

ヒラメのアクアレオウイルス感染症 防除対策マニュアル

Ver 1.

水産研究・教育機構

増養殖研究所 魚病診断・研修センター

増養殖研究所 魚病研究センター

東北区水産研究所 沿岸漁業資源研究センター

【まえがき】

本マニュアルは、ヒラメのアクアレオウイルス感染症の防除を目的として、論文等で未発表の情報も含めて可能な限り最新の情報を紹介した。また、研究成果に応じて内容を随時改訂していく予定である。可能な限り作業手順を記しているので、必要な部分を抽出して本症の防除対策に役立てて欲しい。

【目次】

1	ヒラメのアクアレオウイルス感染症について	3
2	遺伝子検査による病魚の診断	5
2.1	検体のサンプリング	5
2.2	検体からの RNA 抽出法	6
2.3	RT-PCR 法	8
2.4	リアルタイム RT-PCR 法	10
3	垂直感染対策	13
3.1	腸管ぬぐい液検査による親魚選別	13
3.1.1	腸管ぬぐい液採取および RNA 抽出方法	14
3.1.2	腸管ぬぐい液採取時の作業工程	17
3.1.3	腸管ぬぐい液検体の遺伝子検査法	18
3.2	電解海水殺菌装置によるヒラメ卵消毒法	19
3.2.1	卵消毒のための事前準備	20
3.2.2	卵消毒の手順	23
4	水平感染対策	26
4.1	ウイルス不活化条件	26
4.2	水平感染防止の留意点	28
5	問い合わせ先	29

1 ヒラメのアクアレオウイルス感染症について

【原因ウイルス】

レオウイルス科アクアレオウイルス属の新規ウイルス (Hirame Aquareovirus: HReV-1; 仮称) で二本鎖 RNA をゲノムとして持つ。直径が約 80 nm で、エンベロープを持たないため不活化しにくいウイルスだと考えられる (図 1-1)。

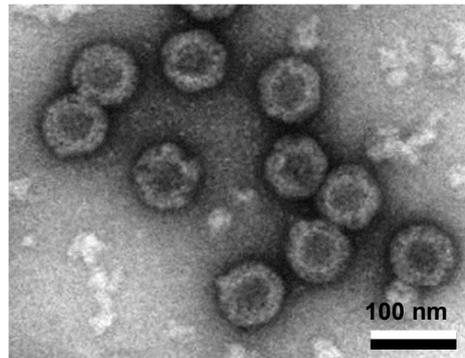


図 1-1 ヒラメアクアレオウイルスの電子顕微鏡写真

【症状】

摂餌不良および斃死の増加で異常に気が付くことが多い。病魚では体色の黒化、腸管の白濁、あるいは脾臓の発赤が観察されることもあるが (図 1-2)、必ずしもアクアレオウイルス感染症だけに見られる症状ではない。同様の症状でアクアビルナウイルス感染症だと診断された場合もあり、確認には後述の遺伝子検査 (RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR) や、病理組織検査が必要である。主に日齢 20~50 の稚魚で発生し、発症群は 1~2 週間かけて 100% 近い死亡率に達する。これらの日齢で発生した場合に回復の見込みはなく、可能な限り早急に飼育群を処分することが推奨される。日齢 50 以上の魚での感染例では死亡率は低く、滑走細菌などと混合感染を起こしていた事例もある。

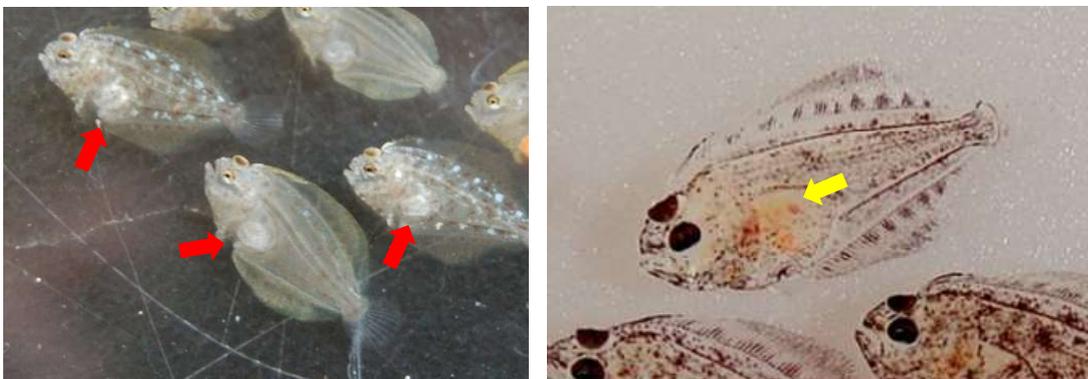


図 1-2 アクアレオウイルス罹病魚の写真

写真左 (赤色矢印) は腸管の白濁、写真右 (黄色矢印) は脾臓の発赤を示す。

【病理】

ウイルスの感染部位は肝臓および腸管内腔の上皮細胞である。ウイルス感染細胞は、複数の細胞が融合した合胞体として観察されることが多い（図 1-3A）。腸管上皮におけるウイルス感染細胞は、そのまま組織から脱落して水中に排泄されていることが示唆されており（図 1-3B）、水中に拡散されたウイルスにより水平感染的に疾病が拡大していくと考えられる。

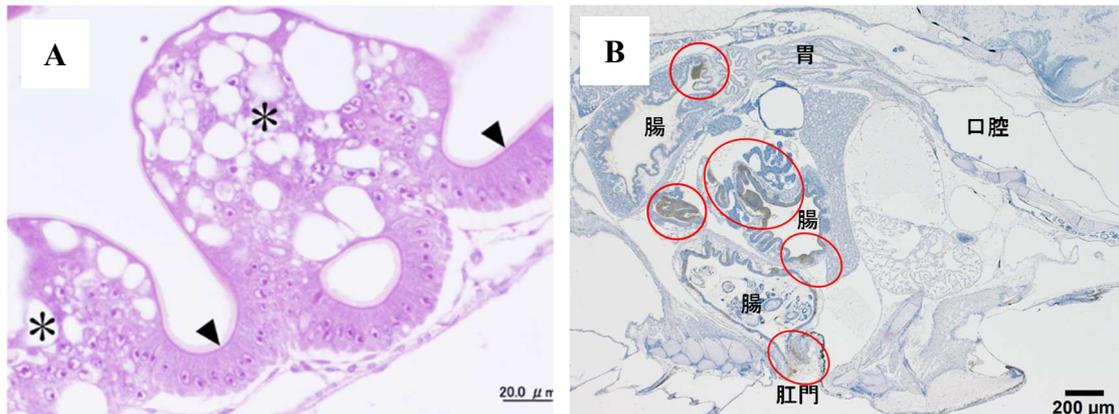


図 1-3 病魚腸管のヘマトキシリン・エオジン染色 (A) および抗 HReV-1 ウサギ抗血清を用いた免疫染色 (B)

(A) 上皮細胞が融合した合胞体と呼ばれる構造が確認される（アスタリスク）。矢尻は正常な腸管上皮の細胞を示す。(B) ウイルス感染部位（赤丸で示した褐色部位）は、腸管上皮で主に観察される。肛門からのウイルス感染細胞の排出も確認される。

【推定される感染経路】

アクアレオウイルス感染症が発症した複数の種苗生産事例において、使用した親魚（人工魚および天然魚）からは、罹病した種苗と同じ塩基配列を持つウイルスが検出されている。それゆえ、本疾病の主な感染源はアクアレオウイルスに感染しているものの症状の出ていない親魚であり、健康に見える親魚から垂直感染あるいは水平感染によりウイルスが種苗に伝播していくと推定されている。

【診断法】

アクアレオウイルス感染症を診断する場合、ウイルス由来の核酸（RNA）を、本ウイルス特異プライマーを用いた RT-PCR 法あるいはリアルタイム RT-PCR 法により検出する遺伝子検査が迅速診断法として最も優れている。他にも、ヒラメ胚由来細胞である HINAE 細胞を用いればウイルス分離が可能であるが、20℃で1ヶ月間以上培養する必要がある。また、ヒラメ血清中の抗ウイルス抗体を検出する ELISA 法により、感染履歴を調べることも可能であるが、ウイルス検出に関しては、簡便性・迅速性・再現性の観点からは、遺伝子検査を推奨している。

2 遺伝子検査による病魚の診断

本章では、主に種苗期に大量斃死した個体からアクアレオウイルスを検出する方法を紹介する。RNA 抽出法および遺伝子検査法（RT-PCR 法およびリアルタイム RT-PCR 法）は、後述の「3.1 腸管ぬぐい液検査による親魚選別」にも応用可能な手技である。

2.1 検体のサンプリング

<サンプリング>

仔稚魚：衰弱魚または瀕死魚 20-50 個体程度を採取する。死後半日以上経過した斃死魚のサンプリングは推奨しない。魚は個別別に 3 尾以上、あるいは組織の総重量が 50mg を超えないように 3-5 尾プールしたものを 1 検体として、3 検体以上を検査に供試する。アクアレオウイルス感染症で死亡した稚魚は大量にウイルスを保有しているため、サンプリングした病魚を介した二次的な施設の汚染や実験室でのコンタミネーションにも留意する。

成魚：個別別に肝臓あるいは腸を採取する。本検査ではサンプルを殺す必要があるため、種苗生産用の親魚検査には利用できない。

<サンプルの輸送>

半日以内に検査が開始できる場合は冷蔵で、それ以上の時間がかかる場合は冷凍でサンプルの輸送を行う。

<サンプルの保存>

検査に使用しなかったサンプルは結果が判明するまでロット別に冷凍保存する。 -80°C での保存が望ましいが -20°C でも可。

<サンプルの廃棄>

オートクレーブ処理後廃棄する。外部に流出しないように留意した上で焼却処分も可。

2.2 検体からの RNA 抽出法

<試薬>

- TRIZOL^(R) Reagent (ThermoFisher) *同等品でも可
- クロロホルム (特級)
- 2-プロパノール (イソプロピルアルコール) (特級)
- dDW (DNase/RNase free)
- 75%エタノール (特級を dDW で希釈)

***1 検体当たりに必要な各試薬の液量**

試薬名	× 1 (mL)
TORIZOL ^(R) Reagent	1.0
クロロホルム	0.2
2-プロパノール	0.4
75%エタノール	1.0
dDW (DNase/RNase free)	0.1

<消耗品>

- バイオマッシャー II (ニッピ)
*滅菌攪拌棒 (ホモジナイザー) と 1.5 mL チューブで代用可能
- 1.5m L チューブ
- マイクロピペット用チップ

<実験器具>

- 解剖器具 (解剖バサミ、ピンセット)
- マイクロピペット (P-1000、P-200)
- チューブラック
- 冷却高速遠心機
- ボルテックス
- ヒートブロック

<方法>

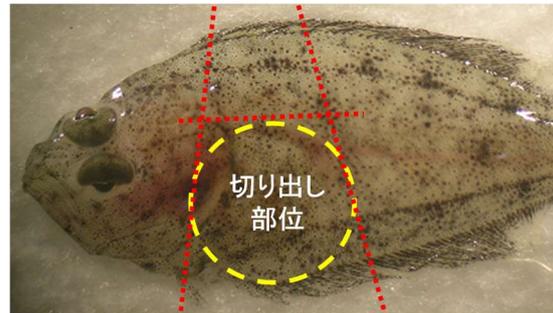
*全ての工程は手袋を着用して実施する。

*試薬やサンプル等が入ったチューブの蓋を開ける前には、小型卓上遠心機で必ずスピンドアウンを行う。

- 1) バイオマッシャー II チューブに検体を入れ、TRIZOL300 μ L を加えて、付属の攪拌棒で

ホモジナイズする。さらに TRIZOL700 μL を加え、ボルテックスで 10 秒程度攪拌する。

*採材部位は肝臓あるいは腸、魚体が小さい場合は腹部(右写真)や魚全体を用いる。成魚の腸では肛門から 5 cm 程度の部位を検査に用いる。



*組織の総重量が 50 mg 以下となるように注意する。組織量が多すぎると偽陰性となる場合がある。組織重量が上記の量を超えなければ、サンプルをプールしても構わない

2) 5 分程度室温で静置する。

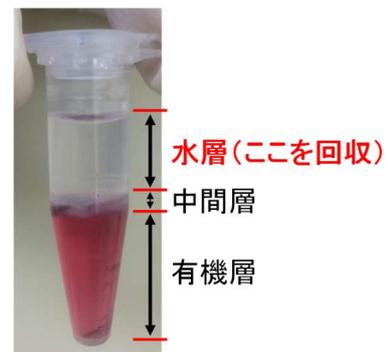
3) クロロホルム 200 μL を添加し、ボルテックスで 10 秒程度攪拌する。

4) 3 分程度室温で静置する。

5) 遠心分離 (12,000g、15 分、4°C) する。

6) 別の 1.5 mL チューブに 2-プロパノール 400 μL を分注し、サンプル名を記載しておく。

7) 遠心分離後に溶液が水層 (透明、RNA 含む)、中間層 (白色の塊、DNA とタンパク質含む)、有機層 (ピンク色、DNA とタンパク質を含む) に分離することを確認し、2-プロパノールを加えておいた 1.5mL チューブに水層 400 μL を移す。



*中間層や有機層を回収しないように注意する。

8) ボルテックスで 10 秒程度攪拌し、室温で 5-10 分間静置する。

9) 遠心分離 (12,000 $\times\text{g}$ 、10 分、4°C) して RNA を沈殿させる。RNA は白色のペレット状に沈殿する (RNA 量が少ない場合、ペレットが見えないこともある。)

10) マイクロピペットで上清を捨て、75%エタノールを 1 mL 加えてペレットを洗浄する。

11) 遠心分離 (12,000 $\times\text{g}$ 、5 分、4°C) する。

12) マイクロピペット (P-1000) で上清を捨て、スピンドウン後、集まった上清をさらにマイクロピペット (P-200) で取り除く。ペレットを捨ててしまわないように注意。

13) 10 分程度風乾させる。ペレットは完全に乾燥させない。

14) 100 μL の ddW (DNase/RNase free) 添加し、ペレットを完全に溶解させる。

15) 65°C に設定したヒートブロックにチューブを入れ 5~10 分間インキュベートする。

*60~65°C のお湯でも可。この操作でペレットが完全に溶解することに加え、ウイルスの二本鎖 RNA が解離して逆転写反応が起こりやすくなる。

16) 抽出 RNA は RT-PCR を当日に行う場合は冷蔵、後日行う場合は -80°C で保存する。

2.3 RT-PCR 法

<試薬類>

- SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (インビトロジェン)
- dDW (PCR 用)
- HReV-1 検出用プライマーセット

種類	プライマー名	配列情報 (5' -3')
上流プライマー	HReV-1 F3	CGAGGACCGTCGTAAACATT
下流プライマー	HReV-1 R2	GTCGATGTTGGGAAGACGAAAC

*dDW を用いて濃度を 10 pmol/μL (10 μM) に調整し、小分けして-20°Cで保存する。

1 検体当たりの試薬組成

試薬	(1 検体分)
2×Reaction Mix (キット付属)	12.5 μL
dDW	7 μL
F3 primer (10 pmol/μL) 終濃度 0.5 μM	1.25 μL
R2 primer (10 pmol/μL) 終濃度 0.5 μM	1.25 μL
RT Platinum Taq Mix (キット付属)	1 μL
抽出 RNA テンプレート	2 μL
合計	25 μL

<消耗品>

- 1.5 mL チューブ
- PCR チューブ
- マイクロピペット用チップ

<実験器具>

- マイクロピペット (P-200、P-20、P-10、P-2)
- サーマルサイクラー
- チューブラック
- 氷

<方法>

- 1) 2×Reaction Mix (キット) およびプライマーを解凍し、氷上で作業する。
- 2) PCR チューブにサンプル番号、陽性対照 (P)、陰性対照 (N) を記入し、氷上に立てておく。
- 3) 1.5 mL チューブで検体数+2 (陽性・陰性対照) の RT-PCR 反応液を調整する。

- 4) RT-PCR 反応液を 23 μL ずつ、準備しておいた PCR チューブに分注する。
- 5) 抽出 RNA を 2 μL 、PCR チューブ内の RT-PCR 反応液に加える。
*陽性対照（診断センターから分与可能）は最後に添加する。
*陰性対照には何も入れない（RT-PCR 反応液の分注後に蓋を閉めておく）。
- 6) チューブの蓋をしっかりと閉め、スピンドウンする。
- 7) 以下の温度プログラムをセットしたサーマルサイクラーで RT-PCR 反応を行う。

ステップ	温度	時間	サイクル数
1	55°C	30 分	1 サイクル
	95°C	2 分	
2	94°C	15 秒	35 サイクル
	55°C	30 秒	
	68°C	30 秒	
3	68°C	2 分	1 サイクル

- 8) RT-PCR 反応が終了したら PCR チューブを取り出し、電気泳動を行う。方法はコイ春ウイルス血症の診断マニュアルの「魚類組織をテンプレートとした RT-PCR 法による診断」に記載された方法に準じる。

*http://nria.fra.affrc.go.jp/sindan/kenkyu/pdf/svc_rt-pcr_soshiki.pdf

- 9) 陽性対照で 304 bp のバンドが確認され（PCR 反応が正しく動いている）、陰性対照にバンドが無い（試薬にコンタミが無い）場合に、陽性対照と同じ位置にバンドがみられる検体は陽性、見られない検体は陰性と判定する（下図）。

*増幅産物の分子量サイズを陽性対照と比較する際には、バンドの上端部分を見る。（泳動後にゲルの染色をする場合は、バンドの下端部分でサイズを見る。）

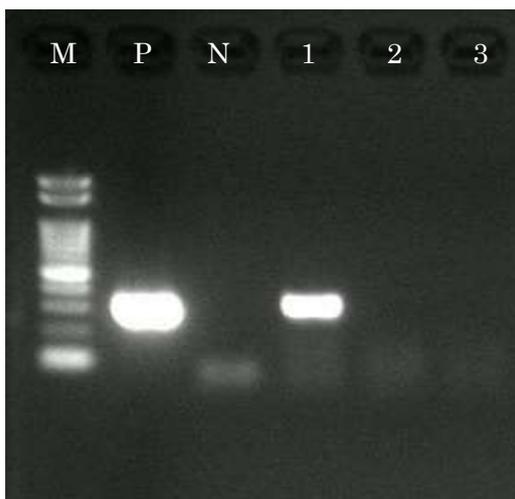


図 2-1 HReV-1 検出 RT-PCR の電気泳動像

M：分子量マーカー（100 bp ラダー）、P：陽性対照、N：陰性対照、#1～#3：検体。

この泳動像の場合、検体番号 1 のみがアクアレオウイルス陽性だと判定される。

2.4 リアルタイム RT-PCR 法

<原理・特徴>

リアルタイム RT-PCR では、PCR 増幅産物が増えると蛍光シグナルを発するようにプローブや試薬が設計されており、その蛍光シグナルを PCR サイクルごとにリアルタイムで機械が測定する手法である。増幅産物が増えているかどうかは蛍光シグナルとして機械が読み取るため、電気泳動の必要がない。また、段階希釈した濃度のわかっている陽性対照（定量標準）を同時に反応させることで、結果を定量解析することができる。

<試薬類>

- LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes（ロシュ、Cat.No. 04991885001）
あるいは、One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit（Perfect Real Time）（タカラ、RR064A）

- HReV-1 リアルタイム PCR 用プライマー・プローブセット

プライマー種類	プライマー名	配列情報（5' -3'）
上流プライマー	HReV-1 F3	CGAGGACCGTCGTAAACATT
下流プライマー	HReV-1 R8	TAAATGGCCGTGTAGGATCAC
蛍光標識プローブ	HReV-1 rP1	FAM -TCCATGGTTCCTCTCATTGA- BHQ1

*HReV-1 F3 プライマーは RT-PCR と共通。

*dDW を用いて濃度を 10 pmol/μL（10 μM）に調整し、小分けして-20℃で保存する。

1 検体当たりの試薬組成

*LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes（ロシュ）の場合

試薬	（1 検体分）
2.7×Reaction Mix（キット）	7.4 μL
dDW（滅菌超純水）	6.4 μL
F3 primer（10 pmol/μL）終濃度 0.5 μM	1 μL
R8 primer（10 pmol/μL）終濃度 0.5 μM	1 μL
rP1 プローブ（10 pmol/μL）終濃度 0.1 μM	0.2 μL
Mn(OAc)2 Stock Solution（キット）	1 μL
Enhancer solution（キット）	1 μL
抽出 RNA テンプレート	2 μL
合計	20 μL

*One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (タカラ) の場合

試薬	(1 検体分)
2×Reaction Mix (キット)	10 μ L
dDW (滅菌超純水)	5 μ L
F3 primer (10 pmol/ μ L)	1 μ L
R8 primer (10 pmol/ μ L)	1 μ L
rP1 プローブ (10 pmol/ μ L)	0.2 μ L
TaKaRa Ex Taq HS (キット)	0.4 μ L
PrimeScript RT enzyme (キット)	0.4 μ L
抽出 RNA テンプレート	2 μ L
合計	20 μ L

<消耗品>

- 1.5 mL チューブ
- リアルタイム PCR 用チューブ
- マイクロピペット用チップ

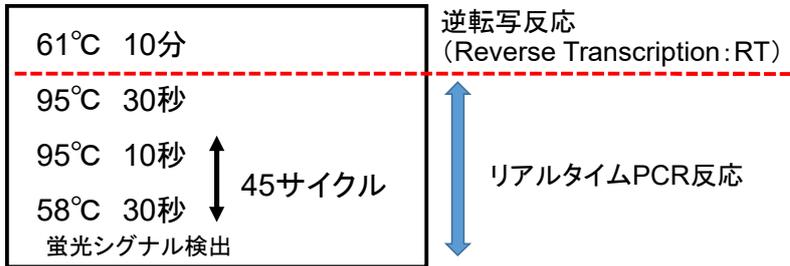
<実験器具>

- マイクロピペット (P-200、P-20、P-10、P-2)
- リアルタイム PCR 装置
- チューブラック
- 氷

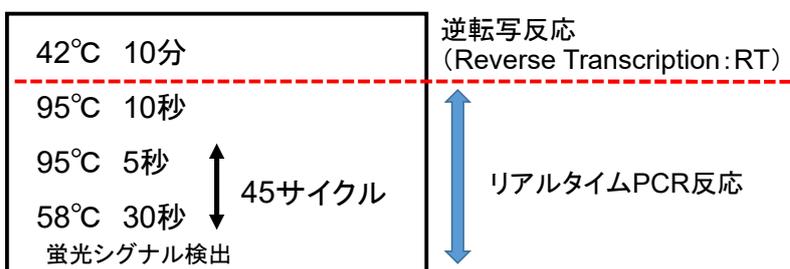
<方法>

- 1) キット付属の試薬およびプライマーを解凍して氷冷する。
- 2) リアルタイム PCR 用のチューブを氷冷しておく。
- 3) 1.5 mL チューブに検体数+ α (陽性対照あるいは定量標準、陰性対照) のリアルタイム PCR 反応液を調整する。
- 4) リアルタイム PCR 反応液を 18 μ L ずつ、リアルタイム PCR 用チューブに分注する。
- 5) 抽出 RNA を 2 μ L、PCR チューブ内のリアルタイム PCR 反応液に加える。
 - *陽性対照あるいは定量標準 (診断センターから分与可能) は最後に添加する。
 - *蛍光シグナルは上部から読み取るため、チューブの蓋には何も書かない。
- 6) チューブの蓋をしっかりと閉め、スピンドウンする。
- 7) 以下の温度条件を入力したリアルタイム PCR 装置で反応および蛍光シグナルの検出を行う。

*LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes (ロシュ) の温度条件



*One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (タカラ) の温度条件



- 8) 反応終了後にデータをリアルタイム PCR 装置から取り出し、結果の解析を行う。
- 9) 陽性対照あるいは定量標準と同様の蛍光シグナル (曲線) が確認できれば陽性と判定できる。下図のように定量標準がある場合、#1 はおよそ 10^6 コピー、#2 はおよそ 10^3 コピーのウイルス量だったと定量できる。また、定量標準が無い場合でも、#2 より #1 の方が、ウイルスゲノム数が多かったと推定できる。

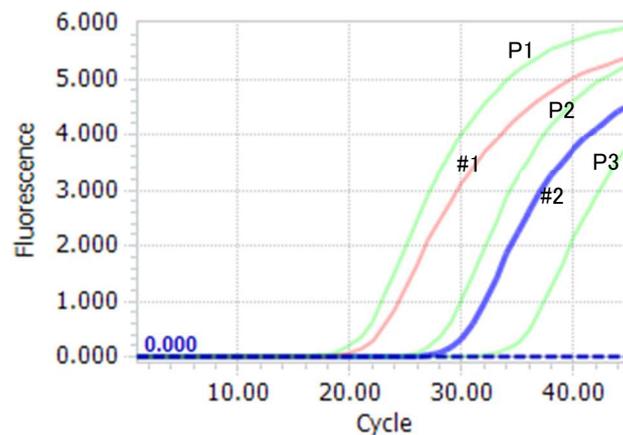


図 2-2 HReV-1 検出リアルタイム RT-PCR の結果

P1 : 定量標準 10^6 コピー、P2 : 定量標準 10^6 コピー、P3 : 定量標準 10^6 コピー、
 #1 (赤色曲線) : 検体番号 1、#2 (青色曲線) : 検体番号 2

3 垂直感染対策

ヒラメのアクアレオウイルス感染症では、ウイルス感染したヒラメ親魚が主な感染源となっている。本章では、垂直感染対策として「3.1 腸管ぬぐい液検査による親魚選別」と「3.2 卵消毒法」を紹介する。両方法を組み合わせた対策をとることで、種苗におけるアクアレオウイルス感染症を防除できることが生産規模の実証試験でも確認されている。

3.1 腸管ぬぐい液検査による親魚選別

本方法は、ヒラメのアクアレオウイルスが腸管の上皮細胞に感染することに注目し、腸管上皮のぬぐい液を特殊な綿棒を用いて採取して、そこに含まれるウイルスを検出する手法である（図 3.1-1）。腸管ぬぐい液を採取した後は、基本的に前述の遺伝子診断法により検査を実施して、ウイルスが検出された個体を処分あるいは種苗生産に使わないようにする。ただし、本方法で全てのウイルス感染個体を検出できるわけではない。あくまで大量にウイルスを排出している高リスク個体を排除するための方法だという認識が必要であり、後述の卵消毒法と組み合わせなければ、期待した防除効果が得られないことに留意されたい。東北区水産研究所および岩手県栽培漁業協会では、成熟促進ために加温を始める前の12月に検査を実施して選別し、2月より加温を開始し、4月から例年と遜色ない産卵を確認している。加温開始後のハンドリングは、採卵に影響を与えるリスクが高く、その期間の検査は避けるべきである。そのため、採卵に最も近い時期で、加温期間を避けるとすると、加温前に一般的に実施されている選別時に実施することが望ましい。また、本検査法は完全なウイルスフリーを可能とする方法ではなく、餌料や海水等からウイルスが侵入するリスクがあるため、一度検査して陰性となったからその後も陰性が続くわけではなく、毎年生産前に検査を実施する必要がある。

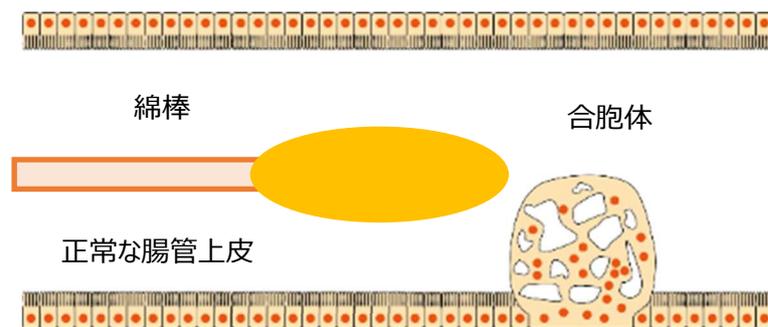


図 3.1-1 腸管ぬぐい液検査のイメージ図

腸管ぬぐい液検査では、腸管上皮細胞や粘液をサンプルとして採取する。もし、アクアレオウイルスに感染していれば、ウイルスを含有する合胞体を形成した上皮細胞がサンプルに含まれると考えられる。

3.1 腸管ぬぐい液検査による親魚選別

3.1.1 腸管ぬぐい液採取および RNA 抽出方法

3.1.1 腸管ぬぐい液採取および RNA 抽出方法

ヒラメ親魚の腸管ぬぐい液検査では、ヒトの臨床検査において鼻腔や咽頭などの粘膜上皮のぬぐい液を採取する専用綿棒（FLOQ Swab[®]、Becton Dickinson (BD) 社製）の使用を推奨している（図 3.1-2）。本手法は、糞便ではなく腸管上皮細胞の採取が目的のため、検査前には餌止めすることも重要である。また、PCR 阻害物質の影響を考慮して、サンプルのとりすぎには注意する。

< 試薬・消耗品 >

- 専用綿棒 FLOQ Swab[®] (Becton Dickinson、534CS01-E、50 本入り)
- 1 mL 用ピペットチップ
- 1.5 mL あるいは 2 mL マイクロチューブ
- キムワイプ
- キムタオル

< 実験器具 >

- チューブ立て
- 滅菌したハサミ
- バット
- 氷
- 小さい発泡スチロールの箱
- 油性黒マジック
- カップ、胴長
- 300L 水槽 x2 (麻酔の前後の作業用)
- 麻酔
- 麻酔用の 30L 水槽
- 魚を保護するためのタオル

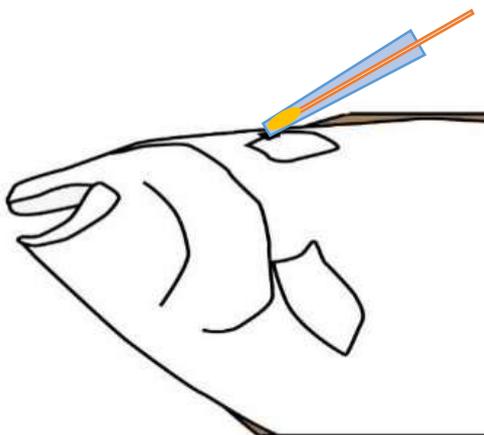


図 3.1-2 ヒラメ親魚からの腸管ぬぐい液採取の模式図（左）および専用綿棒（右）

3.1 腸管ぬぐい液検査による親魚選別

3.1.1 腸管ぬぐい液採取および RNA 抽出方法

<方法>

*腸管ぬぐい液採取の様子を写真に示した。

1) ヒラメ活魚に麻酔をかけ、タオルをひいた作業台にのせる。

2) 先を少し切った 1 mL 用のピペットマンチップに FLOQ Swab[®]を通して、総排泄孔に挿入する (右写真 1)。

*1 mL 用のピペットチップは、腸管上皮以外の細胞の採取を避けるためのガードとしての役割と、専用綿棒を挿入しやすくするための目的で使用する。

3) ピペットマンチップを柄の方から抜いた後、FLOQ Swab[®]を頭側に進めながらゆっくり 5 cm 程挿入し、腸管壁を数回こすって腸管ぬぐい液を採取する (右写真 2)。

*腸管穿孔に注意する。

*腸管ぬぐい液採取後は綿棒が茶色になる (図 3.1-2)。

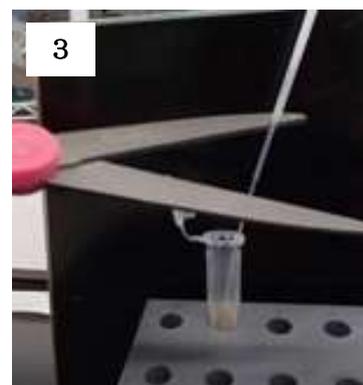


4) 採取したぬぐい液は、綿棒ごと 1.5 あるいは 2 mL マイクロチューブに入れて柄の部分をハサミで切断し、 -80°C で保存する (右写真 3)。連続でサンプリングを行う際は、 -80°C に入れるまでは氷上で保存する。

5) RNA 抽出をする際は、FLOQ Swab[®]の入ったマイクロチューブに 1 mL の TRIZOL[®] Reagent を加えてボルテックスし、FLOQ Swab[®] ごと溶かす (図 3.1-3)。

6) 溶解液をスピンドウンして、新しいチューブに移し換える。

*以降の作業は、「2.2 検体からの RNA 抽出」の「4) クロロホルム 200 μL を添加し〜」、から続ける。



3.1 腸管ぬぐい液検査による親魚選別

3.1.1 腸管ぬぐい液採取および RNA 抽出方法



図 3.1-2 腸管ぬぐい液採取前後の綿棒



図 3.1-3 TRIZOL 添加直後 (左)、ボルテックス (中央)、および溶解後 (右)

3.1.2 腸管ぬぐい液採取時の作業工程

ヒラメから腸管ぬぐい液を採取する際に必要な作業工程を示した。検査尾数や人員数に応じて下記工程を振り分けると作業がスムーズに進む。

【作業工程】

*カッコ内は人員の振り分け例

- 水槽からヒラメを取り上げる人 (2)
- 麻酔をかけて運ぶ人 (1)
- 体重・体長を測定する人 (1)
- Pit Tag を読む人 (1)
- 体長・体重・Pit Tag を記録する人 (1)
- 腸管ぬぐい液を採取する人 (2)
- 水槽にヒラメを戻す人 (1)
- 綿棒をチューブに入れカットする人 (1)



腸管ぬぐい液採取の様子

3.1.3 腸管ぬぐい液検体の遺伝子検査法

(1) リアルタイム RT-PCR 法

前章「2.4 リアルタイム RT-PCR 法」と同じ。検出感度および迅速性の点から最も推奨される方法である。

(2) RT-PCR 法

前章「2.3 RT-PCR 法」から反応温度条件を以下のように変更する。条件検討の結果、以下の反応温度条件では検出感度がリアルタイム RT-PCR 法と同等であることを確認している。

ステップ	温度	時間	サイクル数
1	55℃	30 分	1 サイクル
	95℃	2 分	
2	94℃	15 秒	40 サイクル
	55℃	30 秒	
	68℃	30 秒	
3	68℃	2 分	1 サイクル

*検出感度を上げるために、ステップの2のサイクル数を35から40に変更している。

(3) nested-PCR 法

様々な条件で nested-PCR 法を検討したが、検出感度が前述のリアルタイム RT-PCR 法や RT-PCR 法とほとんど差がなかった。リアルタイム RT-PCR 法による親魚選別と卵消毒法の組み合わせで実際の生産レベルでも本感染症の発生が抑えられていること、温度条件の検討で RT-PCR 法の検出感度がリアルタイム RT-PCR 法と同等になったこと、およびコンタミネーションの危険性を減らす観点からも、本検査での nested-PCR 法の必要性はないと考えられる。

3.2 電解海水殺菌装置によるヒラメ卵消毒法

3.2.1 卵消毒のための事前準備

3.2 電解海水殺菌装置によるヒラメ卵消毒法

腸管ぬぐい液検査による親魚選別では完全にウイルス感染個体を除くことはできないため、アクアレオウイルス感染症を防除するためには、本章で示した電解海水による卵消毒と組み合わせることが望ましい。**本手法の概要は、ヒラメのふ化に異常が出ない桑実胚期—胚胞期の受精卵を、残留オキシダント濃度 0.75 mg/L (0.75 ppm) の電解海水で 5 分間洗浄するというものである。**この条件は、桑実胚期の受精卵に対してふ化に影響を与えない最も高い残留オキシダント濃度かつ最も長い消毒時間である。しかしながら、卵に付着する有機物などにより残留オキシダント濃度が大きく減衰するため、有効濃度で卵消毒を実施するためには本章で紹介する事前準備が重要である。なお、アクアレオウイルス感染親魚からの受精卵には、残留オキシダント 0.5 mg/L (0.5 ppm) の 1 分間または 2 分間の卵消毒による感染防除効果が飼育試験で認められている。上記に示した条件は、それより高濃度の電解処理水で長い浸漬時間で洗浄することから、より高い防除効果が期待される。

電解海水を用いた消毒は、海水を電気分解処理した際に生じる次亜塩素酸や次亜塩素酸が海水と反応して生じる残留オキシダントによる強い消毒効果を利用した方法である。これらのオキシダントは強力な殺菌力を持つ一方、使用濃度や消毒時間によってふ化率の低下などの悪影響が生じることが多くの魚種で報告されている。また、卵の発生ステージによってもその影響は異なる。本章では、最も高い残留オキシダント濃度かつ最も長い消毒時間で、ヒラメ卵のふ化に影響を与えない条件を紹介しているが、事前に各生産現場で予備試験をしていただきたい。

ヒラメ卵は水温 16–20℃の場合受精後 50 時間程度でふ化を開始する。我々の行った試験では、桑実胚期—胚胞期（受精後 24 時間まで；図 3.2-1 左写真）での卵消毒の実施が安全性や有効性が高い。それゆえ、受精卵の授受を行う場合は、受精卵を送る側で採卵当日の受精卵を消毒することが望ましい。採卵翌日の胚体期（図 3.2-1 右写真）での卵消毒では、ふ化率に影響を与える事がある。

本マニュアルでは、種苗生産機関で対象となる 100 万粒程度の卵を電解海水で消毒する具体的な方法を記した。施設ごとに設備に差があるため、本マニュアルに記載されている内容の要点を取り入れて、各施設で最適な卵消毒条件を完成させてほしい。

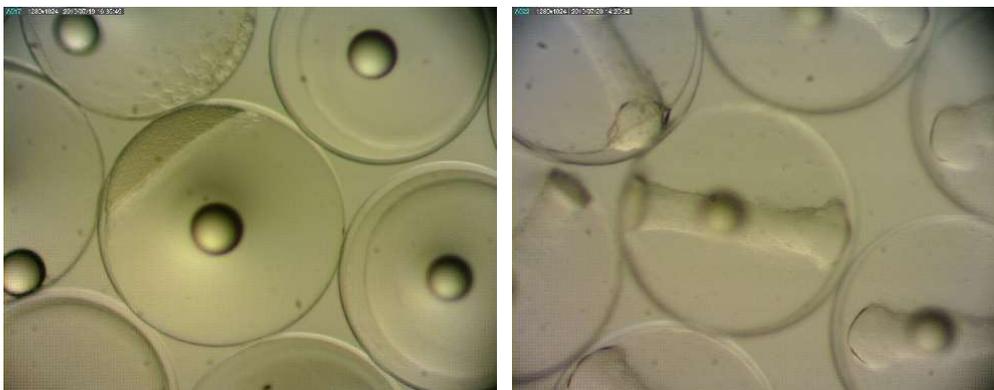


図 3.2-1 採卵当日（胚胞期；左写真）と翌日（胚体期；右写真）の卵

3.2 電解海水殺菌装置によるヒラメ卵消毒法

3.2.1 卵消毒のための事前準備

3.2.1 卵消毒のための事前準備

(1) 電解殺菌装置と卵消毒槽の設置

調温用の貯水槽（15℃に設定）、送水ポンプ、海水電解装置、消毒水槽からなる消毒用システムの設置を推奨する。参考に、東北区水産研究所で実際に使用している装置を図 3.2-2 に示す。本装置はあくまで一例であり、各機関のスペースや作業のやり方にあわせてカスタマイズしても構わない。



図 3.2-2 卵消毒装置の配置例（宮古庁舎）

海水電解装置 HSE-200（株式会社東和電機製作所；図 3.2-3 左写真）に濁水ポンプ（Cat: CSL-100L, 株式会社寺田ポンプ製作所；図 3.2-3 中央写真）を用いて調温水槽からろ過海水を送水することで電解海水を作製する。海水流量と海水電解装置の電圧により消毒に必要な残留オキシダント濃度を設定する（後述）。本ポンプの最大流量は 3.6 kL/h(1000 mL/sec) でバルブにより流量を調節する。このポンプはあくまで一例であり、より大きなポンプを使用して流量を大きくすることも可能である。

消毒槽は、80 L（角型，サンボックス#83, Cat: 208300, 三甲株式会社；図 3.2-3 右写真）の容器を 1 槽または 3 槽を用いて実施している。30 L（円形, Cat: SPS-30, アース株式会社）または 500 L（円形, Cat: SPE-500, 株式会社田中三次郎商店）の容器でもよいが、

3.2 電解海水殺菌装置によるヒラメ卵消毒法

3.2.1 卵消毒のための事前準備

30L の容器は容器が小さすぎて取り回しが悪く、一方、500L の容器は残留オキシダント濃度の回復が遅く、今回使用したポンプに対しては貯水量が大きすぎて換水率が不足する。大量に卵を消毒する場合は、卵に付着する有機物などにより残留オキシダント濃度が大きく減衰するため、消毒に必要な残留オキシダント濃度を維持するためには電解海水の換水率が重要になる。そのため、500L の水槽を消毒槽にする場合は、より出力の大きな送水用のポンプが必要となる。



図 3.2-3 海水電解装置（左）、濁水ポンプ（中央）、および消毒槽（右）

(2) 電解海水の調整

卵消毒を始める前に、実際に卵消毒を実施する流量（東北区水産研究所では 1000 mL/sec）において、どの程度の電圧をかけることで、消毒に必要な 0.75 mg/L の残留オキシダント濃度を維持できるのかを調べる。東北区水産研究所では、遊離塩素試薬 (Cat: 21055-69, HACH) を用いた DPD 法により残留オキシダント濃度を測定している。検量線は Chlorine Standard solution, 50-75 mg/L as Cl₂ 2 mL PourRite Ampules (NIST) (Cat: 1426820, average 67.4 ± 0.34 mg/L, Lot#A8156, HACH) をろ過海水で段階希釈して標準溶液を作製している。

ポータブル塩素計 (Cat: RC-31P, 東亜 TDK) を用いた濃度測定は、電極を消毒槽に浸すだけで残留オキシダントを測定できる (図 3.2-4)。本体が高価であり、正確な値を得るためには定期的に電極の交換が必要であるが、濃度測定が簡易でリアルタイムに濃度を知ることができるのは、非常に強みである。



図 3.2-4 ポータブル塩素計の使用例

3.2 電解海水殺菌装置によるヒラメ卵消毒法

3.2.1 卵消毒のための事前準備

(3) 卵消毒に使用するネット

卵消毒に使用するネットは、外網がテトロンラッセル（田中三次郎商店）で、内網がゴース地（田中三次郎商店）を縫い合わせてステンレス製の枠に固定したものを自作している（図 3.2-5）。網の素材は、ゴース地が最も卵を傷めないと考えられる。網の大きさは、作業性も考えると、100-150 万粒であれば 10 L 程度で良い。10 L 程度であれば、卵を網で移送する際に、ボールで受けて水から卵を上げずに移動することが可能である。



図 3.2-5 宮古庁舎（左）と岩手県栽培漁業協会（右）の消毒網の例

(4) 親魚管理と水槽の設定

親魚は、3.1 章の腸管ぬぐい液検査により、ウイルスを排出するリスクの高い個体を除去した個体群を使用することを強く推奨する。卵の発生ステージにより安全な卵消毒時間が異なることが、ヒラメを含めさまざまな魚種で報告されている。そのため、消毒を行う受精卵の発生状態をそろえる必要がある。

発生状態がそろった受精卵を得るために、飼育水の換水率を 10 回転/日 程度確保する必要がある。ヒラメは分離浮性卵であり、自然産卵したものを採卵することから、基本的には排水パイプに採卵ネットを設置し回収する。そのため、卵の回収率は、排水量に規定され、排水量が多いほど回収率は良くなる。一方で、排水量が不足すると、卵が水槽内にとどまり、複数日にまたがって排出された発生ステージの異なる卵が得られることになる。一般に、ヒラメの種苗生産現場では、前日の夕方から翌朝にかけて産卵した受精卵を午前中に回収し、消毒を施す場合が多い。換水率を調整し、夕刻にセットしたネットに同じ発生ステージの卵が回収できるように調整することを推奨する（図 3.2-6）。



図 3.2-6 採卵ネットの設置例

3.2.2 卵消毒の手順

【資機材】

- 電解殺菌装置と卵消毒槽（前述）
- 実体顕微鏡（ヒラメ卵の計数用）
- 時計皿（ヒラメ卵計数用）
- ピペット（ヒラメ卵計数用）
- UV 殺菌海水
- 30 L ポリカーボネート製の円形水槽（Cat: SPS-30, アース株式会社）
- 100 L アルテミアふ化槽（Cat: SBF-100, アース株式会社）
- サイホン（底掃除用）
- 残留オキシダント濃度測定試薬
- ヒラメ卵のふ化用のアルテミアふ化槽（Cat: SBF-1000, アース株式会社）

【手順】

1. 採卵ネットに集められたヒラメ卵を計量可能な容器に回収する。
2. 容量法によりヒラメ卵を計数し、総卵数、受精率および発生ステージを確認する。
*重量法による計数が多いが、回収した卵の受精率および発生ステージが卵消毒には重要であり、加えて卵へのダメージを考慮すると、容量法を推奨する。卵消毒で失敗した際も、卵を顕鏡していれば、卵の受精率や発生状態などから失敗の原因が推定できる。
3. 浮上卵を分離する（死卵およびゴミの除去）
*採卵時にヒラメ卵と混ざって回収される死卵およびゴミを除去する。ヒラメ卵は分離浮性卵のため浮上し、死卵、未受精卵およびゴミは沈殿する。

<小型の円形水槽を用いた方法>

*図 3.2-7

- ① ヒラメ卵を 30 L ポリカーボネート製の円形水槽（Cat: SPS-30, アース株式会社）に収容し、UV 殺菌海水を加えて 30L にする。
- ② 30 分静置して浮上卵を分離する。
- ③ 下部に沈殿した死卵、未受精卵およびゴミをサイホンにより除去する。水量は最終的に 20 L 程度にする。夾雑物を取り除いた供試卵は、実体顕微鏡下で卵数、受精卵率、発生ステージを再度確認し、容量法を用いて 20 L のろ過海水中に必要量（100-150 万粒）の供試卵が含まれるように調整する。この操作は、後述の 100 L のアルテミアふ化槽を利用することも可能である。



図 3.2-7 沈殿前 (左)、静置 30 分の沈殿後 (中央)、およびゴミ除去後 (右) の

<アルテミアふ化水槽を用いた方法>

* 図 3.2-8

- ① ヒラメ卵をアルテミアふ化水槽 (Cat: SBF-100, アース株式会社) に收容する。
- ② 30 分静置して浮上卵を分離する。
- ③ 下部に沈殿した死卵、未受精卵およびゴミをサイホンにより除去する。
- ④ 夾雑物を取り除いた供試卵は、実体顕微鏡下で卵数、受精卵率、発生ステージを再度確認し、容量法を用いて 20 L のろ過海水中に必要量 (100-150 万粒) の供試卵が含まれるように調整する。この操作は、100 L のアルテミアふ化槽を利用することも可能である。



図 3.2-8 ふ化槽による分離例

4. 電解海水の残留オキシダント濃度を 0.75 mg/L に設定する。
* 浮上卵を分離する待ち時間 (30 分の静置時間) に、残留オキシダント濃度測定試薬を用いて濃度調整を実施する。事前に 0.75 mg/L になる流量および電圧を調べておく と 便利である。
5. ヒラメ卵を計数して卵量を調整する。
* 海水 20 L を入れたバケツに対して桑実胚一胚胞期 (採卵当日) の卵 100-150 万粒 (1 kg 弱) を收容する。卵量が多い場合は複数回に分ける。
6. 電解海水へヒラメ卵を投入し、0.75 mg/L の濃度で 5 分間消毒する。
* 東北区水産研究所の卵消毒は、消毒槽内に設置した、ステンレス製の枠で支持された容量約 10 L のゴースネット製の網に、受精卵が入ったバケツから海水と共に收容し消毒している。電解海水を注水するホースをゴースネット製網内に入れて卵が蟻集しないように動かしながら攪拌する。

7. ふ化水槽への収容する（消毒終了）。

*消毒後に輸送する際はUV 殺菌海水を1時間かけ流し電解海水を除去することを推奨する。



図 3.2-9 卵の投入の様子（左）、卵の蟻集を防ぐために電解海水をボール（中央）またはホース（右）で流しいれ攪拌する様子

【卵消毒の時間】

卵の発生ステージにより電解海水（0.75 mg/L）に耐えられる時間が異なり、胚体期では3分、桑実胚期では5分と、桑実胚期のほうが長い。胚体期では3分以上の残留オキシダントへの暴露により、死亡しないもののふ化できない卵が増加する。これは、未ふ化生残卵と呼ばれ、ヒラメの他の卵消毒法においても報告されている。同じ異体類のマツカワや他の魚種においても胚体が形成される前のステージで消毒時間を長く取ることが可能となっている。安全になおかつ疾病の感染リスクを低減するためには、異常が出ないギリギリ最長の時間消毒する必要がある。そのため、ヒラメでは桑実胚期の受精卵に0.75 mg/L 5分間の消毒を推奨している。

【追加情報】

ハタ類およびアカアマダイのVNN対策で実施されている配偶子洗浄による垂直感染対策について、ヒラメ精子でも有効性と安全性を確認している。親魚のウイルス汚染強度が強いことで本マニュアルで紹介した受精卵消毒の有効性が担保できない状況が将来的に起こった場合、受精卵消毒より一步踏み込んだ対策として、こちらの手法を紹介することも可能であるので、お問い合わせ下さい。

謝辞

第3章「垂直感染対策」に関わる実証研究に御協力いただいた岩手県栽培漁業協会および岩手県内水面水産技術センターには心よりお礼申し上げます。

4 水平感染対策

ヒラメのアクアレオウイルス感染症では、以下に示すような水平感染も感染拡大につながる感染経路の一つであると考えられる。

(1) 水槽内での水平感染

感染死亡したヒラメ稚魚は、大量のウイルス（1尾あたり 10^6 コピー以上）を保有しており、水中に放出されたウイルスを含む飼育水を介した水平感染により水槽内での感染が拡大する。

(2) 水槽間での水平感染

異なる水槽で飼育されていた同一ロットの飼育群が時間差で順次発症していく事例が確認されているため、器具や飼育水の飛沫等を介して、水槽間での水平感染が発生していると考えられる。

(3) 感染親魚からヒラメ稚魚への水平感染

アクアレオウイルスに感染したヒラメ親魚の水槽からも、ウイルスが検出されており、親魚水槽から稚魚水槽への水平感染が起きる可能性も考慮に入れておく必要がある。

上記の想定される水平感染のうち、(2) と (3) については、器具の消毒や作業工程の検討等といった防疫対策により、感染経路の遮断が可能である。本章では、水平感染防止に役立つと思われる情報についてまとめた。

4.1 ウイルス不活化条件

培養細胞を用いた試験によりアクアレオウイルスの不活化条件を検討した（表 4-1）。ここで示した条件により、アクアレオウイルスの感染性を 99.9%以上不活化できることを確認している。2-プロパノールやエタノールは 30-40%・30 秒で不活化できるが、例えばスプレーで噴霧したり、水に濡れた手や器具を消毒したりする場合は、薬剤濃度が低減することを考慮する必要がある。また、次亜塩素酸ナトリウムについては、有機物により有効塩素濃度が著しく低下することから、ここに示した条件（200ppm・1分）以上で使用する事が望ましい。電解海水では 0.3 ppm・1 分間の処理で、99.9%以上のウイルスを不活化できることが確認されており、「3.2 電解海水殺菌装置によるヒラメ卵消毒法」で示した卵消毒の条件（0.75 ppm・5 分間）は、ウイルスの不活化には十分な条件であることを示している。

なお、①塩化ベンザルコニウム、②ヨード剤、③水道水（15℃）に含まれる残留塩素では、先行研究や我々の試験によりアクアレオウイルスを不活化できないことが確認されている。また、砂ろ過海水中では 7 日間経過しても 90%程度のウイルスしか不活化されなかったことから、飼育水中でも比較的長期間にわ

たって感染性のウイルスが生存できることが示唆されている。

表 4-1 アクアレオウイルスを 99.9%以上不活化できる処理条件

処理方法	処理条件	使用例
2-プロパノール ^{*1}	40%・30 秒	手や器具の簡易消毒
エタノール ^{*1}	30%・30 秒	手や器具の簡易消毒
次亜塩素酸 ナトリウム ^{*1}	200 ppm・1 分	器具等の消毒 汚染水槽の消毒
60℃（水道水） ^{*1}	10 分	器具の消毒
80℃（水道水） ^{*1}	1 分	器具の消毒
紫外線 ^{*1}	100 mJ	飼育水の消毒
電解海水 ^{*2}	0.3 ppm・1 分	器具の消毒、卵消毒

*1: 有機物（ウシ胎児血清:FBS）存在下で実施した場合の試験結果。特に次亜塩素酸ナトリウムは、有機物により有効塩素濃度が著しく低下するため、ウイルス単体では不活化に必要な次亜塩素酸ナトリウム濃度は 200 ppm よりも低いと考えられる。しかし、実際の消毒時には様々な有機物の存在が想定されるため、次亜塩素酸ナトリウム 200 ppm 以上で消毒を実施することが望ましい。

*2: 有機物を含まないウイルス単体で実施した場合の試験結果。

4.2 水平感染防止の留意点

天然ヒラメの調査では 10～30%の魚でアクアレオウイルスの感染が確認されており、完全にウイルスフリーの親魚を養成することは非常に困難である。そのため、養成中のヒラメ親魚がウイルスを保有している前提で、ウイルスフリー区域とウイルス汚染を想定した区域に分けて防疫対策を実施していくことが望ましい（図 4-1）。また、親魚の餌となるマイワシ、イカナゴおよびカタクチイワシからもアクアレオウイルスが検出されていることも留意しておく必要がある。取水を介した天然環境からのウイルスの侵入については、今のところ問題は顕在化していない。ただ、親魚水槽からの排水と取水口が近い場合は、感染親魚から排出されたウイルスが取水を通じて、ヒラメ稚魚に伝播する可能性も否定はできない（図 4-1）。取水を通じた感染が疑われる場合は、紫外線殺菌装置などを用いてヒラメ稚魚の用水の殺菌および排水の殺菌も検討する必要がある。

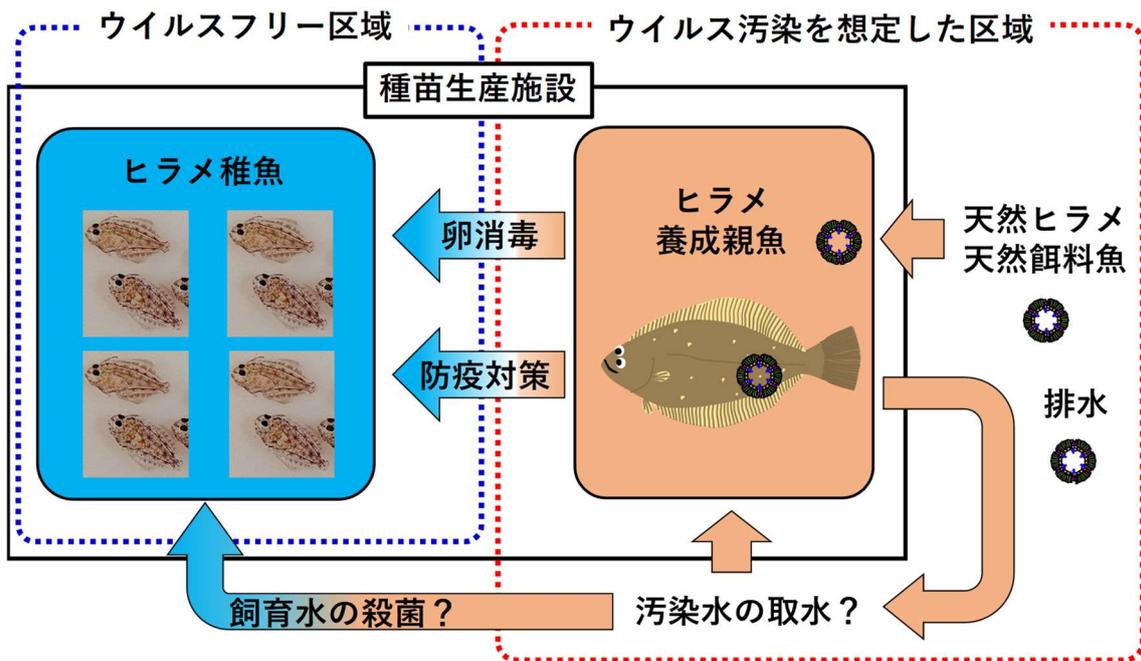


図 4-1 防疫対策を実施する際の区域分けイメージ

5 問い合わせ先

水産研究・教育機構
増養殖研究所
魚病診断・研修センター
電話：0599-66-1872 FAX：0599-66-1962

ヒラメのアクアレオウイルス感染症 防除対策マニュアル

文書終わり

Ver 1. 2020年3月発行