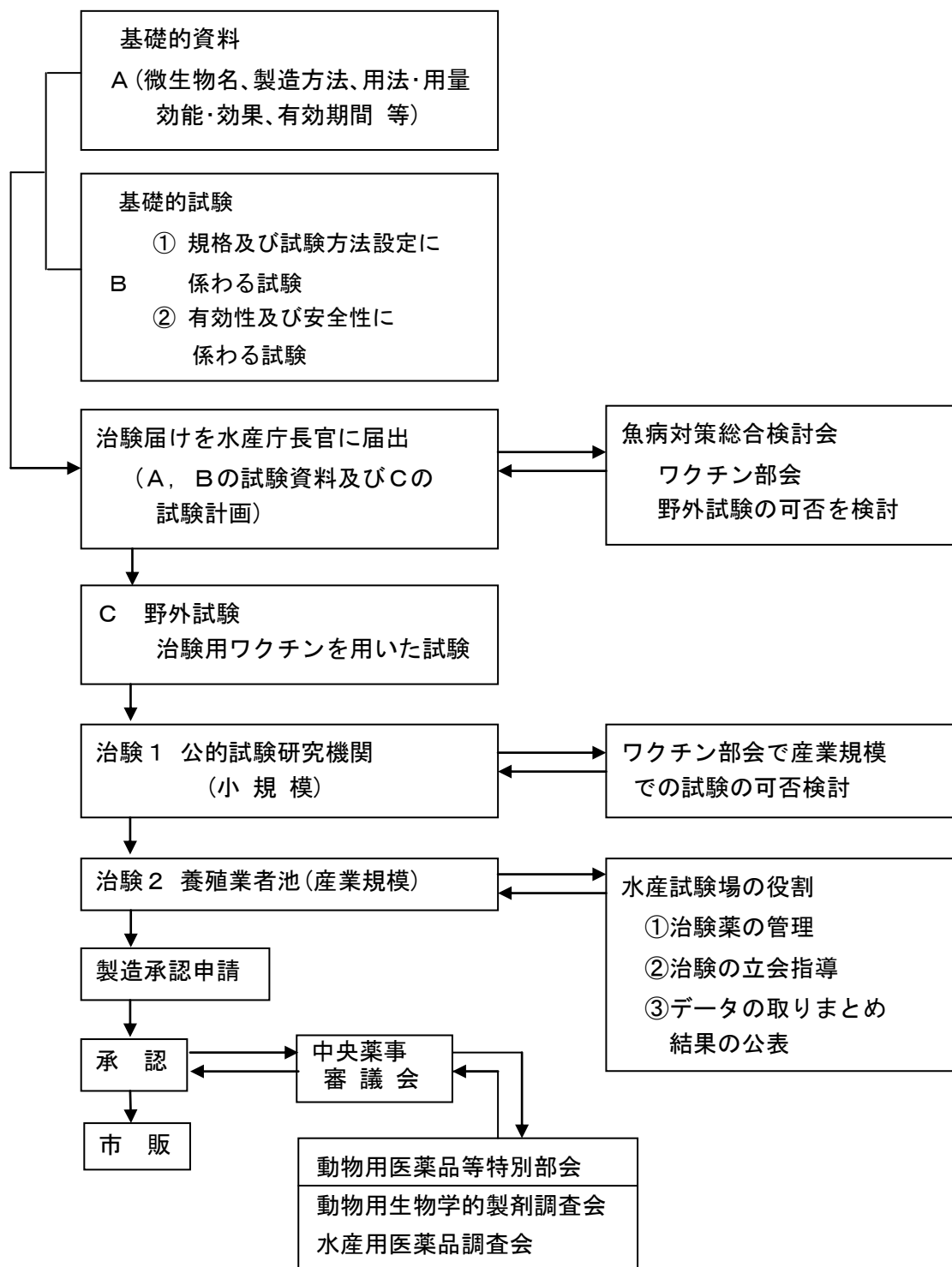


図 1 魚類ワクチン開発の手順

ことも想定され、この時にあっても試験魚の一部を実験室に持ち込み人為感染を図ることによって有効性を判定することが可能である。この点からも人為的感染による再現性の高い攻撃法の確立が必要であった。

この条件に適う添加法、注射法(筋肉内接種)及び浸漬法の3つの攻撃法の特徴について検討した。

1) 添加法

病死魚を投入したりあるいは人為感染魚のいる飼育排水を均等に導入し、病魚から排泄されるビブリオ菌によって攻撃を行う方法で、養殖場での自然感染に近く再現性も高く優れた方法である。しかし、攻撃菌量が不明で、感染強度を数量的に表示できないという欠点があるため、この方法はワクチン効果の判定法としては問題があった。

2) 注射法

筋肉内接種による攻撃では接種量と感染・死亡との間にはかなり安定した量的な関係が認められた。しかしながら、この注射法は操作が煩雑で一度に多数の個体を処理できず、魚体が小さい場合には接種が困難なこと、自然感染に比較して過激な感染方法であると考えられることなどで問題があった。また、注射法による感染魚は、接種部位の発赤ないし出血性膨隆あるいは胸鰭基部の充血を示すのみで、自然感染魚で一般に認められる出血性の潰瘍はみられなかった。それゆえ、特に免疫効果判定のようなより自然感染に近い攻撃方法が望まれる実験方法としては不相当と考えられた(城ら、1978)。

3) 浸漬法

浸漬法とはある程度濃度の高い生菌懸濁液に短時間魚を浸漬し、感染をはかる方法である。攻撃菌量を計数できる上、操作が簡便で一度に多数の個体を処理でき、かつ比較的小型魚にも応用できることに加えて、注射法よりも自然に近い感染方法であると考えられた。浸漬法による死亡魚の症状は自然発病魚のそれとよく一致し、典型的なビブリオ病の症状を再現した。

浸漬攻撃により感染・死亡が成立すること、菌濃度が高くなるにつれて死亡率が上昇することから、再現性のある感染方法であることが確かめられた。この方法を確立させるため、攻撃菌の毒性、保存による毒力の低下、食塩添加の効果、浸漬時間、浸漬攻撃後の飼育水温の影響や実験魚の大きさなどの課題について更に具体的に検討した(城ら、1979、80、81、82、83、84)。以下に要約して説明する。

①分離菌株の毒性

分離後4年を経過した株と新鮮分離株では、共に浸漬攻撃により感染・死亡が成立すること、新鮮な株ほど毒性が高いことが明らかになった。更に菌濃度と死亡率の間には関連があり、濃度が高くなるにつれて死亡率が上昇した。

②保存による毒力の低下

菌株の毒力を維持した保存方法を検討し、真空凍結乾燥処理をすれば約4ヶ月間保存した後にも毒力は維持されることを確認した。ハートインフュージョン(HI)寒天培地を用いた保存では、室温下で約1ヵ月後に、低温下(1~2℃)で約4ヵ月後に起病力の低下が認め

表3 効果判定法

- (1) 自然感染
- (2) 人為的感染
 - 1) 添加法
 - 2) 注射法
 - 3) 浸漬法
 - 4) 経口法

られ、低温保存により起病力の低下を抑えることが示された。また、保存により毒力が低下した菌株は、魚体通過を行うことで毒力が回復することを確認した。

③浸漬攻撃時の食塩添加の効果

攻撃用菌液に食塩(0、0.5、1、2、3、4%)を添加すると死亡率が上昇することが確かめられたが、1%以上の濃度にしても死亡率は上昇しない結果が得られ、添加量は1%で充分であると考えられた。食塩添加は弱毒株あるいは少ない菌量で攻撃を行う場合、死亡率をある程度引き上げる手段として有効であると考えられた。なお、3%以上食塩を添加した場合、実験魚はすぐに狂奔遊泳をはじめ、やがて横転した。浸漬終了後清水に収容すると、しばらく後には全て正常な遊泳行動をとったが、浸漬中の異常な様態から高濃度の食塩添加は強いストレスを与えることが明らかになった。

④浸漬時間の影響

食塩を無添加の場合、浸漬時間 2.5 分から 10 分間まで検討したが、2.5 分以上に延長しても死亡率が高くなることはなく、2.5 分間で充分であることが分かった。一方、食塩を添加した場合、0.5 分から 5 分間まで検討したが、1 分以上に延長しても特に死亡率が上昇することはなかった。浸漬時間を延長しても死亡率が高くない理由は明らかではないが、浸漬法による攻撃で、感染は比較的短時間に成立すると考えられた。

⑤浸漬後の飼育水温の影響

水温約 20℃で菌液浸漬後、10℃区、15℃区、20℃区の飼育水槽に収容した。飼育水温の違いによる最終死亡率に大きな相違はみられなかった。しかし、症状が認められる時間には差がみられ、15℃区及び 10℃区での平均死亡日数は、20℃区と比べてそれぞれ約 1.5 倍、約 2.0 倍を要し、温度が低くなる程長くなる傾向がみられた。

⑥実験魚の大きさの影響

1 g 前後のものでは感受性が高く、魚体の取り扱いも慎重にしなければ物理的なショックでも斃死がみられた。2~5 g 程度の魚体では 10 g 以上のものと病魚の症状、死亡率及び平均死亡日数はほぼ同様で、特に違いは認められなかった。

4) 効果判定のための攻撃方法のまとめ

以上を総括すると、浸漬攻撃法は再現性のある攻撃法としてワクチンの効果判定に応用し得る極めて有効な方法であることが分かった。一連の実験結果から、最良の攻撃方法としては、①起病力の高い攻撃菌株を選定し、必要に応じ真空凍結乾燥により冷蔵庫などに保存する、②実験に際して培養し、1%食塩水に加えて 10^6 細胞/ml 前後の菌濃度に調整する(濃度は3段階設けて攻撃することが望ましい)、③供試魚は 2 g 以上のアユを用い、前記の菌液に 3~5 分間浸漬する、④その後、水温 10~23℃の飼育水に収容する、⑤攻撃後の観察日数は、多くの場合 1 週間以内にほとんどのアユは死亡し、10 日を経過して死亡することは稀であることから、2 週間観察すれば充分であることが分かった。

野外試験では自然感染によってワクチンの効果判定を行うことになるが、仮に自然発病のない場合であっても、実験魚の一部を取り上げて室内実験レベルと同様にこの方法を用いて攻撃を仕掛ければ、ワクチンの有効性を判断できることが確認された。

8 予防免疫の有効性

魚類の免疫については、少なくとも硬骨魚類ではかなり高度の免疫反応がみられることが知られている。わが国でもビブリオ病に先立つ 1960 年代後半から、サケ科魚類のせっそう病に対して東京、長野、岐阜、静岡都県などで精力的にワクチン開発研究が実施され、経口投与では効果が確認されなかったが、筋肉あるいは腹腔注射では確実に効果が認められる結果が得られている。このせっそう病ワクチンの開発研究での経験は、後発のアユのビブリオ病ワクチン開発の取り組みに対し貴重な知見と情報を与えてくれた。せっそう病での事例のように注射免疫法は防御能も他の免疫法に比べて高く確実に効果が期待できることが明らかにされていた。

しかし、数千あるいは数万尾を群とする魚類養殖では、注射法は大量処理が困難であり、予防免疫には簡単に応用できないというのが一般的な考えであった。それに加えて、せっそう病ワクチン開発の当時においては、薬事関係者の判断では「注射という行為は医療行為であり、獣医師ではない水産の関係者が接種することはあり得ない」との判断があり、製造承認に向けた具体的な動きはなかったという別の意味で困難な状況にあった(原博士、私信)。

この状況を一変させたのが、米国での *V. anguillarum* の死菌ワクチンをギンザケなどに経口投与することにより、ビブリオ病の被害を確実に少なくすることを実証した研究である(Fryer ら、1972)。一方、ニジマスの高浸透圧液(NaCl 5.32%)に約 2 分間浸漬した後 2% の牛血清アルブミン液に 3 分間浸漬すると、ニジマスの血漿中にそのアルブミンが検出される事実を明らかにし、魚に抗原を取り込ませる方法(免疫法)として応用し得ることが示唆された(Amend and Fender, 1976)。これを受けて、いわゆる浸漬免疫法、更にスプレー法など次々に新しいワクチン投与方法が開発され、その有効性が実証された。わが国では主にアユのビブリオ病に対し、種々のワクチン投与方法が 1974 年ころから検討され始めた。その結果、経口免疫、浸漬免疫及び噴霧免疫の何れの方法によっても有効であることが実験的に確認されている。ここでは現場で実用化される可能性の高かった経口免疫法及び浸漬免疫法の結果について述べる。

(1) 経口免疫法による効果

ホルマリン死菌及び超音波処理ワクチンは加熱死菌ワクチンに比べ効果が高く、ホルマリン死菌ワクチンを 1 日に魚体重 1Kg 当たり 4.0 g (湿菌量、以下省略)を 2 週間以上の連続経口投与によって顕著な効果が認められる。免疫効果はワクチン投与後 4 週間にわたって持続され、その後効果は低下するが、4 週目に 1 週間の追加投与を行うと免疫が回復することなどを確認している(楠田ら、1978)。

同様にホルマリン死菌ワクチンを 1 日に魚体重 1Kg 当たり 0.16 g を 15 日間連続投与した実験結果によれば、ワクチン投与終了後 90 日目の攻撃実験でも有効性を認めている(中島ら、1979)。また、数年間にわたるワクチン投与量を検討した実験結果によれば、ワクチン投与区は無投与区に比較して明らかに死亡率が低く、効果が認められている。有効率($(1 - \text{ワクチン区の斃死率} / \text{対照区の斃死率}) \times 100$)はワクチン投与量と比例しており、投与ワクチン量が多いほどその効果の大きいことが示されている。有効率が 60 以上の場合を顕著な効果が認められたとすれば、投与量は 1 日に魚体重 1Kg 当たり 1 g を 15 日間連続投与す

る必要のあることが分かった(城ら、1984)。

しかしながら、ワクチンの有効性は確認されたものの経口免疫法では投与期間が長期に亘るため、成長に伴う投与量の調整、配合飼料への均等な混合等煩雑な作業量が禍し、次に述べる浸漬免疫法のワクチン効果及び簡便な処理方法に比べて使い難かったことから、実用化に向けた取り組みは結局実施されなかった。

(2) 浸漬免疫法による効果

浸漬免疫法については、Amend and Fender の方法に従って養殖アユを高張圧溶液(5.32%食塩水)に2分間、次いで *V. anguillarum* のホルマリン不活化培養液中に3分間浸漬するいわゆる二浴法で予防効果がみられたことを報告している(青木 宙ら、1978)。しかし、高張圧溶液及び *V. anguillarum* の死菌培養液への浸漬は、特に稚アユに対して影響が高く、多数の死亡魚がみられたと言う。そこで、死菌培養液を遠心し、上澄液と菌体再浮遊液(沈殿した菌体を生理食塩水に再浮遊させた液体)を用いて浸漬処理を行った。上澄液処理区でアユに対して毒性がありながら、1ヶ月後の攻撃試験で防御効果が全く認められなかったのに対し、菌体再浮遊液浸漬処理区では死亡魚もみられず1ヶ月後の攻撃試験で防御効果が認められたことを報告した(青木ら、1978)。

同様に、アユを食塩液(7%)に2分間浸漬し、次いでワクチン原液の10倍希釈液(1.3×10^8 細胞/ml)に3分間浸漬(二浴法)する高張浸漬法でも効果が認められている(中島ら、1979)。

また、アユを高張液に浸漬する前処理を行わず、ホルマリン死菌液に魚を浸漬する一浴法によっても二浴法に劣らず顕著な効果が認められている。ワクチン濃度と浸漬時間の関係について有効性を比較したところ、同一のワクチン濃度で浸漬時間を変化させた場合、濃度と時間の間には相関関係があり、浸漬時間が長くなる程その効果が大きいことが分かった。また、逆に浸漬時間を一定にし、ワクチン濃度との関係をみると、当然のことながら濃度が高くなる程その効果は大きくなった。一連の実験結果から有効率が60以上を示す顕著な効果は、少なくとも1g/l浸漬処理では約40秒、0.1g/l浸漬処理では10分間、0.01g/l浸漬処理では1時間、0.001g/l浸漬処理では6時間の浸漬で効果が認められることが分かった(城ら、1981、1984)。

1) 免疫の持続性

ワクチン処理時のワクチン濃度と浸漬時間にもよるが、その効果は約2ヶ月は持続すると考えられた。

2) 浸漬免疫時の水温の影響

浸漬免疫時の水温がワクチンの有効性に及ぼす影響については、10℃処理区で僅かに有効率の低下がみられたが、15℃、20℃及び25℃処理区ではほとんど差は認められなかった。したがって、アユ養殖の実態からみて処理時の水温は特に問題にはならなかった(城ら、1983)。

3) 血清型の問題

異なる血清型 *J-O-1* 型、*J-O-2* 型、*J-O-3* 型及び *V. ordalii* でワクチン処理した実験魚を *J-O-1* 型菌によって攻撃した場合、*J-O-1* 型ワクチン処理区が最も高い有効率を示し、次の

で、*J-0-1* 型菌と共通抗原をもつ *V. ordalii* が高かったが、*J-0-2* 型及び *J-0-3* 型では全く効果が認められず、ワクチンの有効性は血清型に強く依存していることが確認できた。流行しているビブリオ病は 90%以上を *J-0-1* 型菌が占めているが、将来的には流行するビブリオ病の血清型を予測して決定するか、多価ワクチンについて検討する必要性を指摘した(城ら、1984)。

4) ワクチン賦与時の魚体の大きさ

免疫を効果的に賦与できる魚体の大きさ、すなわち防御能を獲得する時期を知ることは重要である。種苗生産中の平均魚体重が 0.15 g (0.06~0.25 g) の仔稚魚にもワクチンの効果が確認され、種苗生産過程の仔稚魚においても応用可能なことが分かった(城ら、1984)。

5) ワクチン処理後の免疫獲得

処理 1 日、2 日、3 日、4 日、6 日及び 9 日後に攻撃を仕掛けたところ、防御力は処理後の時間経過とともに上昇した。効果判定基準の有効率が 60 以上に達する日数は 4 日目で、有効率が 100 近くに達する防御能力の獲得は 6 日後と、極めて速いことが分かった(城ら、1984)。

9 治験に向けた国の対応

開発したワクチンについて医薬品としての製造・販売に関する薬事法上の承認を得るためには、臨床試験(治験)を実施し、その試験成績に関する資料を収集しなければならない。

効果判定のための浸漬攻撃法の確立及びワクチンによる予防免疫の有効例のデータが集積されるにつれて、1985 年に水産庁は「サケ科魚類及びアユのビブリオ病不活化ワクチンに関する臨床試験の進め方」について、魚病対策総合検討会ワクチン部会の検討を経て具体的な指針を発表した。これによって試験動物の具備すべき条件(各成長段階のもので飼育方法等が明らかで健康なもの)、試験尾数(1 用量群当たり 200 尾以上で、適正な摂餌を妨げない尾数)、試験施設(国内 2 ヶ所以上の公的試験研究機関)、投与期間(適用を予定している期間)、投与方法(適用を予定している用法)、投与量(適用を予定している用量)、試験設定(環境の異なる 2 ヶ所以上の施設等)及び試験の取りまとめ(試験実施機関の名称、担当者名、試験実施場所、実施期間等々)等、記載内容が明示され、それに沿って臨床試験が各県の水産試験場で精力的に開始された。

しかしながら野外試験の試験結果を比較検討する過程で、上記臨床試験の進め方では各県の試験方法が細部で統一されていないために不都合が生ずることが指摘され、また、製造承認申請をした段階での審査に耐え得るような試験資料を作成する必要があること、審査を容易にするためには統一された様式によって各県の試験成績を表示する必要があること等の理由から、水産庁では水産試験場の意見を聞きながら検討し、水産試験場及び養殖場における野外試験結果の取りまとめ様式を提案した。この様式は後に治験の受け皿になる「アユのビブリオ病研究会」に諮って承認され、環境条件の異なる各県がそれに則って治験を実施した結果、有効性に関する野外試験の広範なデータが効率的に集積されることになった。

改善された野外試験の取りまとめ様式は、「試作ワクチンの試験場における野外(応用)試験」で、ここには試験依頼機関名、試験実施機関名、試験実施者名、試験期間、試験成績が記載される。特に、試験成績のうち材料及び方法については以下の(1)~(5)項について

詳細に記載される。すなわち、(1) 供試魚の状況(魚種、開始時の平均体重 g、種苗の産地、搬入年月日、病歴の有・無(病名、投薬歴の有・無))、(2) 飼育条件(飼育地の大きさ、水源(湧水、伏流水、河川水))、一次水・二次水の比率、換水率(回/時)、瀑気方法、水温℃、(平均℃)、(3) 飼料及び給餌方法(飼料の種類、給餌方法、給餌回数(回/日))、(4) ワクチンの種類と投与方法、供試ワクチン(Lot No.)、投与年月日、ワクチンの処理方法、(5) 攻撃試験の方法(使用した菌株名(血清型)、菌濃度、免疫後の日数、供試魚尾数(平均体重 g)、観察期間等)である。試験の結果については、(6) 結果①自然発病の有無、試験期間中の自然発病の有・無、試験期間中の斃死魚数の変化(図示)、②飼育成績、③攻撃試験成績、④ワクチンの有効性、(7) 考察について具体的に記載されることになり、承認申請の審査に充分耐え得るものであった。

10 治験ワクチンへの取り組み

実用化に向け 1982 年 11 月に養殖研究所で開催された第 1 回アユのビブリオ病研究会には、助言者として高知大学楠田理一教授、水産庁から阿部和夫技官、養殖研究所から原 武史病原生物研究室長及び 15 都県の関係者が参加した。

ここでは(1)各県の養殖アユの病害発生の実態、(2)化学療法剤(薬剤感受性)の動向、(3)ワクチンの効果試験結果及び関連試験についての研究発表と討論が行われ、各県のビブリオ病の発生やワクチンの取り組み状況を確認して共通認識を深め、次年度に向けた研究計画について協議が行われた。

第 2 回アユのビブリオ病研究会は、翌 1983 年 5 月薬業健保会館で「アユのビブリオ病ワクチン野外試験の進め方」を主テーマに開催された。これまでの試験結果から治験の実施が可能な段階にあることが説明され、ワクチンの実用化に当たって治験は法的に避けて通れない試験であり、また、実施機関は都道府県の水産試験場以外には考えられないことから、全国水産試験場長会でも協力要請が行なわれた。このような現状から本研究会が治験実施の受け皿になることになった。更にワクチン投与による事故の責任は治験依頼者にあり、ワクチンについては安全性と有効性の結果が必要であるが、治療薬ではないので残留性については不要との説明があった。

前述の「臨床試験の進め方」及び「野外試験の進め方」で開発の道筋が整備され、1984 年から初めて治験ワクチンを用いた野外試験が実施できることになり、この状況を踏まえて、特に原室長から実用化に向けた実験計画の進め方について指導を受け、参加各県で取り組むことになった。既に述べたように治験は公的試験研究機関 2 ヶ所以上で野外試験のデータを得る必要があり、この研究会で取り上げるメリットは、(1) 個々の対応では治験の結果が一部関係者にしか分らないが、研究会で取り上げることでデータが全て公表されること、(2) 水産試験場が指導機関としてその扱い方を事前に経験し熟知することは、今後の指導・普及にプラスになると考えられたからである。

治験実施機関として 10 県から参加表明があり、治験を要望した開発メーカー 5 社の治験用ワクチンを用いて水産用ワクチンの誕生を目指した試験が開始されることになった。

実用化に向け 1982 年 11 月に開催された第 1 回アユのビブリオ病研究会から 6 年の歳月を経て、1988 年 8 月にアユのビブリオ病不活化ワクチンの製造が水産用ワクチンの第 1 号として目度く承認され誕生した。

1 1 ワクチンの開発研究に携わった人々

ワクチン開発研究に当初から携わり指導頂いたのは、淡水区水産研究所(水産庁魚病指導専門官併任)の原 武史博士である。1978 年の冬であったと記憶するが、指定調査研究総合助成事業の報告会の後に、新たに取り組むことになるアユのビブリオ病ワクチンの効果判定法に関する研究の実験計画について指導・助言を得るため、港区白金にあった北里研究所の伊沢久夫研究開発担当部長(後に北大獣医学部教授)の許に、辺りが薄暗くなった時間帯にご一緒して訪問したことを今でも良く憶えている。その時の助言を基に、まず攻撃菌濃度と浸漬時間の関係を解明することを主目的に補助事業を受け、ついで委託事業へと 6 年間に亘る基礎研究が開始され、これらの事業により人為感染によるワクチンの効果判定法は確立することになる。

原博士はその後、養殖研究所病理部病原生物研究室長に異動された後も関係都府県水産試験場の研究員や現場の漁業者のおかれた立場を十分に理解して研究体制を整備し、実用化に向けた開発研究のリーダーとして指導力を発揮して頂いた。このことが研究会会員のレベルアップに繋がり、短期間に研究成果を挙げ得た最大の理由であったと思っている。原博士の長年に亘るサポートと、アユのビブリオ病研究会の 15 都県担当者(敬称略、北から栃木県水試 大友時夫、東京都水試奥多摩分場 井上 潔、新潟県栽培漁業センター村上支場 土屋文人、山梨県魚苗センター 中島甚寛、長野県水試佐久支場 羽毛田則生、岐阜県水試 森川 進、静岡県水試浜名湖分場 花田 博、愛知県水試内水面分場 伊藤 進、滋賀県水試 高橋 誓・里井晋一、兵庫県立水試 田畑和男、和歌山県内水面漁業センター 見奈美輝彦、岡山県水試 山本章造・植木範行、熊本県水試内水面支場 隅田征三郎、大分県内水面漁業試験場 猿渡 実)の尽力がなければこのような成果は挙げられなかったと考えている。

また、ここに至るまでの間、長年に亘って歴代の水産庁研究課魚病担当官の木島利通、阿部和夫技官や井貫晴介、田中哲彦、小関良二各班長(順不同)には治験などの実施に当たり、県当局に対し行政上の面から格別の配慮を頂き、水産試験場の研究員が治験に参加し取り組める研究体制と環境の整備に道筋をつけて頂いたことを特記しておきたい。

1 2 時代の流れ、注射ワクチンの登場

初めて 1988 年 8 月にアユのビブリオ病不活化ワクチンの製造が承認されて以来、2010 年までに 12 種類(22 製剤)の水産用ワクチンが承認され世に出されている。2000 年代に入り、以前には考えも及ばなかった注射ワクチンが次々に承認された。注射法は投与量も正確で防御能も高いことから、主に治療が困難なウイルス性疾病や再発を繰り返し完治が困難な細菌性疾病の予防対策として開発された経緯がある。

ワクチンは動物用医薬品の一種であり、家畜では要指示薬とされている。しかし、魚類は要指示薬としての対象動物とされていないため、水産用ワクチンの使用に当たってはいくつもの規制事項が定められている。使用に先立って都道府県の水産試験場や家畜保健衛生所等の指導機関に連絡し、① 使用前の指導及び水産用ワクチン使用指導書の交付を受け、その上で ② 指導書を販売店に提示し、必要量を購入し、更に使用時にも指導機関の指導を受けるというような一種の販売上の規制が定められた。

接種作業に必要な連続注射器や注射針も薬事法の定める動物用医療用具として承認され、また、注射作業に携わる者は、全員あらかじめ水産試験場など指導機関が実施する「ワ

クチン接種技術講習会」の受講が課せられている。

市販ワクチンの 22 製剤のうち、15 品目が注射法での賦与であるが、過去には注射は医療行為で獣医師以外には使用が困難とされたものである。今日、注射ワクチンは使用上の制約はあるものの自由に現場で使用でき、水産用ワクチンの主流を占めている現状をみるにつけ隔世の感がある。

確実な効果が期待できる注射ワクチンの開発は、投与時のストレス、仔稚魚での使用や大量処理が困難なこと等の欠点を有するものの、極めて治療の困難な魚病に対して予防手段として今後も開発研究が推進されるものと思う。

終わりにあたり、ワクチン開発研究の当初からご指導とご鞭撻を頂き、本稿の取りまとめに際してもご多忙の中、貴重な助言と情報の提供を頂いた当協会理事長原 武史博士に篤く感謝の意を表します。また、ご指導と有益なご助言を頂いた当協会理事嶋津靖彦博士に深謝いたします。（引用文献名は省略した。）

（全国水産技術者協会理事・元徳島県水産試験場長）

~~~~~

## 事務局便り

### ○今年度からスタートした新規事業について

会長の年頭の挨拶にも述べられているように、設立後 3 年を経過した当協会の事業についても、多くの方々からその存在を認められるようになり、新たに二つの事業がスタートすることになりましたので、その概要をお知らせします。

#### 1 火力発電所の建て替え計画に伴う漁業影響調査

##### 1) 目 的

火力発電所の建て替え計画に伴う漁業への影響について、アサリ漁業、ノリ養殖業に対する温排水等の影響を調査する。

##### 2) 内 容

調査は水質、底質、プランクトン、魚卵・仔稚魚、マクロベントス、藻場・浅場、連続観測(水温、塩分、流況、溶存酸素量)、ノリ生育状況、アサリ生息状況、漁業・養殖業(標本漁家調査)等を調査するほか、アサリ浮遊幼生調査、ノリ生育影響調査、アサリ試験操業、生態系モデルによる解析調査等を行う。

##### 3) 実施体制

協会職員と技術専門員規程に基づき賛助会員各社から出向してきた技術専門員等が調査、解析に当たる。

#### 2 平成 23 年度アワビ放流効果調査委託業務

##### 1) 目 的

伊方町に所在する漁業協同組合ではアワビ稚貝の放流を続けているが、漁獲量が減少する傾向が続いているため、放流効果の把握を行い、効果的な放流方法と資源管理により資源回復をはかり、漁家所得の向上に寄与することを目的とする。

##### 2) 事業委託元 伊方町(産業振興課農林水産振興室)

##### 3) 契約金額 1,650,000 円(うち、消費税および地方消費税相当額 78,571 円を含む。)

4) 契約期間 平成 23 年 12 月 20 日～平成 24 年 3 月 21 日

5) 内 容

- (1) 平成 23 年 11 月 10 日に事前の打ち合わせが行われ、八幡浜漁協伊方支部、瀬戸支所、三崎漁協と伊方町、全国水産技術者協会(森実理事、小島会員)等 20 名が参加するアワビ放流調査の研究部会の設立に向けて話し合いが行われた。
- (2) 平成 23 年 11 月 21 日(月)に第 1 回アワビ放流効果調査研究部会が開催され、当協会・小島が「アワビの栽培漁業と資源管理」と題して、講演を行った。
- (3) 今年度の放流は 1 か所 1,000 個ずつ 3 か所で行われ、合計 3,000 個が放流される予定である。
- (4) 主な業務内容は、標識の取り付け、標識貝の放流、追跡調査、研究会活動、報告書の作成である。

6) 実施体制

協会から森実庸夫理事(愛媛県在住)と小島 博会員(徳島県在住)とが中心となって、伊方町、関係漁協の協力を得て業務を実施し、必要に応じて本部が支援する体制で業務を推進する。

~~~~~  
○本号に掲載した城理事による記事は、我が国初の水産用ワクチンとして製造承認を受けるに至ったアユのビブリオ病不活化ワクチンの開発経緯をまとめたものです。淡々とした筆致の陰には、記載された多くの関係者の方々の熱意と努力があったことが分かります。

「地域の水産業今昔」シリーズとして、我が国の地域ごとの水産業について、その地域を熟知している会員に原稿を依頼し、会報に掲載することによって、会員相互の理解の促進を図るとともに、水産業の将来方向について提言することとしています。会員の皆様からの積極的な投稿をお願いします。

~~~~~  
○協会の会員数 平成 24 年 1 月段階で正会員 70 名、賛助会員 19 法人です。

~~~~~  
○シンポジウム「沿岸生態系保全に向けた海の緑化技術の最前線」を 2 月 2 日に開催

次ページに標記シンポジウムのご案内を掲載しましたので、積極的な参加を期待します。当協会はこのシンポジウムの協賛団体であり、原理事長は講演「海域環境修復技術の安全性の指標について」を行います。このテーマに関連して当協会が実施している漁場造成・再生用資器材の技術評価について、会報 7 号に掲載した原理事長の記事をご参照ください。

~~~~~

一般社団法人 全国水産技術者協会

〒107-0052 東京都港区赤坂1-9-13 三会堂ビル

TEL 03-6459-1911 FAX 03-6459-1912

E-mail [zensuigikyo@ifsta.or.jp](mailto:zensuigikyo@ifsta.or.jp) URL <http://www.jfsta.or.jp>



# ◇◇シンポジウム◇◇

## 沿岸生態系保全に向けた海の緑化技術の最前線

日時:平成 24 年 2 月 2 日(木) 13:00~17:45

場所:東京大学教養学部18号館ホール

主催:海の緑化研究会、東京大学NEDO新環境エネルギー科学創成特別部門

共催:ダムフルボ酸鉄研究会

協賛:東京大学海洋アライアンス、(社)日本プロジェクト産業協議会

海洋理工学会、(社)全国水産技術者協会

### ◎プログラム

13:00「主催者挨拶」

東京大学 山本 光夫  
(海の緑化研究会会長)

#### 第1部:講演

##### <基調講演>

13:10「沿岸域の総合的管理と水産業の再生」

東京大学 多部田 茂

13:45「内湾環境の現状と環境修復技術の展望」

名城大学 鈴木 輝明

14:20「沿岸環境修復における鉄の役割と今後の展望」

東京大学 山本 光夫

休憩(14:55~15:05)

##### <海域環境修復技術の事例報告>

15:05「カルシア改質土を用いた海域環境改善事業について」

新日本製鐵(株) 植木 知佳

15:30「カルシア改質土による内湾環境改善効果の予測」

いであ(株) 永尾 謙太郎

16:55「フルボ酸鉄と栄養塩を組み合わせた施肥システムの開発」

(株)エコ・グリーン 堀家 茂一

16:20「海域環境修復技術の安全性の指標について」

(社)全国水産技術者協会 原 武史

休憩(16:45~16:55)

#### 第2部 総合討論(16:55~17:40)

17:40「閉会挨拶」

東京大学NEDO新環境エネルギー科学創成特別部門 瀬川 浩司

18:30~ 懇親会(駒場ファカルティ・ハウス)

### 【参加申込方法(E-mail)】

申込先:東京大学 教養学部附属教養教育高度化機構 NEDO新環境エネルギー科学創成特別部門  
山本 光夫

〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

TEL&FAX: 03-5465-8211, E-mail: ryokuka\_conference@eco.c.u-tokyo.ac.jp

申込記載事項: 1) 氏名 2) 所属 3) 役職(学生の場合は学年) 4) 連絡先(電話、E-mail) 5) 懇親会参加の有無

### 【お問い合わせ先】

上記申込先、または海の緑化研究会事務局

海の緑化研究会 事務局(笠原・菊地)

いであ(株) 国土環境研究所 生態解析部

〒224-0025 神奈川県横浜市都筑区早渕2-2-2

TEL: 045-593-7603 FAX: 045-593-7623

参加費無料  
(懇親会費4,000円)