

# クロマグロ人工種苗における感染症診断マニュアル

補足資料1：クロマグロにおけるマダイイリドウイルス病の防疫対策

補足資料2：鉄凝集法による海水中のウイルス濃縮

令和5年3月

国立研究開発法人 水産研究・教育機構

水産技術研究所 養殖部門

病理部

まぐろ養殖部

学校法人 近畿大学 水産研究所

## はじめに

クロマグロの人工種苗は沖だし後にしばしば感染症による大量死が起きる。本プロジェクトを通して、大量死につながるような重要疾病として、ウイルス性神経壊死症、マダイイリドウイルス感染症、連鎖球菌症、滑走細菌症、住血吸虫感染症が挙げられる。このような感染症に起因した死亡においては、早期診断が重要である。本冊子では、病理組織検査結果とPCR法による病原体の遺伝子増幅による診断結果に限定し、症例紹介の冊子とした。また、写真や情報もできるだけ最小限に抑えて、現場において、見開きですぐに役立つように考え、詳細な疾病情報は割愛した。水温や発生時期などの情報については、症例数が少ないため、誤解を避けるうで記載しなかった。従って、病気の発生状況などの詳細については、別の専門書を参照していただきたい。なお、本冊子で使用した核酸抽出試薬は、Quick-DNA/RNA Pathogen MiniPrep(ZYMO RESEARCH社)、PCR試薬はGoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix (Promega社) またはEx Taq Hot Start(Takara社) RT-PCR試薬はSuperScript™ III One-Step RT-PCR System(Invitrogen)であるが、同等の製品ならよい。また、病理組織検査に関しては、ダビドソン液を固定液として使用した。本冊子がクロマグロ種苗における疾病を網羅した診断マニュアルにはほど遠いが、これまで、マグロの診断指針がなく、本冊子が少しでも診断の役に立てればと願う。

補足資料として、「海水中のウイルスを検出するためのウイル濃縮法」及び「クロマグロにおけるマダイイリドウイルス病の防疫対策」を掲載した。併せて利用されたい。

なお、本マニュアルは、平成30年度～令和4年度に実施された農林水産研究の推進委託プロジェクト研究「クロマグロ養殖の人工種苗への転換促進のための早期採卵・人工種苗育成技術や低環境負荷養殖技術の開発」JPJ007159により得られた成果を元に作成されたものである。

## 目次

1. ウイルス性神経壊死症 .....	1
2. マダイイリドウイルス (RSIV) 感染症 .....	6
3. 連鎖球菌症 .....	7
4. 滑走細菌症 .....	9
5. ベコ病 (微孢子虫感染症) .....	11
6. 脳クドア症 (病理のみの判断、PCR による検証はない) .....	13
7. 筋肉内の粘液胞子虫 ( <i>Unicapsula</i> sp.) 感染 .....	14
8. 住血吸虫症 .....	16
9. ウオノエ感染症 .....	20
補足資料 1.....	21
補足資料 2.....	31

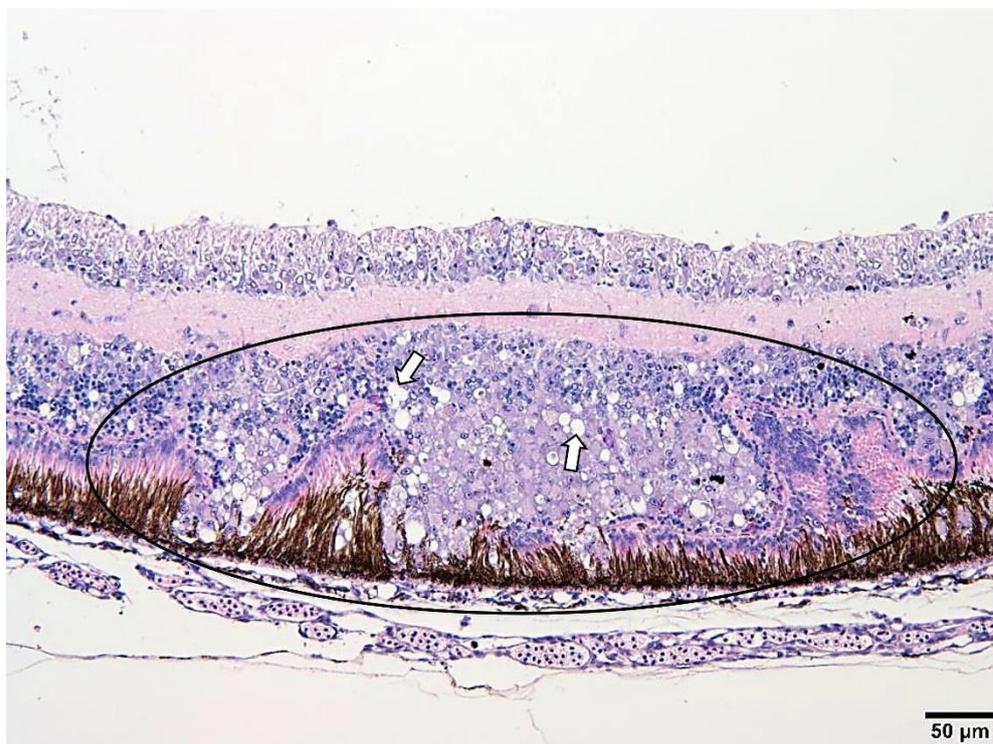
## 1. ウイルス性神経壊死症

### 原因ウイルス名

NNV (Nervous necrosis virus)

**病理組織** (31日令, 全長4-6cm, 陸上水槽飼育中(沖出し前)の自然感染例, 4/4個体(4個体に特異的病変あり/4個体検査))

網膜に顕著な異常がみられ、その他にも脊髄あるいは延髄に異常がみられ、死亡原因である。



**写真1.** 網膜の病変。網膜の内顆粒層を中心に炎症が起きている。内顆粒層の細胞配列は顕著に乱れ、細胞浸潤が起きている(丸部分)。ときどき、細胞が融解、消失して生じたと思われる空隙がみられる(矢印)。眼の中心部のガラス体や網膜の下の血管層に顕著な異常はほとんど認められない。HE染色。

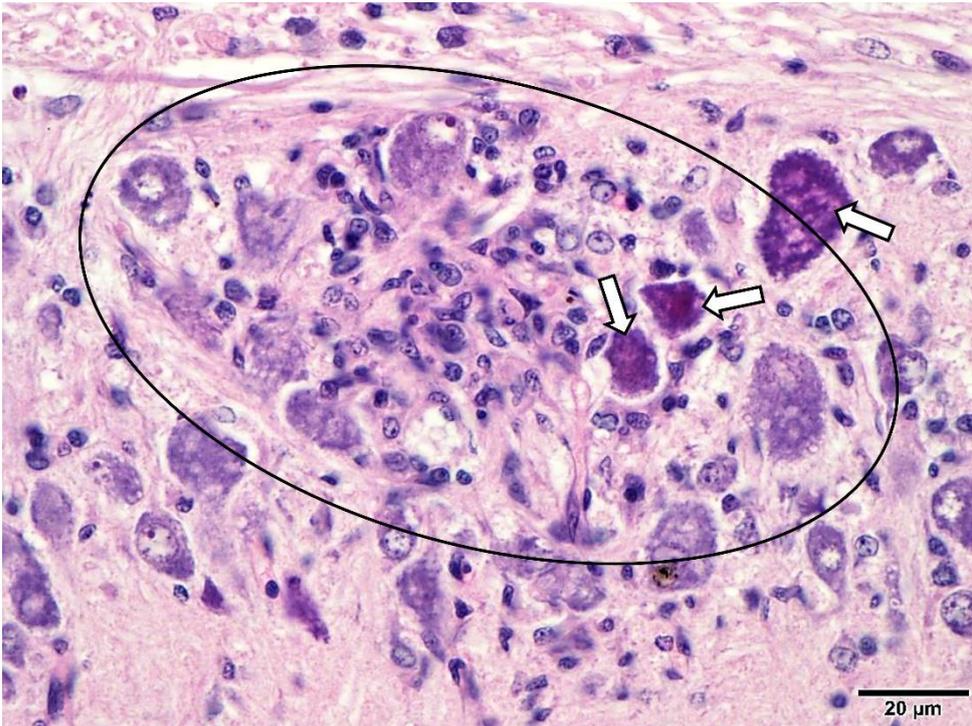


写真2. 脊髄に、死細胞(矢印)が出現し、グリア細胞の集積(丸部分)がみられる。HE 染色。

### 診断法

#### RT-PCR による検出法

サンプル(テンプレート)： 脳からの抽出 RNA。

RT-PCR： NNV-uni(水技研：<https://nria.fra.affrc.go.jp/sindan/pcr/VNN.pdf>)

プライマー		反応条件	増幅産物 (bp)
名称	塩基配列(5' -3' )		
NNV-F1	CAACTGACAACGACCACACC	55°C30 分→95°C2 分→(95°C15 秒、55°C30 秒、72°C60 秒) ×40 サイクル→72°C5 分	795
NNV-R2	CTCCTTGGGTGCTTTGTCGT		

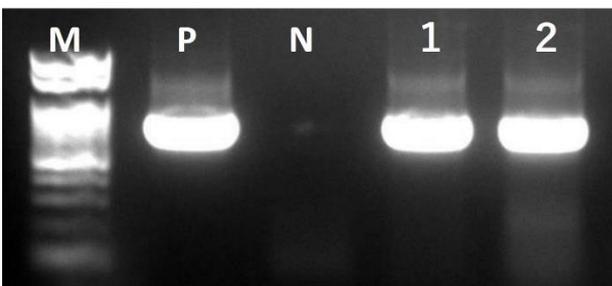


写真3. NNV-uni を用いた RT-PCR による電気泳動像

M, マーカー； P：培養細胞(E-11)で分離した NNV； N：陰性対照； 1：NNV 感染脳組織の検体1； 2：NNV 感染脳組織の検体2

## ウイルス分離法

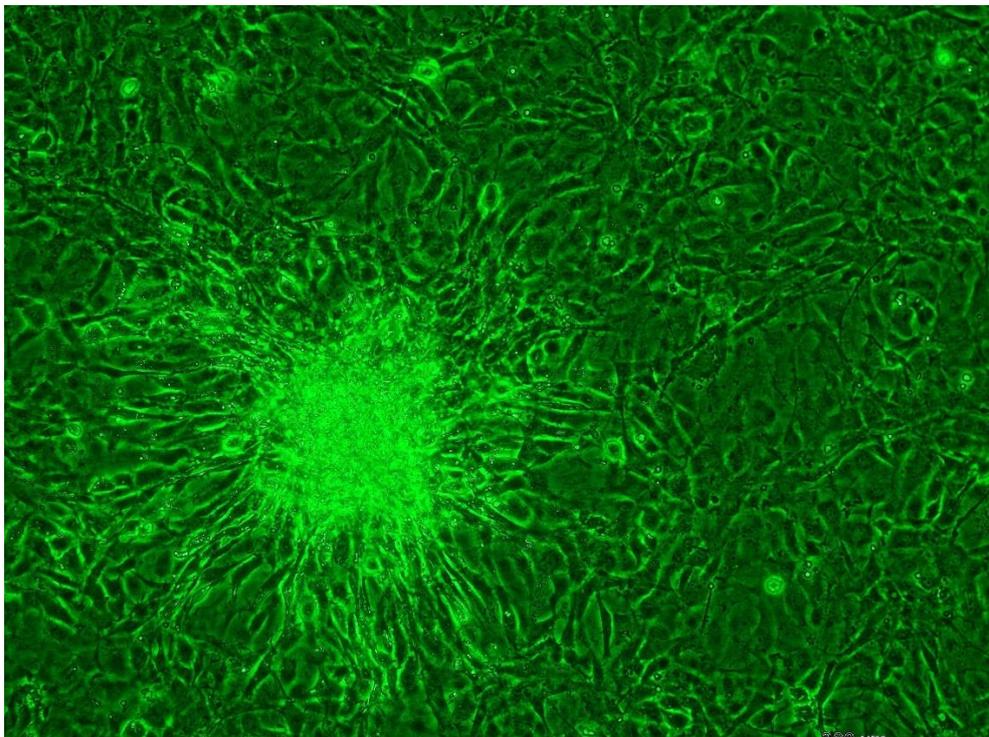


写真4. 脳からの NNV ウイルス分離。E-11 細胞で細胞変性が確認できる。

### 電解海水を用いたクロマグロ受精卵の消毒方法

水産技術研究所 長崎庁舎では、樋口ら（2015）の消毒法に準じて、以下の手順でクロマグロの受精卵消毒を実施している。以下、当該庁舎での実際の実施方法について紹介する。

使用機材（図1）：

海水電解装置（HSE-100；東和電機製作所）、調温水槽、送水ポンプ、アルテミアふ化槽（200L）、分光光度計（DR2800；HACH）、湯かき棒、卵回収用ネット

作業手順（図2）：

1) 送水ポンプおよび電解装置を稼働させ、親魚産卵水温と同じ温度に調温した海水を送水ポンプで海水電解装置に送り、遊離塩素を含む電解海水を、アルテミアふ化槽を用いた卵消毒水槽へ流し込む。

注意点) 水素が発生することから換気に留意する必要がある。

2) 卵消毒水槽の注水量を 80～90kL/h 程度の範囲で定め、海水電解装置の電流を調整し遊離塩素濃度を規定量に合わせる。遊離塩素濃度は、注水口で 1.0～1.5mg/L に調整すると、水槽内で 0.8～1.2mg/L 程度になる。遊離塩素濃度は、ジエチルパラフェニレンジアミン（DPD）法により分光光度計で測定する。

注意点) 遊離塩素濃度は、使用海水の有機物量等により変化し、また消毒後のふ化率は受精卵の質的なも

のに影響を受けるため、ふ化に影響のない遊離塩素濃度を把握しておく必要がある。当該庁舎では注水口での濃度を1.0~1.1mg/Lにしている（水槽内では0.80~0.95mg/L程度になる）。

3) 注水口での遊離塩素濃度が安定したら、200Lのふ化水槽に満水時に150Lになるようにパイプを刺し電解海水を貯ためる（排水バルブは開け掛け流しにする）。

4) 遊離塩素を中和する10%チオ硫酸ナトリウムを準備しておく。

5) ふ化水槽の排水バルブを閉め、パイプを取り除く。電解海水を流した状態で、1水槽当たり10万~20万粒の受精卵をふ化水槽に投入し、湯かき棒で1分間ゆっくりと攪拌し消毒する。

注意点) 当該庁舎では、樋口ら(2015)の報告に従い、卵消毒は受精卵の発達段階が桑実胚期から心臓拍動期に実施するようにしている。

6) 1分間経過したと同時に、電解海水の注水を止め、10%チオ硫酸ナトリウムを添加し30秒間攪拌する(当該庁舎では15mLを添加)。

7) 攪拌をやめ、受精卵を浮上させる。十分に浮上したらネットで回収する。

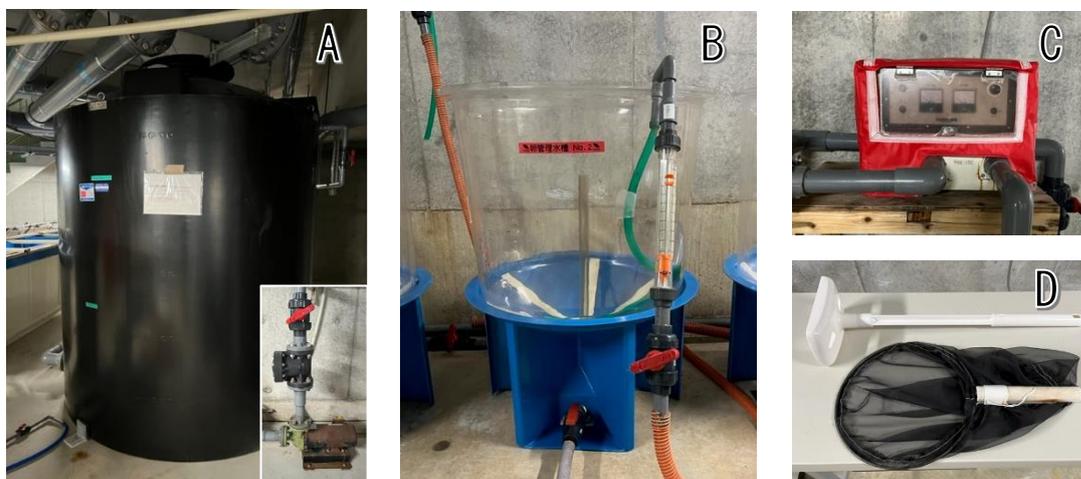


図1. 卵消毒に使用している機材

A: 調温水槽と送水ポンプ、B: 卵消毒水槽（アルテミアふ化槽）、C: 海水電解装置、D: 湯かき棒（上）と採卵ネット（下）

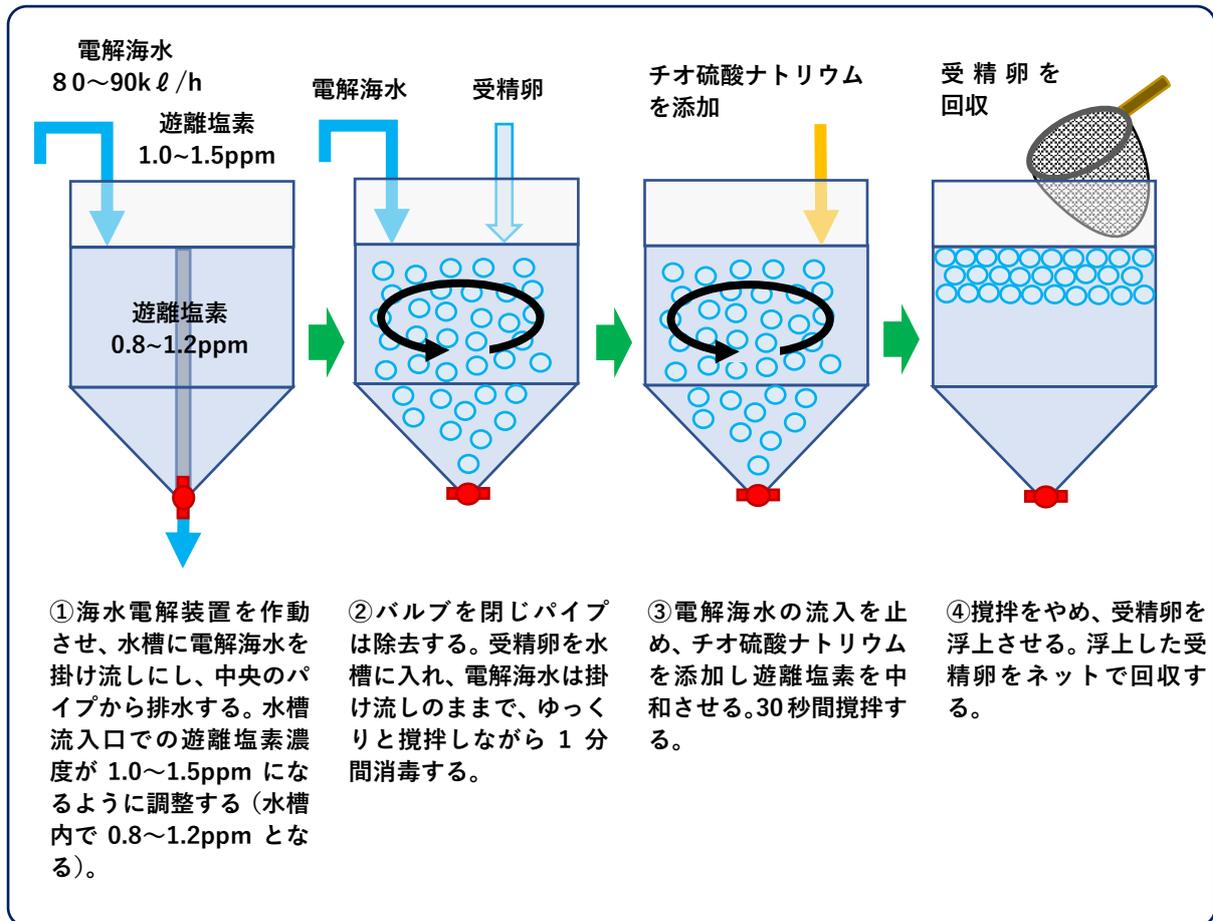


図2. クロマグロの卵消毒の作業手順フロー図

引用文献：

樋口 健太郎・小西 淳平・高志 利宣・田中 庸介・鈴木 絢子・辻田 明子・澤口 小有美・  
 玄 浩一郎・岡 雅一・虫明 敬一（2015）：電解海水がクロマグロ *Thunnus orientalis* 受  
 精卵のふ化に及ぼす影響. 水産増殖, 63(3), 333-341.

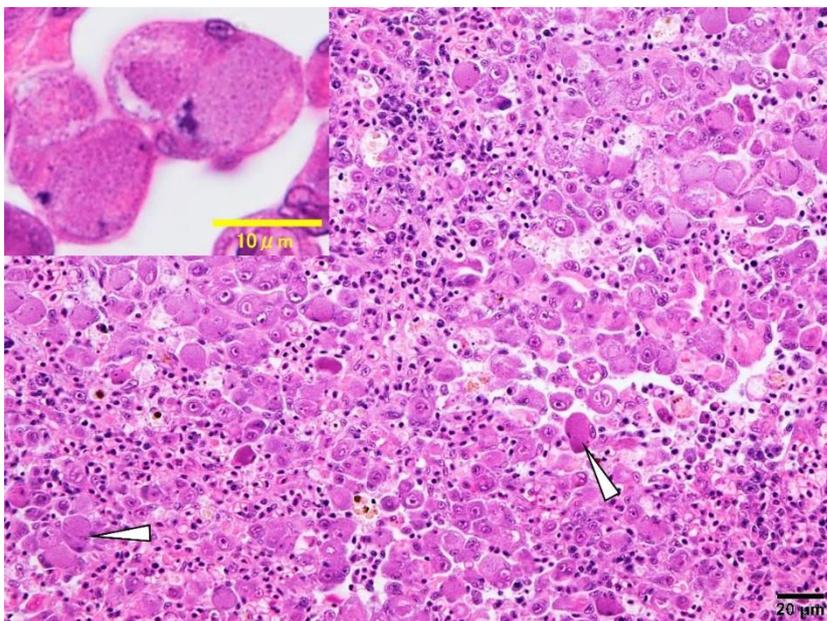
## 2. マダイイリドウイルス (RSIV) 感染症

### 原因ウイルス名

RSIV (Red sea bream iridovirus)

病理組織 (魚体重 6.6-11g, 実験感染例, 5/5 個体)

最も顕著な病変は脾臓にみられ、無数の異形肥大細胞が出現し、脾臓組織が異形肥大細胞の集積に置換されていた。脾臓の病変は他魚種に見られないほど顕著であった。そのほか、異形肥大細胞は腎臓の間質、鰓の骨組織の周囲、心外膜、動脈球の外膜、消化管の粘膜固有層・粘膜下組織にみられた。一方、肝臓、膵臓、骨格筋に異形肥大細胞はほとんどみられなかった。対照区よりも有意に高い死亡率が確認され、RSIV 感染が死因である。



**写真 1.** イリドウイルスに実験感染したクロマグロの脾臓に出現した異形肥大細胞。無数の異形肥大細胞 (矢頭) が出現し、脾臓の組織が異形肥大細胞の集積に置き換わっている。左上の挿入写真に異形肥大細胞の拡大を示す。HE 染色。

### PCR を用いた診断法

サンプル(テンプレート) : 脾臓からの抽出 DNA。

PCR : 1-F/1-R(Kurita et al.1998: Fish Pathol. 33, 17-23)

プライマー		反応条件	増幅産物 (bp)
名称	塩基配列(5' -3' )		
1-F	CTCAAACACTCTGGCTCATC	(94°C30 秒、58°C60 秒、72°C60 秒) × 30 サイクル 72°C5 分→72°C5 分	570
1-R	GCACCAACACATCTCCTATC		

### 本病の防疫対策

補足資料 1 「クロマグロにおけるマダイイリドウイルス病の防疫対策」を参照。

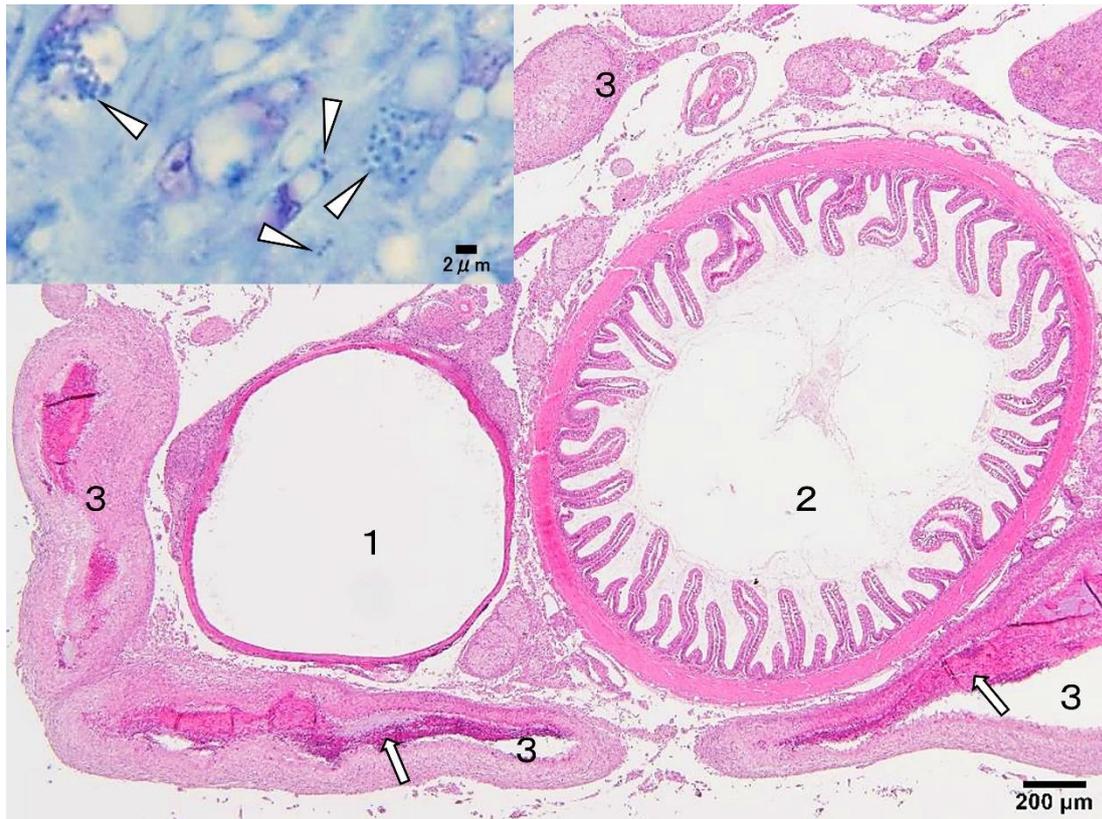
### 3. 連鎖球菌症

#### 原因病原体

*Lactococcus garvieae* α 溶血性連鎖球菌, I 型

病理組織 (魚体重 20-70g, 実験感染例, 4/5 個体)

腹膜、心外膜や頭部結合組織にマクロファージの集積や肉芽腫が多数みられ、中心に当該細菌が観察された。対照区よりも有意に高い死亡率が確認され、当該細菌感染が死亡原因である。



**写真 1.** 実験感染したクロマグロの腹膜に出現した多数の肉芽腫(3)(HE 染色)。肉芽腫の中心の赤い構造(矢印)は死細胞などのデブリである。腹腔に顕著な肉芽腫炎が起きているが、腸などの内臓の実質組織に病変はみられない。挿入写真に肉芽腫の近接切片の MG 染色を施すが、肉芽腫を覆うマクロファージ(類上皮細胞)に球菌(*L. garvieae*) (矢頭)がみられる。1: 胆嚢; 2: 腸。

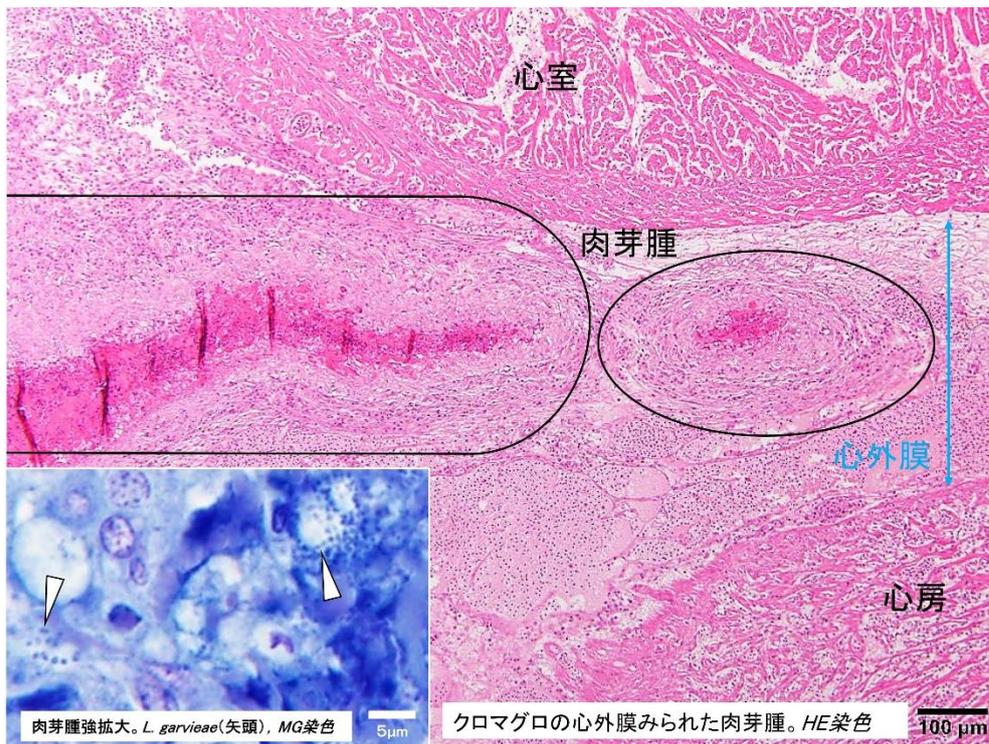


写真2. 実験感染したクロマグロの心外膜に出現した肉芽腫と *L. garvieae*。

### PCR を用いた診断法

サンプル(テンプレート)： 腹膜や心外膜からの抽出 DNA。

PCR： Ohbayashi et al. (2017) (Fish Pathol. 52, 46-49)

プライマー		反応条件	増幅産物 (bp)
名称	塩基配列(5' -3' )		
LGD-F	GGATTGAACTTCCTGCCACA	95°C4分→(95°C30秒、55°C30秒、 72°C90秒) x30サイクル→72°C7分	285
LGD-R	ATCCTTGAGGACAACGAAGG		

本プライマーセットでは、II型も検出でき、増幅産物は1285bpである。

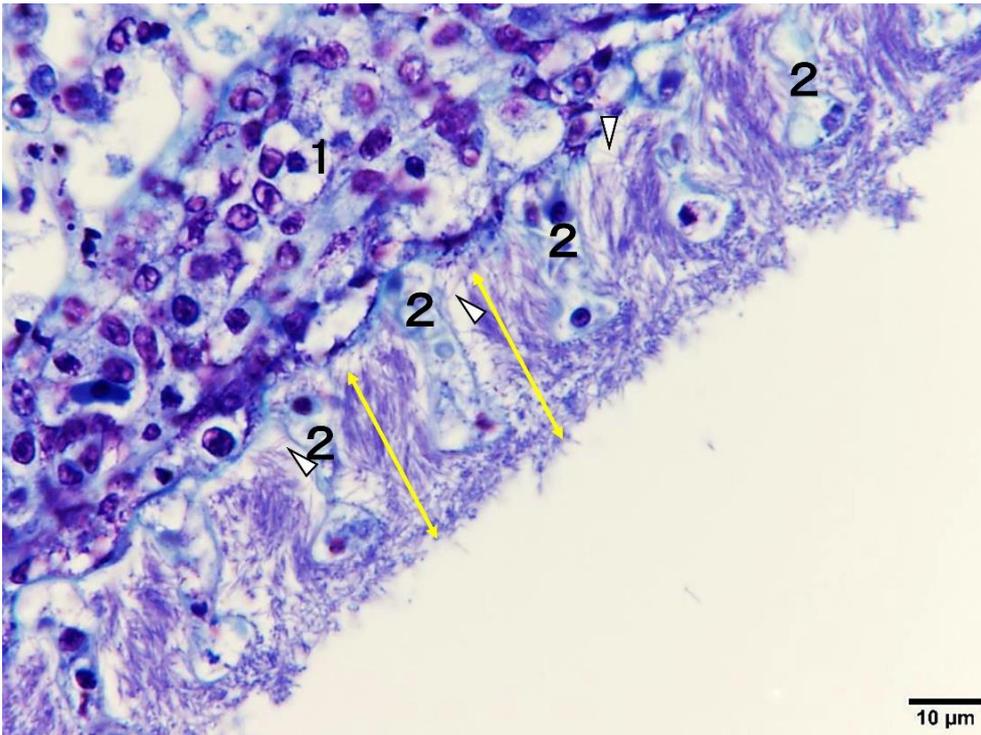
#### 4. 滑走細菌症

##### 原因病原体

*Tenacibaculum maritimum*

病理組織(全長 10cm, 沖出し後の自然感染例, 3/3 個体)

鰓組織が変性し、無数の幅の狭い長桿菌(3.5-6 μm x 0.1-0.2 μm)が出現し、集落を形成していた。ときどき、鰓弁上皮が増生し、棍棒化が起きていた。当該細菌感染が一義的な死亡原因であることが示唆された。



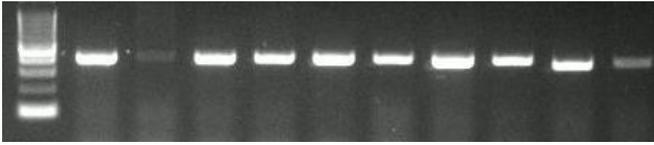
**写真 1.** 鰓の二次鰓弁の間を埋めている長桿菌の塊。鰓上皮は脱落し、露出した二次鰓弁(2)の結合組織の表面に、無数の長桿菌の集落がみられる(黄色の両矢印は一部を示す)。矢印は比較的形態の明らかな単独の長桿菌を示す。1 : 一次鰓弁。MG 染色。

##### PCR を用いた診断法

サンプル(テンプレート) : 鰓からの抽出 DNA。

PCR : Bader and Shotts(1998) (Dis. Aquat. Organ., 62, 75-83)

プライマー		反応条件	増幅産物 (bp)
名称	塩基配列(5' -3' )		
Mar1	TGTAGCTTGCTACAGATGA	94°C2分→(94°C30秒、58°C30秒、 72°C30秒) x40 サイクル→72°C7分	400
Mar2	AAATACCTACTCGTAGGTACG		



**写真 2.** Mar1/Mar2 を用いた PCR による電気泳動図  
左から分子量マーカー、検体 1—10、陰性対照。  
GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix (プロメガ社)  
上記の PCR 反応条件は原著のものとは異なる。

## 5. ベコ病(微孢子虫感染症)

### 原因病原体

*Microsporidium* sp. PBT

病理組織(全長 20cm, 魚体重 100g, 沖出し後の自然感染例, 5/5 個体)

骨格筋に微孢子虫(*Microsporidium* sp. PBT)が感染しシストを形成し、内部に無数の微孢子虫の胞子がみられ、ベコ病を起こしていた。高い死亡率は起きないが、ヤセの原因になる。



写真1. 骨格(20cm, 100g 程度)にみられる無数の微孢子虫のシスト(白色部位)(矢印)。頭部を切り落とし、筋肉を露出した写真である。微孢子虫に重篤に感染している。

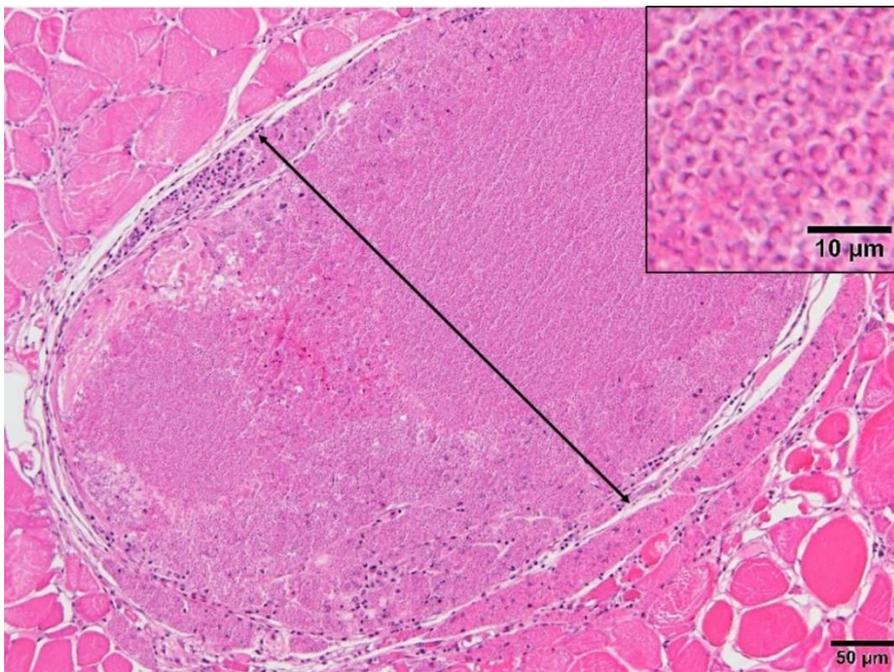


写真2. 20cm, 100g 程度の体側の骨格筋にみられた微孢子虫のゼノマ(両矢頭)。微孢子虫は概ね、すべて成熟した胞子の状態であり、若いステージは見られない。また、シスト周囲に

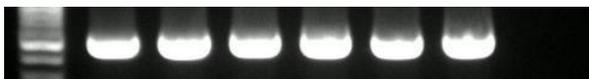
細胞浸潤や筋肉の変性などが見られたが、顕著でなく、シスト崩壊や組織崩壊はみられず、皮膚組織の崩壊などもみられない。右上の挿入写真に孢子の拡大を示す。孢子の大きさは約  $1.6 \mu\text{m}$  である。HE 染色。

### PCR を用いた診断法

サンプル(テンプレート)： 骨格筋のシストからの抽出 DNA。

PCR： MS-F1/ MsITS\_R1

プライマー		反応条件	増幅産物 (bp)
名称	塩基配列(5' -3' )		
MS-F1	GGATTGAACTTCCTGCCACA	94°C 3 min, (94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s) x30cycles	482
MsITS_R1	ACTACTTTGCGGACTTAACCCAGAG		



MS-F1/MsITS\_R1 を用いた PCR による電気泳動像

左から分子量マーカー，検体 1 - 6，陰性対照。

GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix (プロメガ社)

## 6. 脳クドア症（病理のみの判断、PCRによる検証はない）

### 原因病原体

*Kudoa yasunagai*

病理組織（全長 20cm, 魚体重 100g, 沖出し後の自然感染例, 1/5 個体）

脳の髄膜に *Kudoa* 属の寄生体のシストが中程度の頻度で見られたが、炎症像はみられず、中枢神経に寄生体や病変はみられなかった。おそらく、脳クドア症の原因体 (*Kudoa yasunagai*) と思われた。当該寄生体は魚種によっては、異常を起こすとされているが、クロマグロにおいては、今のところでは、死亡、側弯症や遊泳異常の報告はない。

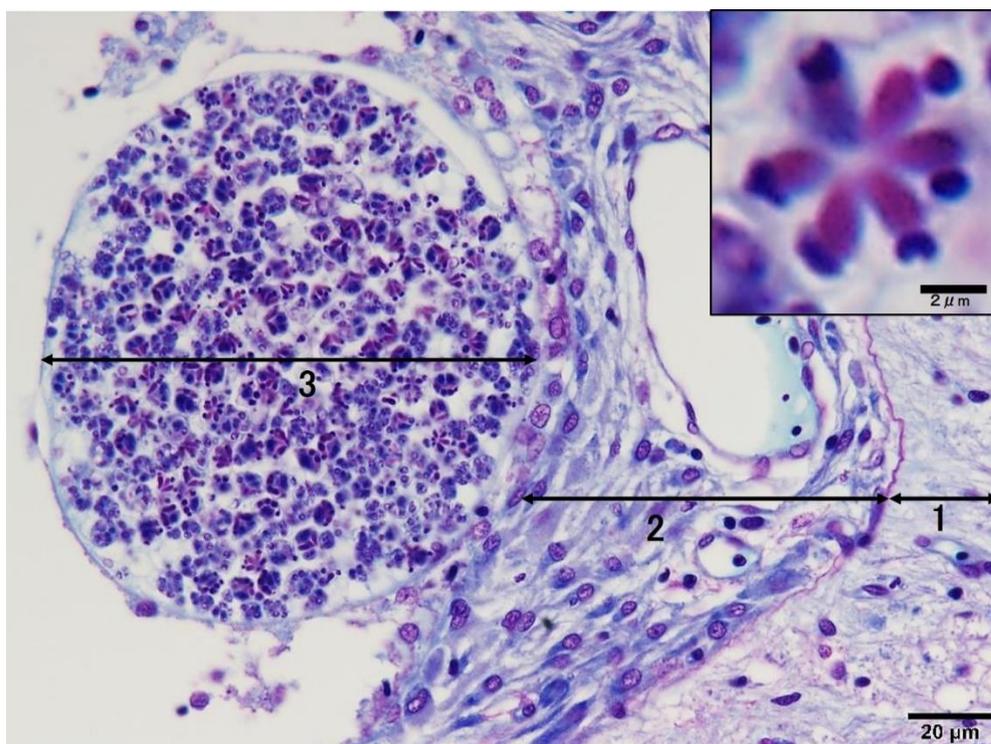


写真 1. 粘液胞子虫(K)のシスト(3)。写真は延髄(1)の背面の髄膜(2)にみられたシスト(3)を示すが、周囲に炎症像はみられない。右上の挿入写真に極囊が明瞭に見られた胞子の拡大を示す。胞子の大きさは約  $8\mu\text{m}$  であり、極囊の数は多くの場合、6 個であった。MG 染色。

### PCR を用いた診断法

実施していないが、以下を推奨する。

サンプル(テンプレート)： 脳表面にみられるシストからの抽出 DNA。

PCR： Shirakashi et al. (2012) (Dis. Aquat. Org. 101, 123-30)

プライマー		反応条件	増幅産物 (bp)
名称	塩基配列 (5' -3' )		
yassuf	AACCTAGTGTTTCGGCTTCG	95°C3 分→(94°C30 秒、58°C30 秒、72°C 30 秒)×35 サイクル→72°C10 分	482
Yassur	CTTTTCCCCACAACGTCAAG		

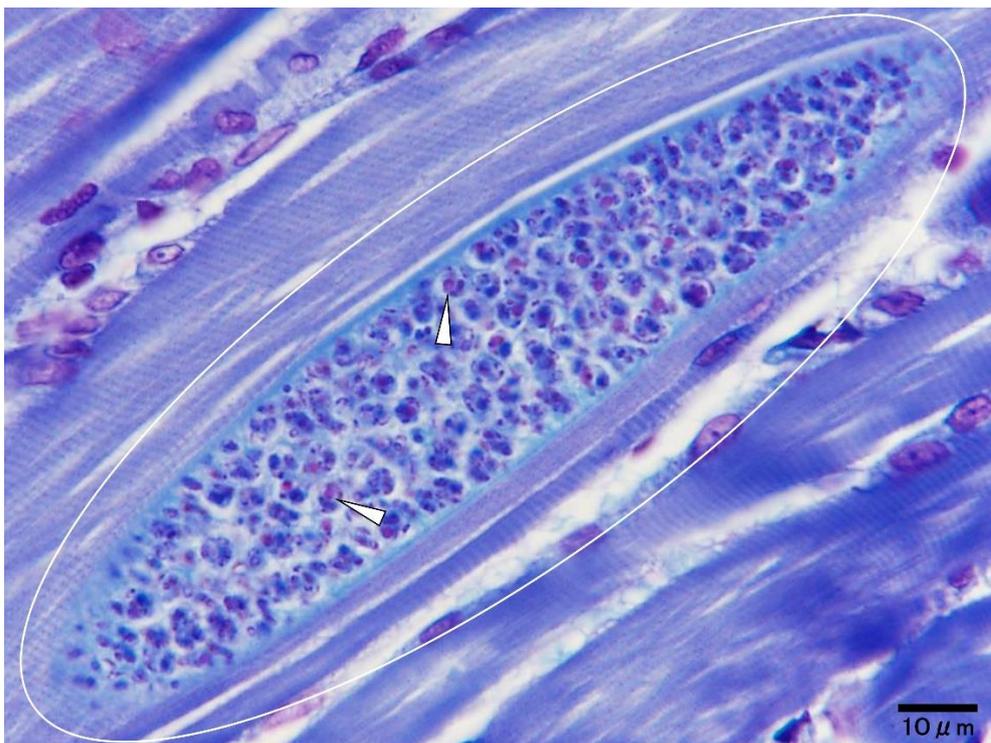
## 7. 筋肉内の粘液胞子虫 (*Unicapsula* sp.) 感染

### 原因病原体

*Unicapsula andersenae* の近縁種 : *Unicapsula* sp.

病理組織 (全長 10cm, 沖出し後の自然感染例, 3/3 個体)

骨格筋に小規模の炎症がみられ、粘液胞子虫の栄養体様構造のシストが中程度にみられた。この程度の病変では、死亡原因になるとは思われませんが、シストの出現率は低くない。



**写真 1.** 骨格筋の筋線維に感染した粘液胞子虫。寄生体のシスト (丸部分) 内部は粘液胞子虫 (*Unicapsula andersenae* の近縁種) の栄養体と思われる構造で充満している (一部は成熟胞子かもしれない)。矢頭は MG 染色で赤色に染まるので、粘液胞子虫の極嚢あるいはその前駆体と思われる。MG 染色。

### PCR を用いた診断法

サンプル (テンプレート) : 骨格筋からの抽出 DNA。

PCR : Kurobe et al. (unpublished)

プライマー		反応条件	増幅産物 (bp)
名称	塩基配列 (5' -3' )		
81_Unicapsula-gen-F2	TTGGATTACAAAAGCTCGATG	95°C 3 分 → (95°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 80 秒) × 35 サイクル → 72°C 10 分	899
83_Unicapsula-gen-R2	GGAATTCCTCTTTCATGAGC		



**写真 2.** 81\_Unicapsula-gen-F2/83\_Unicapsula-gen-R2 を用いた PCR による電気泳動図  
左から分子量マーカー、検体 1—5、陰性対照。

反応には筋肉より抽出した DNA を使用（一反応当たり 100 ng 程度）

GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix（プロメガ社）

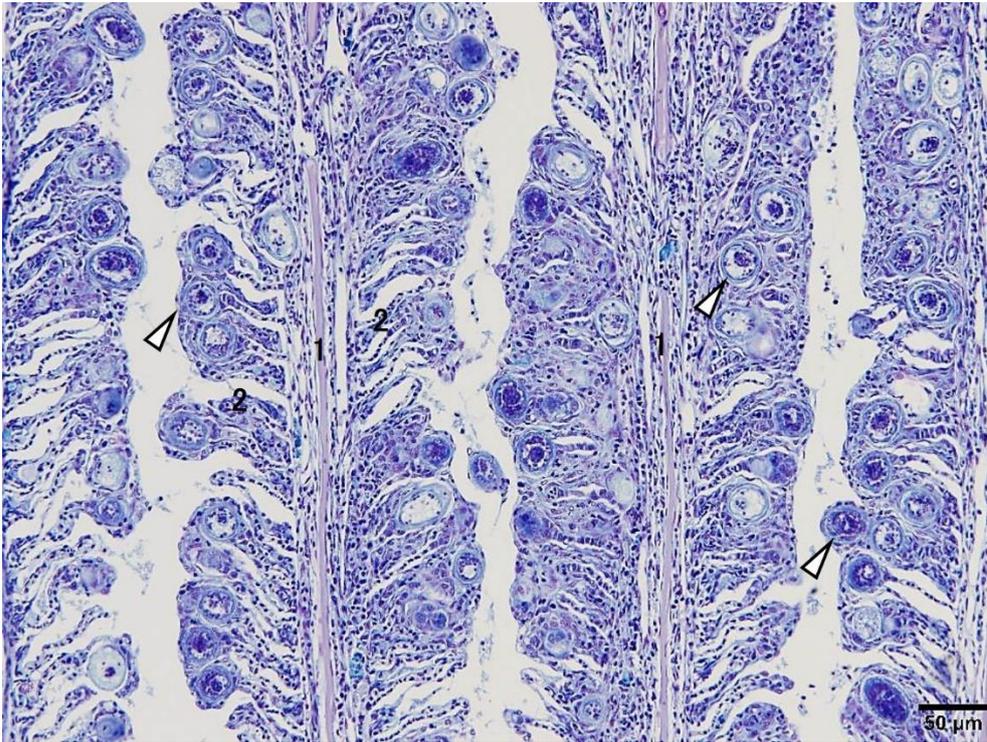
## 8. 住血吸虫症

### 原因病原体

*Cardicola* 属の 3 種、すなわち、*C. forsteri*、*C. opisthorchis*、*C. orientalis*。  
*C. orientalis* だけが鰓のみに感染し、残りの 2 種は鰓だけでなく、心臓にも出現するが、  
遺伝子などで区別することが必要である。

**病理組織** (全長 20cm, 魚体重 100g, 沖出し後の自然感染例, 3/3 個体)

二次鰓弁辺縁部の組織に住血吸虫卵が高頻度で出現し、鰓弁の癒着が広範でみられた。当  
該寄生体感染により、呼吸障害で死亡したことが示唆された。



**写真 1.** 20cm、100g 程度の鰓に寄生した虫卵による鰓の棍棒化(\*)。鰓の二次鰓弁(2)に無数の住血吸虫 (*Cardicola* 属)の卵(矢頭)がみられ、鰓上皮が増生し、隣接する二次鰓弁と融合し、鰓弁の境界がわからなくなり、棍棒化している。虫卵は二次鰓弁の辺縁部に多くみられる。1：一次鰓弁； 2：二次鰓弁。MG 染色。

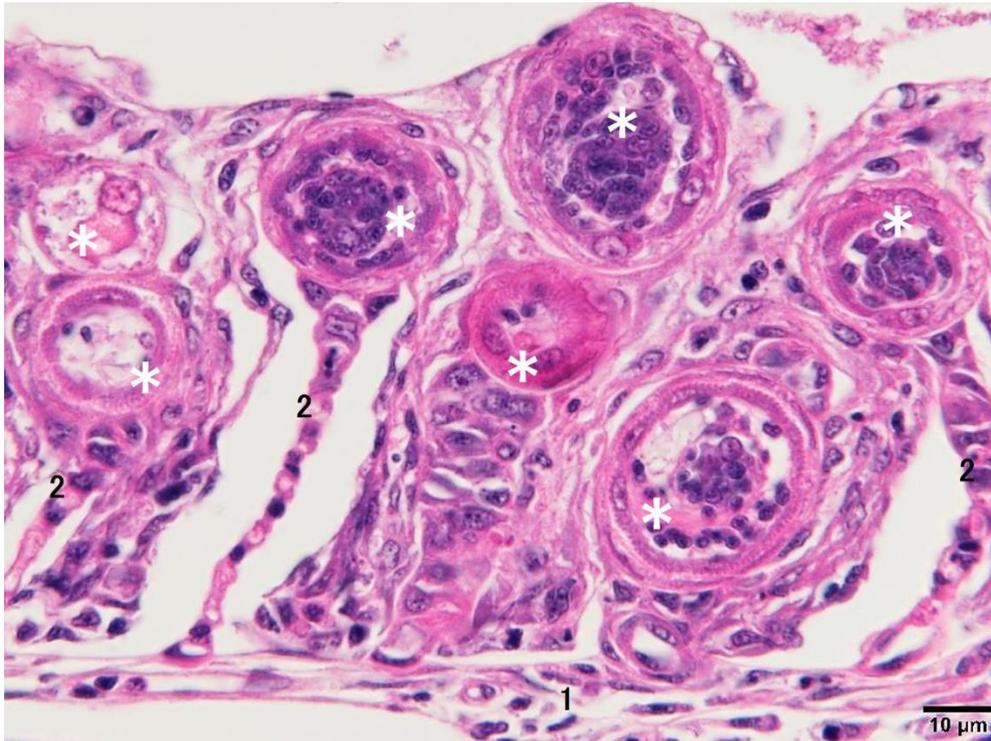


写真2. 鰓に寄生した住血吸虫の卵(\*)の強拡大。1：一次鰓弁； 2：二次鰓弁。HE染色。

### 定量PCRを用いた診断法（住血吸虫の種類別の検出法）

#### 1. 検査材料の準備

鰓、心臓等を検体から採取。

#### 2. DNA抽出

QIAGENのQIAmp mini kitあるいはDNeasy Blood and Tissue kit等を推奨するが、同品質のDNA抽出が可能であれば他社製品で構わない。

#### 3. リアルタイムPCR法による検出

##### 1) プロブ及びプライマーの配列

検査対象	種類	オリゴ名	配列
<i>Cardicola orientalis</i> 増幅サイズ： 157 bp	プローブ※	CaoriPq	TGTGACCGGTCGCAATCATACTCAAATTG (標識：5' FAM - 3' BHQ1a or TAMRA)
	フォワードプライマー	CaoriFq	TGCTTGCTATTCCTAGATGTTTACGTT
	リバースプライマー	CaoriRq	CGCTACCACAATCCACTCAA
<i>C. opisthorchis</i> 増幅サイズ： 153 bp	プローブ	CopistPq	CACCTGGCATATGTAATGGCTTGTTTTTCC
	フォワードプライマー	CopistFq	GTCCGAGGGTTGGCTTTTC
	リバースプライマー	CopistRq	CACTGGCGGCTTGACTAG

<i>C. forsteri</i>	プローブ	CforPq	CATAACATGGAAGCTAGTCAAGCGCGCCA
増幅サイズ： 114 bp	フォワードプライマー	CforFq	GTGATTGCTTGCTTTTCTCGATA
	リバースプライマー	CforRq	GGTCACATTAGGAAAGAGCCACATT

※例：ユーロフィンジェノミクス株式会社のダブル蛍光標識プローブ（5' FAM - 3' BHQ1）

## 2) 反応液の組成

（1 反応分）

Probe qPCR Mix ※	10 $\mu$ l
フォワードプライマー（10 pmol/ $\mu$ l）	0.6 $\mu$ l
リバースプライマー（10 pmol/ $\mu$ l）	0.6 $\mu$ l
プローブ（5 pmol/ $\mu$ l）	1.0 $\mu$ l
50X ROX reference ※※	0.4 $\mu$ l（製品添付書を参照。）
DNA 溶液	0.5~4 $\mu$ l（通常 2 $\mu$ l）
D. W.	Total 20 $\mu$ l にあわせる

※ Probe qPCR Mix（TaKaRa、RR391A）

反応酵素はプローブ法用であれば他社製品で構わない。

※※ 50X ROX reference は使用機器によって添加の必要性、濃度が異なる。

## 3) 反応条件の例（使用酵素の製品マニュアルを参照。以下は Probe qPCR Mix の場合。）

①初期変性	95°C, 30 秒
②変性	95°C, 5 秒
③伸長	<i>C. orientalis</i> の場合, 60°C, 30 秒 <i>C. opisthorchis</i> の場合, 55°C, 30 秒 <i>C. forsteri</i> の場合, 56°C, 30 秒 複数標的を同時に検出する場合, 56°C, 30 秒
④ ②と③を繰り返す	50 サイクル(蛍光測定は伸長ステップに設定)

## 防除法：プラジクアンテルによる駆虫と、中間宿主駆除による予防法

### 1. 対象種の特定

種によって生態や最適な投薬法が異なるため、当該漁場で発生している住血吸虫種を特定することが重要。魚体（鰓・心臓）もしくは漁場海水（0.5 L 以上推奨）の濾過物（孔径 5  $\mu$ m 以下の Isopore メンブレンフィルターもしくは同等品推奨）を上記方法で核酸抽出し、種特異定量 PCR で検査すれば、発生種の特定や発生状況のモニタリングが可能。海水

からの遺伝子検出には、補足資料2「鉄凝集法による海水中のウイルス濃縮」に記した手法で採取したサンプルも共用可能。なお、海水中の遺伝子量は変動が大きいため、複数回の調査とPCR阻害が無いことの確認も重要。

## 2. 最適な投薬スケジュール

水産用医薬品としてプラジクアンテルが承認されており、著効を示す。ただし、本薬は虫卵に対する薬効がないため、産卵が始まる前に投薬・駆虫することが、魚体への影響を軽度に抑えつつ住血吸虫の生活環を遮断するのに有効。1度の投薬でプラジクアンテルとして15 mg/kg 魚体重（50%製剤であれば30 mg/kg）を3日間連続投与する。住血吸虫が定着している漁場では、種苗を生け簀に導入した直後から寄生されるため、導入1ヶ月程度を目安に定量PCRで寄生状況を確認し、投薬を開始する。発生種が *C. opisthorchis* のみの場合はその後4週間を目処に投薬を繰り返し、虫卵の産生を抑える。*C. orientalis* のみの場合は5週間を目処にする。種苗が5 kg程度になるまで投薬を繰り返すと死亡被害の軽減に繋がる。住血吸虫の寄生により、赤潮による死亡被害が拡大する可能性があるため、発生が予想される場合は、1-2週間前に投薬し被害を軽減する。

## 3. 寄生予防法

住血吸虫は養殖漁場に生息する中間宿主のフサゴカイ類を介してマグロに寄生するため、生け簀周辺の間宿主密度を減らせば、寄生の軽減に繋がる。フサゴカイ類はホヤやフジツボなどの付着生物の間隙に棲管を作っている。ロープなどの生け簀構造物上の付着生物とフサゴカイ類を除去すれば、マグロへの寄生予防が可能。物理的な除去の他、亜酸化銅系の生け簀網用防汚剤でもフサゴカイ類の着生を防げる。

## 9. ウオノエ感染症

### 原因病原体

ウオノエ類（2種類、*Ryukyua globosa*と*Norileca triangulate*のそれぞれに近縁の2種）

### 外観症状（全長 10 cm，沖出し後のクロマグロの自然感染例）

ウオノエの仲間がクロマグロの生け簀に混入し、マグロの鰓腔に侵入し、鰓組織に障害を与え、衰弱・死亡の原因となる。



**写真1.** クロマグロの鰓腔でみられたウオノエ(矢印) による食害。鰓蓋を切り落として、撮影した。

# クロマグロにおける マダイイリドウイルス病の防疫対策 Ver. 1

国立研究開発法人 水産研究・教育機構  
水産技術研究所 病理部

本マニュアルは、平成 30 年度～令和 4 年度に実施された農林水産研究の推進委託プロジェクト研究「クロマグロ養殖の人工種苗への転換促進のための早期採卵・人工種苗 育成技術や低環境負荷養殖技術の開発」JPJ007159、及び令和元年度～令和 4 年度に実施された安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業「国内主要養殖魚の重要疾病のリスク管理技術の開発」JPJ008617.19190702 により得られた成果を元に作成されました。

## 1 はじめに

マダイイリドウイルスは 1990 年に西日本の養殖マダイで初めて確認されたイリドウイルス科メガロサイチウイルス属に分類される DNA ウイルスである (Inouye et al. 1992、Kurita and Nakajima, 2012)。国際獣疫事務局 (WOAH) の指定疾病にもなっているウイルス感染症であり、マダイやブリを始め国内外の 30 魚種以上で疾病の発生が報告されている (WOAH, 2021)。WOAH の定義に基づき、本マニュアルではクロマグロで発生するイリドウイルス感染症もマダイイリドウイルス (RSIV) 病と呼ぶ。漁場によって具体的な防疫対策は異なることが想定されるため、本マニュアルではクロマグロで発生する RSIV 病の対策に焦点を当てた総論的な解説をしていく。

## 2 クロマグロにおける RSIV 病

クロマグロで発生する RSIV 病の原因ウイルスは、マダイやブリで発生するウイルスと同じである。つまり、マダイやブリで流行している RSIV がクロマグロにも伝播する。クロマグロはマダイイリドウイルス (RSIV) に対して非常に感受性が高いことが判明している。例えば、マダイやブリでは魚体サイズが 100 g 以上になると、人為感染ではほとんど死亡が見られず、養殖場での被害もそれほど大きくはならない。しかしながら、クロマグロで RSIV 病が発生すると、100 g 以下では全滅に近い被害となり、500 g 前後の当歳魚でも累積死亡率が 8 割近くに達することがある。

## 3 ワクチン

マダイ、ブリ属に対しては不活化ワクチンが市販されており、RSIV 病による死亡を低減させる効果がある。しかしながら、感染試験および養殖場の疫学情報から、これらの市販ワクチンはクロマグロに対して有効性がないことが確認されている。

## 4 感染源

魚体サイズの大きなマダイやブリは RSIV に感染しても死亡しないが、ウイルスを体内に保持・排出する不顕性感染魚となっている。この不顕性感染魚が RSIV 病の感染源である可能性が高く、前年の RSIV 病流行時に不顕性感染魚となって越年した魚から排出されたウイルスが、漁場に新規導入された当歳魚に伝播して RSIV 病のアウトブレイクを引き起こすと考えられる (Kawato et al. 2021)。また、不顕性感染魚から排出されたウイルスが中間育成中の当歳魚に伝播し、他の漁場に種苗として出荷された場合は、この感染種苗が漁場における感染源となる場合もある。

## 5 伝播経路

不顕性感染魚から排出された RSIV が当歳魚へ伝播した場合や感染種苗を導入した場合は、養殖生簀における感染魚の死亡という形で RSIV 病のアウトブレイクが顕在化する。

この当歳魚におけるアウトブレイクが起点となり、漁場内で感染が拡大していく状況がしばしばみられる。このように漁場内で感染が拡大してく際のウイルスの伝播経路は以下のように整理される。

### 5.1 死亡魚

RSIV で死亡したマダイのドリップでは 1mL 中に約 10 億コピー\*、クロマグロの死亡魚では約 100 億コピーのウイルスが存在する。RSIV 病が発生している養殖場においてふき取り調査を実施したところ、想像をはるかに超える大量のウイルスが死亡魚から養殖場内にまき散らされていることがデータとしても確認されている（表 1）。ウイルスは視認できないため気が付きにくい、死亡魚から大量に排出されたウイルスが、漁場内における RSIV 病蔓延の温床となっている可能性がある。

\*コピー：リアルタイム PCR により測定されたウイルスゲノム数の単位でウイルス粒子数と近似して考えることができる。

### 5.2 海水

養殖生簀内や隣接した生簀間では海水による伝播は防ぎようがない。一方、数百メートル離れた養殖生簀間では、海水の希釈により感染リスクが大幅に低減することが判明している。マダイの場合、海水 1 リットルあたり 1000 コピーまでウイルス濃度が低下すると、3 日間連続暴露時の感染リスクが 0.0001% 以下になることが判明している。また、疾病発生生簀から 100 メートル程度離れると、海水中のウイルス濃度が 1000 コピー程度まで低減することも確認されている。つまり、漁場内で RSIV 病が発生したとしても、生簀が隣接していない場合は海水を介して RSIV 病が伝播する可能性は低い。

### 5.3 養殖関連の資機材や作業者の手・長靴

死亡魚の回収に用いたタモ網や死亡魚を入れておく箱など、死亡魚を取り扱う資機材には大量のウイルスが付着している（表 1）。また、海水等の自然環境によってウイルスが拡散するよりも広範囲に長靴裏や手に付着したウイルスが漁場内に拡散していく可能性がデータとして確認されている（表 1）。図 1 には死亡魚から手に付着したウイルスが、海水により伝播する状況と餌を介して経口的に伝播する状況の例を示した。現時点では想像の域を出ないが、死亡魚からの排出されるウイルス量や海水によるウイルスの伝播状況を鑑みると、養殖関連の資機材や作業者を介したウイルスの伝播リスクは比較的高いと考えられる。

### 5.4 漁場内の共同の死亡魚廃棄場

漁協等が管理する共同の死亡魚廃棄場からも RSIV が検出されている（表 1）。図 2 に例を示したように、共同の死亡魚廃棄場がハブとなって各自の養殖場に病原体を持ち帰っている可能性がある。また、消毒等の防疫対策が実施されて

いない海面養殖では、養殖生産者の集まる場所が病原体を交換するハブとなる可能性がある。例えば、病魚が持ち込まれる水産試験場も注意が必要かもしれない。

### 5.5 漁場内の天然魚

天然魚は漁場内を自由に動き回れるため、RSIVの広範囲な伝播に関与している可能性が疑われてきた。しかしながら、養殖環境周辺における天然魚のRSIV感染率や保有するウイルス量は非常に低いことが判明しているため（未公表データ）、天然魚がRSIVの伝播に関与している可能性は低いと考えられる。

## 6 防疫対策

クロマグロの場合は、有効なワクチンが無いこと（予防できない）、疾病が発生すると餌止めによる対処が難しいこと（アウトブレイク時の対処法が無い）、魚の感受性が高いため自然治癒しにくい（アウトブレイク時の被害が大きくなる）ことから、養殖場内あるいは養殖生簀内にウイルスを侵入させない防疫対策の実施が最善策となる。また、クロマグロだけでRSIV病が発生しているという状況はまれであり、他魚種で発生したRSIV病がクロマグロにも伝播してきた例がほとんどである。そのため、「5 伝播経路」で示したウイルスの動きを遮断することによりクロマグロにおけるRSIV病の発生リスクは下げられると考えられる。海水を介して数百メートル離れた場所へRSIVが伝播していく可能性は低いことから、「5.1 死亡魚」、「5.3 養殖関連の資機材や作業者の手・長靴」、および「5.4 漁場内の共同の死亡魚廃棄場」からの伝播を防ぐことを意識した対策が中心となる。また、水温が20℃以下に低下するとクロマグロにおけるRSIV病も自然終息する。そのため、防疫対策により少しでもクロマグロへのRSIVの感染時期を後ろにずらしてやることで、結果的に累積死亡率を低く抑えることもできる。以下に、クロマグロにおける防疫対策のポイントをまとめた。

### 6.1 RSIVの消毒条件

水道水に含まれる残留塩素（0.1-0.2ppm）にはRSIVの消毒効果はないので、水道水による洗浄だけでは器具にウイルスが付着したままとなっている（表1）。アルコール系消毒剤、次亜塩素酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウム等の一般的な市販の消毒剤がRSIVにも有効である（表2）。この消毒条件と「5 伝播経路」で示した情報が、海面養殖において防疫対策を構築するための基本情報となる。なお、海水中では90%以上のRSIVが不活化するのに、20℃および25℃では1週間、30℃では2日間の期間が必要である。

### 6.2 海面養殖における防疫対策

海面養殖ではこれまで消毒等の防疫対策は実施されてこなかったことから、急な体制変更は難しいと考えられる。また、揺れる船上での作業も考慮すると、陸上の養殖施設で実施しているような厳格で恒常的な防疫対策は、労務負担が

大きくなりすぎるためにあまり現実的ではない。そこで、以下に RSIV の伝播経路を考慮した上で、有事と平時で防疫体制に差を設けた例を紹介する。下記の考え方と基本として、養殖場の規模や同一湾内に存在する経営体数、死亡魚の廃棄方法といった状況に応じて、現場に応じた防疫対策を実施する。

### 6.3 有事の防疫対策①（養殖場での RSIV 病発生前）

同一湾内や同一漁協内での RSIV の発生情報があった時点からを有事として、養殖場内のバイオセキュリティレベルを上げる。この時点では、自分の養殖場では RSIV 病が発生していないが、漁場内のどこかにウイルスが存在している状況であり、防疫対策の実施が最も効果を発揮するタイミングである。対策の具体例を以下の①～⑤に示したが、養殖場での RSIV 病発生前には特に①に重点を置く。また、RSIV が養殖生簀に侵入したとしても、アウトブレイク（感染魚の死亡）として顕在化するには数日間のタイムラグがある。その間にも感染魚からウイルスは排出され、他の養殖生簀にも RSIV が伝播し、被害が拡大していると想定される。そのため、②～⑤は、仮に一部の養殖生簀にウイルスが侵入したとしても、養殖場全体への伝播を抑えるという理由で実施を推奨するものである。

- ① 共同の死亡魚廃棄場や複数の養殖業者が集まる場所を利用した後は、可能な限り速やかに手および長靴裏の消毒を実施する。踏込槽による長靴の消毒は、1 秒程度足につけるだけではあまり効果がないこともあるので、数秒間はバシバシと洗うようにする。作業ごと（例えば、死亡魚を扱う場合とそれ以外）に長靴を分ける方が、踏込槽による消毒よりも防疫対策としての効果は高いと言われている。
- ② 1 日の作業後には、手、手袋および長靴裏の消毒を実施する。翌日にウイルスを持ち越さないために実施する。また、作業前に作業者の手を消毒することも、不意に外部から養殖場へのウイルスの持ち込みを防ぐためには有効であると考えられる。
- ③ 死亡魚の回収は死亡数の少ない生簀から回る。可能であれば、
- ④ 餌やりと死亡魚回収のタイミングや作業者をずらす。
- ⑤ 死亡魚回収に用いた器具類（タモ網、回収箱、手袋等）は、1 日の作業終了後に消毒を実施する。養殖生簀単位で消毒するのが理想だが、作業効率を考えると現実的ではないため、③で示したように死亡魚の少ない生簀から巡回することで生簀間の水平感染リスクを可能な限り下げる。

### 6.4 有事の防疫対策②（養殖場での RSIV 病発生後）

不幸にして自分の養殖場で RSIV 病が発生した場合でも、生簀間で死亡数に差がある場合には養殖生簀間の水平伝播を抑えるために、上記①～⑤の対策を継続する。この時は、特に②～⑤の対策が養殖生簀間での水平伝播を抑えるため

に有効となる。しかしながら、全ての生簀で死亡数が増えてきた場合には、防疫対策の実施による被害軽減効果はないため、作業効率を重視した体制に切り替える。ただし、②については、他の養殖場を汚染しないという観点から推奨されるものである。

## 6.5 平時の防疫対策

同一湾内で RSIV 病が発生していない時期を平時として、作業効率を重視しながら上記①～⑤の対策を調整する。ただし、6～11月是不顕性感染魚からのウイルスの排出があることや、例えば RSIV に不顕性感染したマダイがエドワジエラ症で死亡した場合にも、RSIV が死亡魚から出てくる可能性がある。そのため、上記①については RSIV の増殖がほとんど見られない冬季以外は継続して実施することが望ましいと考えられる。

## 7 おわりに

防疫対策にかかる負担は大きく見えるものの、クロマグロにおける RSIV 病は有効な対策がないため、結果的に疾病による大きな損失・労務負担の軽減につながるものである。RSIV の感染経路が明らかになりつつあり、漁場（あるいは湾）単位で厳格な管理ができれば漁場内から RSIV を排除できる可能性も出てきた。しかしながら、死亡魚が正しく処理されない（例えば、死亡魚を養殖生簀外に投棄する等）と想定通りの防疫対策の効果は得られない。ここで紹介した防疫対策について、可能であれば漁場内で意思統一された動きができれば、RSIV 病による被害を最小限に抑えることができると考えられる。

## 8 参考文献

- Inouye K, Yamano K, Maeno Y, Nakajima K, Matsuoka M, Wada Y, Sorimachi M. 1992. Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol* 27:19-27.
- Kawato Y, Mekata T, Inada M, Ito T. 2021. Application of environmental DNA for monitoring red sea bream iridovirus at a fish farm. *Microbiol Spectr* 9:e0079621.
- Kurita J, Nakajima K. 2012. Megalocytiviruses. *Viruses* 4:521-538.
- Matsuura Y, Nishioka T, Satoh J, Shimahara Y, Matsuyama T, Takano T, Kiryu I, Kawato Y, Terashima S, Masuma S, Nakayasu C. 2021. Development of a method for experimental infection of Pacific bluefin tuna with red seabream iridoviral disease. *Aquaculture* 539:736627.
- WOAH (World Organisation for Animal Health). 2021. Red sea bream iridoviral disease. In: *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*. [https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/aahm/current/2.3.07\\_RSIVD.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.3.07_RSIVD.pdf)

RSIVで死亡したマグロの体液には  
1mL中に100億個のウイルスがいる



1 $\mu$ L分のウイルスが手のひらに付着  
(1000万個のウイルス)

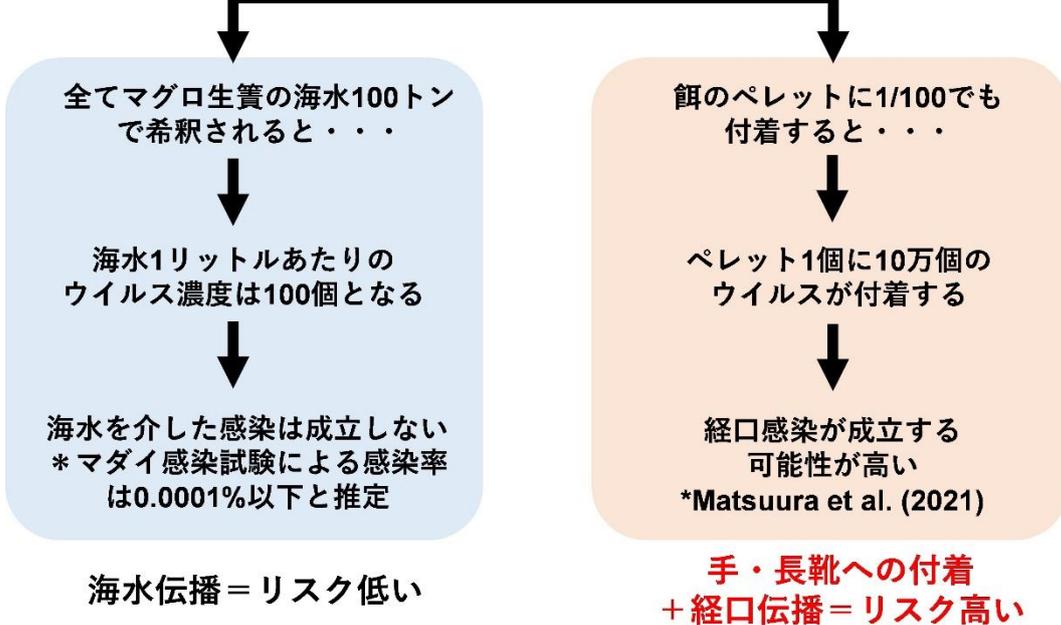
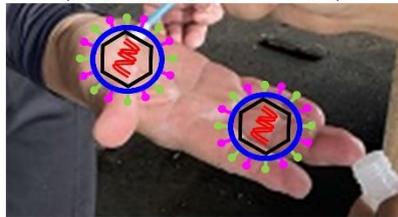


図1. 死亡魚を介したウイルス伝播の例

ここでは、RSIV ゲノム1コピーをウイルス1個と表現した。手や長靴に付着したウイルスも、海水に希釈されると感染源としての脅威にはならないが、餌に混入すると経口的に伝播する可能性が高い。生簀の中で1尾でも感染魚が発生すると、養殖環境下においてはかなり高い確率で生簀内での感染が蔓延していく。

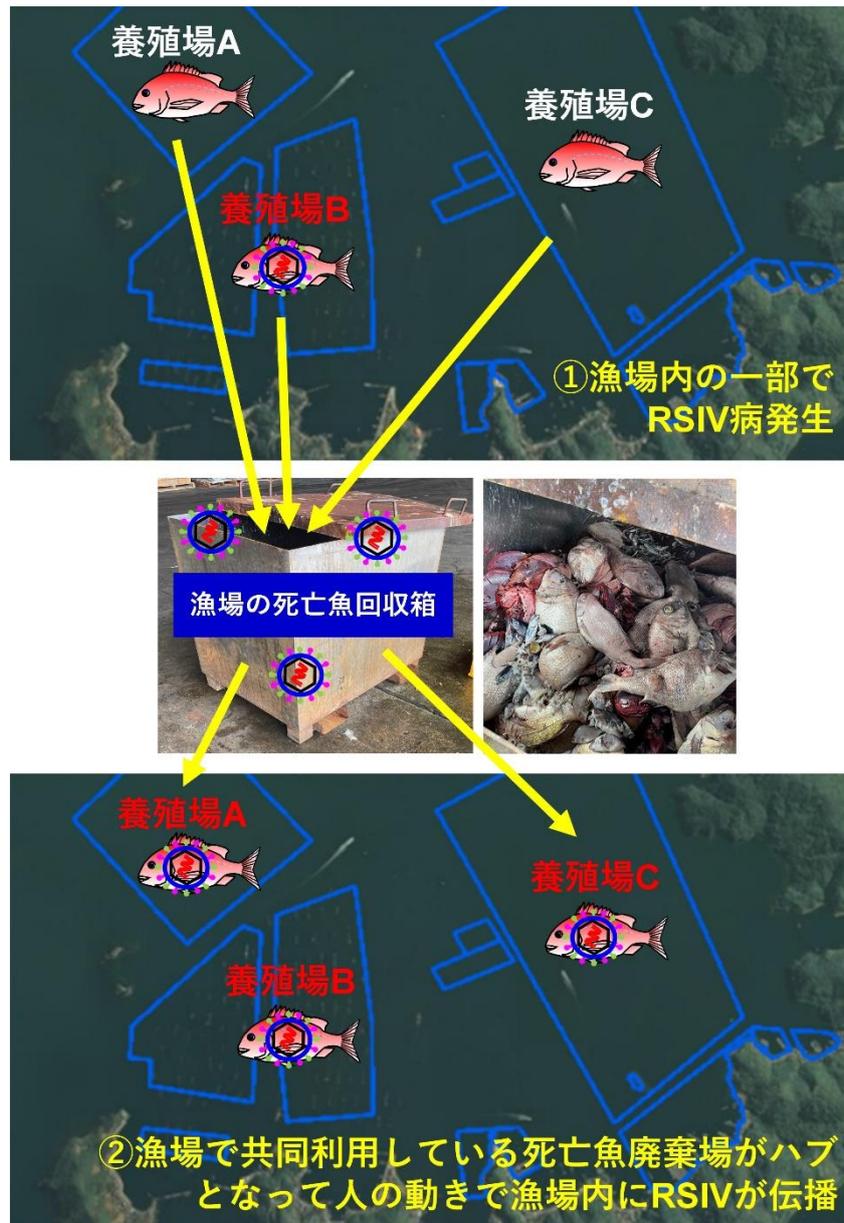


図2. 共同の死亡魚回収箱を起点とした漁場内でのRSIV伝播の模式図

漁協等が管理する共同の死亡魚廃棄場の取っ手や地面からRSIVが検出されている。例えば、養殖場BでRSIV病が発生して、漁場の死亡魚回収箱に感染死亡魚を廃棄すると、その回収箱付近がウイルスで汚染される。一方、養殖場AやCで他の疾病で死亡した魚をこの回収箱に持ち込むと、手や長靴裏にウイルスが付着して各自の養殖場にウイルスを持ち帰る可能性がある。つまり、漁場で共同利用している死亡魚の廃棄場がハブとなり、人の動きに起因して海水による伝播の範囲外にある養殖場にもRSIVが伝播している可能性がある。消毒等の防疫対策が実施されていない海面養殖では、養殖生産者が集まる場所が病原体を交換するハブとなる可能性がある。

表 1. RSIV 病発生中の養殖場におけるふき取り調査の結果

No.	区分	場所	ふき取り範囲	RSIV コピー数/ ふき取り範囲全体	コメント
1	死亡魚回収	死亡魚回収船：甲板 作業前	10cm×10cm	1.0E+04	前日作業した際に残っていたウイルス
2	死亡魚回収	死亡魚回収船：甲板 作業後	10cm×10cm	4.2E+05	死亡魚の体液から流出したウイルス
3	死亡魚回収	死亡魚回収船：たも網持ち手 作業前	5cm×20cm	4.0E+04	前日作業した際に残っていたウイルス
4	死亡魚回収	死亡魚回収船：たも網持ち手 作業後	5cm×20cm	5.4E+05	作業後にはウイルスの付着量が増える
5	死亡魚回収	ダイバーA手袋 作業前	右掌全体	<1.0E+03	
6	死亡魚回収	ダイバーA手袋 作業後	右掌全体	6.0E+04	作業後にはウイルスの付着量が増える
7	死亡魚回収	ダイバーB手袋 作業前	右掌全体	1.7E+03	
8	死亡魚回収	ダイバーB手袋 作業後	右掌全体	6.8E+05	作業後にはウイルスの付着量が増える
9	死亡魚回収	船の死亡魚回収箱 作業前	10cm×10cm	<1.0E+03	
10	死亡魚回収	船の死亡魚回収箱 作業終了後	10cm×10cm	2.2E+08	死亡魚の体液から流出したウイルス
11	死亡魚回収	船の死亡魚回収箱 水道水洗浄後	10cm×10cm	3.2E+05	水道水洗浄後もウイルスは付着
12	死亡魚回収	漁協の死亡魚回収箱 付近の地面	10cm×10cm	<1.0E+03	
13	死亡魚回収	漁協の死亡魚回収箱 取っ手	取っ手全体	3.9E+04	手で触るところにはウイルスが残る
14	死亡魚回収	漁協の死亡魚回収箱 水道付近の地面 1	10cm×10cm	5.9E+03	
15	死亡魚回収	漁協の死亡魚回収箱 水道付近の地面 2	10cm×10cm	<1.0E+03	
16	死亡魚回収	漁協の死亡魚回収箱 水道蛇口	取っ手全体	3.8E+03	手で触るところにはウイルスが残る
18	作業船	船着き場の地面	10cm×10cm	1.1E+03	
19	作業船	作業船 2：スロットル	ハンドル全体	3.4E+04	手で触るところにはウイルスが残る
20	作業船	作業船 2：前甲板	10cm×10cm	2.0E+04	この船で死亡魚を回収することもある
21	作業船	作業船 2：たも網持ち手	5cm×20cm	1.1E+04	手で触るところにはウイルスが残る
22	作業船	作業船 3：スロットル	ハンドル全体	6.4E+03	手で触るところにはウイルスが残る
23	作業船	作業船 3：前甲板	10cm×10cm	<1.0E+03	
24	作業船	作業船 3：たも網持ち手	5cm×20cm	<1.0E+03	
25	施設	作業員詰所入り口の地面	10cm×10cm	6.3E+03	
26	施設	作業員詰所のドアノブ	ドアノブ全体	<1.0E+03	
27	施設	長靴置き場 地面	10cm×10cm	3.0E+03	
28	施設	死亡魚回収船以外の作業員長靴裏 1	右足裏面全体	3.5E+04	長靴裏にもウイルスが付着
29	施設	死亡魚回収船以外の作業員長靴裏 2	右足裏面全体	2.2E+05	長靴裏にもウイルスが付着
30	施設	養殖場門の地面	10cm×10cm	<1.0E+03	
31	施設	餌保管庫 1 取っ手	ドアノブ全体	<1.0E+03	
32	施設	餌保管庫 1 床	10cm×10cm	<1.0E+03	
33	施設	餌保管庫 2 取っ手	全体	<1.0E+03	
34	施設	餌保管庫 2 床	10cm×10cm	<1.0E+03	
35	施設	フォークリフトハンドル	ハンドル全体	2.4E+03	手で触るところにはウイルスが残る
36	施設	フォークリフトツメ	10cm×10cm	<1.0E+03	
37	施設	フォークリフトタイヤ	10cm×10cm	<1.0E+03	
38	その他	検査者 1 の作業後の手	右掌全体	4.4E+05	検査者の手にもウイルスが付着
39	その他	検査者 1 の長靴 作業前	右足裏面全体	<1.0E+03	
40	その他	検査者 2 の長靴 作業前	右足裏面全体	<1.0E+03	
41	その他	検査者 1 の長靴 作業後	右足裏面全体	1.5E+05	検査者の長靴にもウイルスが付着
42	その他	検査者 2 の長靴 作業後	右足裏面全体	4.0E+03	検査者の長靴にもウイルスが付着

表 2. RSIV の消毒例

消毒剤	用途・注意点 *使用例
エタノール	<p>手や器具の消毒。市販のアルコール系消毒剤が半分ぐらいの濃度にまで希釈されると効果がなくなるため、濡れた手や器具の消毒は注意が必要。</p> <p>*市販のエタノール系消毒剤をそのまま使用する。あるいは、エタノールを水道水で 70%程度に希釈する。</p>
次亜塩素酸ナトリウム	<p>器具の消毒。有機物存在下で消毒効果が減衰するが、200ppm 以上あればある程度の有機物存在下でも消毒効果がある。日光照射等により自然に減衰していくため、数日間で消毒液を交換する必要がある。廃液はハイポで中和する。木製・金属製のものに使用した場合には、消毒後にすぐに水道水で洗う。酸性の物質を混ぜると有毒な塩素ガスが発生するので注意が必要。</p> <p>*200ppm の消毒液を調整する場合には、水道水 1L に対して市販の食品添加用次亜塩素酸ナトリウム水溶液（12%）を 2mL 添加する。市販の漂白剤も代用できるが、次亜塩素酸ナトリウムの濃度が異なるため調整が必要。原液を希釈する際には、換気の良い場所で保護メガネ・手袋を使用する。</p>
塩化ベンザルコニウム (逆性石けん液)	<p>手や器具の消毒。ある程度の有機物存在下でも有効。調整後の消毒液の効果が 1 週間程度は持続するため、長靴の踏込槽等で使用しやすい。なお、RSIV に対しては消毒効果があるが、エンベロープのないウイルス（海産魚ではウイルス性神経壊死症の原因ウイルス NNV、ブリの腹水症 YAV 等）には効果がない。</p> <p>*水道水 1L に対して、市販の逆性石けん（塩化ベンザルコニウム 10%）を 10mL 添加する（0.1%溶液）。</p>

## 鉄凝集法による海水中のウイルス濃縮

海水中には多様なウイルスが存在するが、それぞれの密度は低く、海水から直接核酸を精製しても検出は困難である。鉄凝集法を利用したウイルス濃縮法は、特殊な装置を必要とせず簡便な手法である。ウイルスの表面はマイナスに帯電しているため、プラスに帯電した鉄イオンを加えることでコロイド化し、ウイルスよりも大きなポアサイズのフィルターでろ過することで、目詰まりさせずにフィルター上に捕捉することができる。以下に簡単に手法を示す。詳細は参考文献を参照されたい。

### 1. 鉄凝集法

試薬：「Fe 濃縮液」

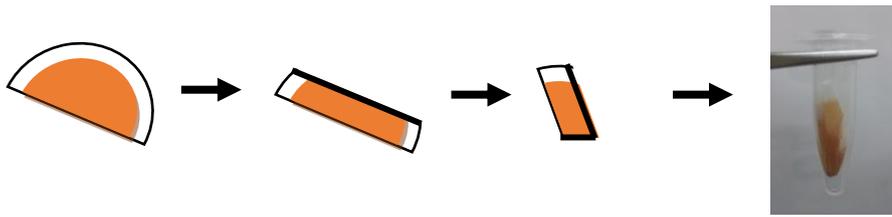
\*4.83g の  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  を DW で 100mL にメスアップして良く溶かす。

\*Fe の終濃度は 10 mg/mL になる。

\*常温・遮光保存で約半年間は使えます。

<方法>

- ① ペットボトル等で送付されてきた海水 500mL を試薬瓶に移す。
  - \*試薬瓶の目盛りで構いません。
  - \*鉄凝集前に特にろ過は必要ありませんが、夏場に珪藻等が大量発生している時には 0.8 $\mu\text{m}$  フィルター（メルクミリポア ATTP04700、アドバンテック K080A047A を推奨）でプレろ過をした方がいいです。
- ② 海水 500mL に「Fe 濃縮液」を 50  $\mu\text{L}$  加えてよく攪拌する。
  - \*Fe の終濃度は 1 mg/L になる。
- ③ スターラーを用いて 1 時間、緩やかに攪拌する。  
(攪拌時間 30 分～6 時間まで検出感度同等。反応 5 分や 16 時間では低下する)
  - \*この時、茶色、又は、無色の小さなコロイド粒子が観察される。
- ④ ポリカーボネート製フィルター（0.8  $\mu\text{m}$ ）を用いて吸引濾過を行う。
  - \*0.8 $\mu\text{m}$  フィルター（メルクミリポア ATTP04700、アドバンテック K080A047A を推奨）
  - \*500 mL につき 1 枚のフィルターを用いて濾過する。それ以上の液量だと目が詰まって濾過できないことが多い。
  - \*濾過後のフィルターは茶色になる。これは、鉄凝集の成功の目安となる。
- ⑤ 鉄凝集後のフィルターを折りたたんで 1.5 mL チューブに入れる。
  - \*フィルターに凝集塊が乗っている面を内側に折り込みます。
  - \*この状態で凍結保存可能（-80 $^{\circ}\text{C}$ ）。



- ⑥ DNA の場合は DNeasy Blood & Tissue kit (キアゲン) あるいは QIAamp DNA Mini Kit (キアゲン) など、RNA の場合は Trizole 等を用いて核酸を精製する。

#### 参考文献

John, Seth G., et al. "A simple and efficient method for concentration of ocean viruses by chemical flocculation." *Environmental microbiology reports* 3.2 (2011): 195-202.

Kawato, Yasuhiko, et al. "Development of red sea bream iridovirus concentration method in seawater by iron flocculation." *Aquaculture* 450 (2016): 308-312.

Kawato, Yasuhiko, et al. "Application of environmental DNA for monitoring Red Sea bream Iridovirus at a fish farm." *Microbiology Spectrum* 9.2 (2021): e00796-21.