

アラメのエタノール抽出物を用いたマダイイリドウイルス病の予防

千々波 行典・杉原 雄二*

Prophylactic Effects of Ethanol Extract of Seaweed, *Eisenia bicyclis*,
on Red Sea Bream Iridoviral Disease in Cultured Red Sea Bream, *Pagrus major*

Yukinori CHIJIWA and Yuuji SUGIHARA*

ABSTRACT

A domestic outbreak of red sea bream iridoviral disease was verified for the first time in a red sea bream nursery in Shikoku in 1990. Since then, outbreaks of the disease have been seen in nurseries for many fish species, such as hardtail (*Caranx delicatissimus*), yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), swellfish (*Takifugu rubripes*), etc., and have done serious damage while expanding to the fish nurseries of western Japan.

Although it was believed that administering vitamin compounds or immunostimulators, or performing feed withdrawals was effective, the results were not clear. Moreover, although an effective vaccine for red sea bream iridoviral disease was put on the market in 1999, there were obstacles such as it must be injected into the abdominal cavity one fish at a time, the cost is high, etc.; issues that make it difficult to adopt the vaccine in Saga Prefecture. Thus, fish nurseries are requesting something that can be added to fish foods and medication and act as a preventative agent for the disease at low cost.

In recent years, research has been performed on marine organisms about substances with antiviral properties. It has been reported from in vitro studies that methanol extract from several seaweeds found distributed along the Japanese coast have antiviral properties against IHNV (Infectious Hematopoietic Necrosis Virus) in salmon.

In this research, ethanol extract of seaweed (*Eisenia bicyclis*) was distributed over the Genkai coast of Saga Prefecture to test its prevention of red sea bream iridoviral disease. We are reporting that the result was a high level of prevention.

はじめに

国内におけるマダイイリドウイルス病の発生は、1990年に四国のマダイ養殖場で初めて確認された。その後、本疾病の発生は、西日本各地の魚類養殖場に拡大するとともに、シマアジ、ブリ、トラフグなど多くの養殖魚にもみられ、甚大な被害を与えている。

マダイイリドウイルス病の予防対策としては、これまでビタミン剤¹⁾や免疫賦活剤の投与、餌止などが有効とされてきたが、その効果については明らかではなかった。また、1999年には、マダイイリドウイルス用不活化ワクチン²⁾が発売されたが、1尾づつ腹腔内に注射しなくてはならないことや、コストが高いことなどが障害となり、本県の養殖現場では普及しにくい状況にある。このよう

なことから、養殖現場からは、本疾病の予防剤の利用条件として、餌料に添加して投与ができること(簡便性)および低コストであること(経済性)が要求されている。

抗ウイルス活性物質については、近年、海洋生物などからの検索が行われている。日本沿岸域に分布するいくつかの海藻にも、そのメタノール抽出物が、in vitroにおいてサケ科魚類の伝染性造血器壊死症の原因ウイルス(Infectious Hematopoietic Necrosis Virus, IHNV)に対する抗ウイルス活性を有していると報告されている³⁾。

そこで、本研究では、本県玄海沿岸域に分布するアラメ(*Eisenia bicyclis*)のエタノール抽出物を用いて、マダイイリドウイルス病に対する予防試験を行った。その結果、高い予防効果が得られたので報告する。

* 現 佐賀県有明水産振興センター

材料および方法

アラメのエタノール抽出物と餌料の調製

佐賀県玄海沿岸域で4～5月に採取したアラメを直ちに滅菌リン酸緩衝液 (PBS, pH7.0) で洗浄し、表面の付着物及び粘液状物質を取り除いた。そのアラメ 10kg/wet に対し、4 倍量 (w/v) の PBS を加え、家庭用ミキサーを用いて 5,000rpm, 5 分間ミキシングした。次にその残渣にさらに 4 倍量 (w/v) のエタノール (99.5v/v%) を加え、PBS と同じ条件でミキシングし、約 40 l の上澄み液を得た。この液体を 3 l になるまで減圧濃縮し、これを 120kg の EP に添加 (添加濃度=1 とする) した。また、市販のビタミン剤及び免疫賦活剤は、各々の規定量を EP に添加し、以下の実験に供した。

室内試験

室内試験では、まず、アラメのエタノール抽出物 (以下、アラメ抽出物という) のマダイイリドウイルス病に対する予防効果を調べるために、本物質とビタミン C・E、免疫賦活剤を各々添加した EP を一定期間投与して飼育したマダイを用いて、マダイイリドウイルス (Red Sea Bream Iridovirus, RSIV) による攻撃試験を行った (攻撃試験 1)。

次に、アラメ抽出物の RSIV に対する有効投与濃度を調べるために、本物質の添加濃度が異なる EP (添加濃度=0～1) を一定期間投与して飼育したマダイを用いて、RSIV による攻撃試験を行った (攻撃試験 2)。

さらに、アラメ抽出物の RSIV に対する有効投与期間を調べるために、本物質を添加した EP (添加濃度=1) の投与期間が異なるマダイを用いて、RSIV による攻撃試験を行った (攻撃試験 3)。

また、アラメ抽出物を添加した EP で飼育したマダイが、RSIV に感染した後の RSIV の消長を調べるために、本物質を添加した EP (添加濃度=1) を一定期間投与して飼育したマダイを用いて、RSIV による攻撃試験を行った (攻撃試験 4)。

1) 供試魚

試験に先立ち、これまでマダイイリドウイルス病が発生したことがない魚類養殖場において、試験区別に生け簀網 (3m×3m×3m) を設置し、それぞれに、本県の種苗生産施設において生産されたマダイ当歳魚 (FL=5cm) を 1,000 尾収容した。給餌は、試験区ごとに設定した物質を添加した EP を 7 月から 8 月までの 2 ヶ月間、

魚体重の 2.5～3.5%/日の給餌率で週 6 日間、1 日 3 回投与して飼育し、これらを供試魚とした。なお、供試魚は、RSIV に対するモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法 (以下 IF 法) 検査で陰性であることを確認した。

2) 供試 RSIV

RSIV に感染したマダイ 0 歳魚から摘出した脾臓に、2%FBS (Fetal bovine serum, GIBCO) 添加イーグル MEM 培地 (Eagle's minimum essential medium, Nissui) を 50 倍量添加し、乳鉢により氷上磨砕した後、4℃で 3,000rpm, 15 分間遠心分離後、上清をポアサイズ 0.45 μm の滅菌メンブランフィルタ (Type JG, Millipore) でろ過分離し、そのろ液を RSIV 溶液として攻撃試験に用いた。ウイルス力価は、BF-2 細胞を用いて、TCID₅₀法により求めた。

3) 攻撃試験

攻撃試験の直前まで養殖場で 2 ヶ月間飼育したマダイを、恒温実験室 (25℃) に設置した 160 l 水槽に試験区ごとに 15 尾を収容し、攻撃試験に供した。

各試験の試験区は、攻撃試験 1 では、アラメ抽出物 (添加濃度=1) (試験区 1)、アラメ抽出物 (添加濃度=1) + ビタミン C・E (試験区 2)、免疫不活剤 + ビタミン C・E (試験区 3)、ビタミン C・E (試験区 4)、無添加の EP (試験区 5) とした。

攻撃試験 2 では、アラメ抽出物の添加濃度=1 (試験区 1)、同じく濃度=1/3 (試験区 2)、同じく濃度=1/6 (試験区 3)、同じく濃度=1/12 (試験区 4)、無添加の EP (試験区 5) とした。

攻撃試験 3 では、アラメ抽出物を添加した EP (添加濃度=1) の攻撃試験直前の投与期間を、60 日間 (試験区 1)、45 日間 (試験区 2)、30 日間 (試験区 3)、15 日間 (試験区 4)、0 日間 (試験区 5) とした。

攻撃試験 4 では、RSIV 溶液 0.1ml を腹腔内注射し、その後 2 日ごとに 2 尾ずつ取り上げ、摘出した脾臓を用いて PCR 法により RSIV の検出を行った。

なお、攻撃試験 1 は 4 回、攻撃試験 2 は 3 回、攻撃試験 3 は 2 回それぞれ繰り返し行い、それぞれ平均値を結果とし、攻撃試験 4 は 1 回行った。

各試験区の供試魚には、RSIV 溶液 (ウイルス力価; 攻撃試験 1; $10^{3.0} \sim 10^{3.8}$ TCID₅₀, 攻撃試験 2; $10^{4.5} \sim 10^{5.5}$ TCID₅₀, 攻撃試験 3 及び 4; $10^{3.25}$ TCID₅₀) を、対照区には MEM 培地を 0.1 ml ずつ腹腔内に接種して、無給餌で 17 日間飼育した。

各試験での判定は、試験終了時の生残率により行った。へい死魚は毎日取り上げ、脾臓スタンプ標本のギムザ染色による異形肥大細胞の確認およびIF法によるRSIV検査を行うとともに、腎臓中の細菌検査（BHI培地、25℃、48時間）及び一般的な寄生虫検査を実施した。

野外試験

1) 供試魚

本県の種苗生産施設において生産されたマダイ当歳魚（FL=5cm）を供試魚とした。なお、供試魚は予めIF法によりRSIVに感染していないことを確認した。

2) 野外試験

1999年以降マダイイリドウイルス病が発生している本県の魚類養殖場で、試験区別に生け簀網（3m×3m×3m）を設置し、それぞれに1,090尾のマダイ当歳魚（FL=5cm）を収容した。給餌は試験区ごとに設定した物質を添加したEPを6月から10月までの5ヶ月間、魚体重の2.5~4.5%/日の給餌率で週6日間、1日3回投与して飼育した。

試験区は、アラメ抽出物（添加濃度=1）と無添加のEPを投与した区とした。飼育期間中は、日曜日をのぞき毎日供試魚の観察及びへい死魚の取り上げを行うとともに、月に2回サンプリングを行い、魚体重の測定を行った。

アラメ抽出物のマダイイリドウイルス病の予防に対する効果は、本疾病が終息した後の生残率により判定した。また、アラメ抽出物がマダイ成長に及ぼす影響を魚体重により判定した。

結果および考察

室内試験

攻撃試験1~3の試験区別の生残率を図1~3に、また、攻撃試験4の結果を表1に示す。

1) 攻撃試験1

各試験区の生残率は、試験区1が77%、試験区2が76%で、他の試験区（26~42%）と比較すると高かった。各試験区を対照区と比較した結果、試験区1、2で有意（P<0.05）であり、アラメ抽出物は、マダイイリドウイルス病の予防に対し有効であることが示唆された。また、すべてのへい死魚の検査の結果、RSIVが検出されたが、細菌及び寄生虫は観察されなかった。

2) 攻撃試験2

各試験区の生残率は、試験区1が95%と最も高く、ア

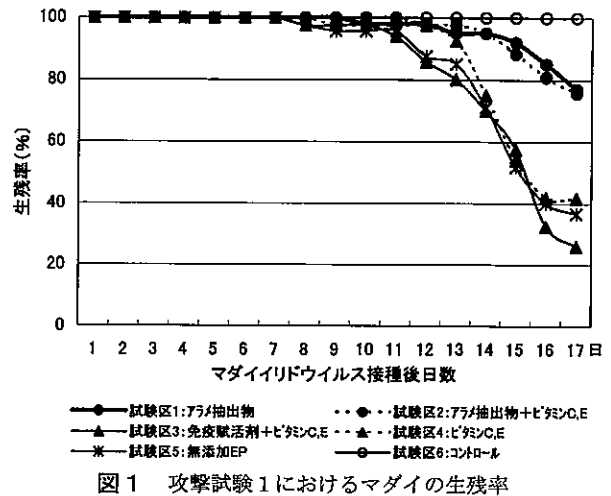


図1 攻撃試験1におけるマダイの生残率

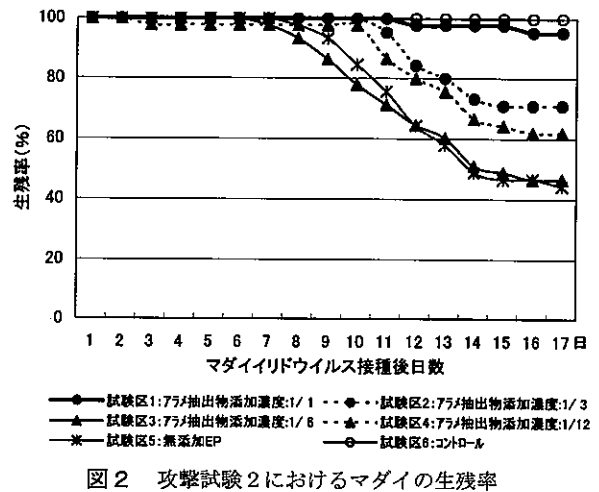


図2 攻撃試験2におけるマダイの生残率

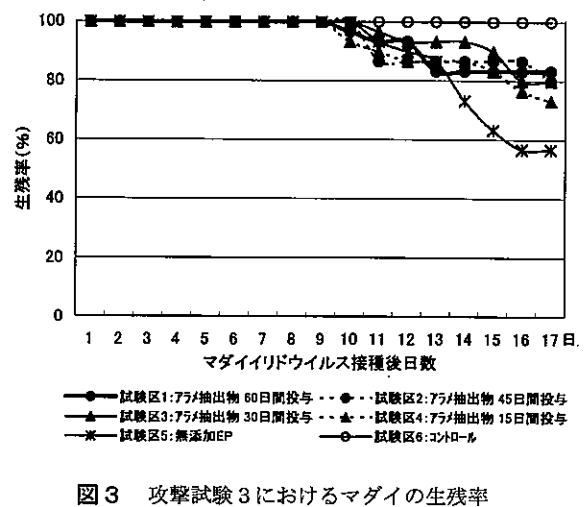


図3 攻撃試験3におけるマダイの生残率

ラメ抽出物の添加濃度が低くなるほど生残率が低くなる傾向がみられた。各試験区を対照区と比較した結果、試験区1で有意（P<0.05）であった。すべてのへい死魚の検査の結果、RSIVが検出されたが、細菌及び寄生虫は観察されなかった。

表1 RSIV接種後のマダイ脾臓からのRSIVの検出結果

接種後日数	結果 (陽性数/検体数)
1	0/2
3	0/2
5	2/2
7	2/2
9	2/2
11	0/2
13	0/2
15	0/2
17	0/2

3) 攻撃試験3

各試験区の生残率は、試験区1が83%と最も高く、アラメ抽出物を添加したEPの投与期間が短いほど生残率が低くなる傾向がみられたが、試験区1, 2, 3の生残率は80~83%で大きな差はみられなかった。各試験区を対照区と比較した結果、試験区1で有意 ($P < 0.05$) であった。すべてのへい死魚の検査の結果、RSIVが検出されたが、細菌及び寄生虫は観察されなかった。

4) 攻撃試験4

RSIVは接種後5日目に初めて検出され、9日目まで検出されたが、11日目以降は検出されなかった。

野 外 試 験

試験区別の生残率を図4に、マダイの成長(体重)を図5に示した。

へい死は、8月中旬までに両試験区とも1尾みられた。その後、8月31日から両試験区で毎日へい死がみられたため、9月3日に瀕死魚を各試験区2尾ずつサンプリングし、腎臓スタンプ標本を用いてIF法によるRSIV検査およびGM染色を行った。その結果、すべてにおいてRSIVおよび肥大細胞が確認され、9月15日から25日にかけて一斉に餌止めを行った。両試験区のへい死は、その後9月中旬をピークに9月27日まで続いた。

9月末日における生残率は、対照区が83%であったのに対し、アラメのエタノール抽出物添加区は98%であった。対照区と比較した結果、有意 ($P < 0.05$) であった。また、試験終了時のマダイ体重は、対照区と比べて差はみられず、アラメ抽出物によるマダイ成長への影響はみられなかった。

マダイイリドウイルス病の予防に対しては、ビタミンEやビタミンCの投与効果が報告されている。今回の室内試験でもビタミンC・E添加区の生残率は対照区に比べ高かったものの、その有意性は認められなかった。一

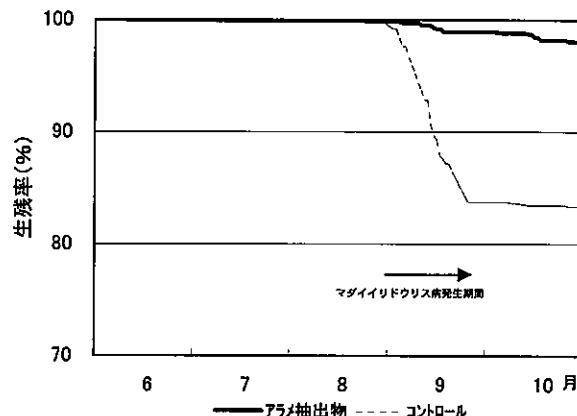


図4 野外試験におけるマダイの生残率

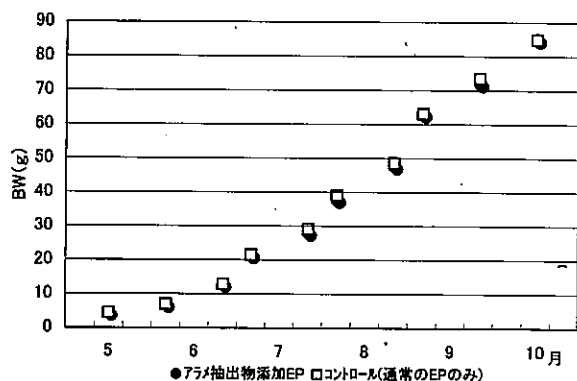


図5 野外試験におけるマダイの成長

方、アラメ抽出物添加区の生残率は、対照区に比べ高く、有意であった。

アラメ抽出物のRSIVに対する抗ウイルス活性については、TCID₅₀法による試験で、本物質50 μg/mlの1時間の処理で10^{5.05}TCID₅₀/mlのRSIVを10_{4.05}TCID₅₀/mlまで失活させることができると報告されており⁴⁾、アラメ抽出物がin vitroにおいてRSIVに対して抗ウイルス活性を有することが確認されている。本研究における攻撃試験においても生残率に有意な差が認められ、抗ウイルス作用が確認された。

また、アラメ抽出物を添加したEPを一定期間投与して飼育したマダイにRSIVを接種しても、RSIV感染後11日目以降は、RSIVが検出されなかった。

アラメ抽出物が持つ抗ウイルス活性のサケ科魚の伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)に対する作用機序は、直接ウイルス粒子を阻害することが報告されている。⁴⁾ 今回の試験では、一旦感染したウイルスが消滅することは確認できたが、アラメ抽出物の作用機序については究明していない。

現在、西日本各地の魚類養殖場では、マダイイリドウ

イルス病が多発し、大きな漁業被害を与えている。本研究において、アラメのエタノール抽出物を餌に添加してマダイへ投与することにより、マダイイリドウイルス病を予防できることが示唆された。本物質はアラメからの抽出が容易で、EP等に予め添加できることから、養殖現場においても低コストかつ簡便に本疾病の予防を行うことができるものと考えられた。

文 献

- 1) 福田穰・佐藤公一 1994:イリドウイルス病緊急 対策に関する研究. 大分県水産試験場事業報告書. 平成5年度. 70-73.
- 2) Kazuhiro Nakajima, Yukio Maeno, Jun Kurita and Yasuo Inui 1997: Vaccination Against Red Sea Bream Iridoviral Disease in Red Sea Bream. *Fish Pathology*, 32(4), 205-209
- 3) 亀井勇統・野呂忠秀・山口佳子 1995: 海藻類の抗ウイルス活性の検索-1. 海と台地, 2, 49-56
- 4) 青木資子 1999: 日本沿岸海藻由来の抗ウイルス物質の検索と解明に関する研究. 佐賀大学大学院農学研究科生物資源利用化学講座 マリンバイオ分野 修士論文