

栽培漁業技術シリーズ

# ヒラメ VNN 防除に関する これまでの取り組み



## ヒラメ VNN 防除に関するこれまでの取り組みの刊行にあたって

ウイルス性神経壊死症 (viral nervous necrosis: VNN), 1990年に初めてイシダイで発生が報告されて以来, 国内外における海産魚の種苗生産および育成過程で世界的に大きな問題となっている。

本病の感染経路については, シマアジでは, 親魚からの垂直感染が主要な感染経路であることが明らかにされ, 親魚生殖腺におけるウイルス保有の有無を調べ, 陰性親魚だけを産卵に用いることにより発生率を低下させることに成功している。しかしながら, シマアジ以外の魚種においては, 稚魚や成魚に成長した段階においても感染死亡が認められ, 特にヒラメやハタ類では, 種苗取り上げ後の後期育成過程でも本病が発生している。これらの魚種での感染経路については不明な点が多く, 殆どの場合, 十分な防除対策を確立するに至っていない。

本書では, 1995年に旧日本栽培漁業協会宮古事業場 (現水産総合研究センター宮古栽培漁業センター) のヒラメ種苗において初めて発生したVNNに対し, 原因ウイルスの検出方法や診断方法の改良, またこれらの手法の防除対策への応用など幾つかの重要なアプローチがなされており, この取り組みが今後, ヒラメのみならず多くの魚種におけるVNN防除対策の確立に参考になるものと考え, ヒラメVNN防除対策に関するこれまでの技術開発成果を取りまとめた。

本書の第1章では, ウイルス性神経壊死症についてこれまでの研究等を紹介し, 第2章宮古栽培漁業センターにおけるヒラメVNNの発生状況を報告すると共に, 第3章では, 疫学調査, 診断方法や卵消毒方法の開発, それを踏まえた生産現場での本病防除対策について報告する。

本書が今後のVNN防除ならびに健全な種苗生産への研究・技術開発を担う新しい担当者達の参考となれば幸いである。

平成20年3月

独立行政法人水産総合研究センター

理事長 川口 恭一

## ヒラメ VNN 防除に関するこれまでの取り組み

### 原稿執筆者一覧

#### 執筆者

所 属	役 職	氏 名
瀬戸内海区水産研究所 栽培資源部 (前宮古栽培漁業センター)	研究開発員	太 田 健 吾
同 上 (前宮古栽培漁業センター)	研究開発員	山 田 徹 生
養殖研究所 病害防除部 (前上浦栽培漁業センター)	主任研究開発員	森 広一郎

#### 取り纏め

養殖研究所 病害防除部 (前上浦栽培漁業センター)	主任研究開発員	森 広一郎
------------------------------	---------	-------

#### 指導・助言

養殖研究所 栽培技術開発センター	センター長	虫 明 敬 一
------------------	-------	---------

## ～ 目 次 ～

I	ウイルス性神経壊死症について	1	4	宮古栽培漁業センターにおける ヒラメのVNN防除対策	32
1-1	疾病発生の背景と国内外での発生状況	1	4-1	親魚養成におけるVNN防除対策	32
1-2	本病の症状	1	1)	親魚の養成用餌料	32
1-3	原因ウイルスの性状と分類	1	2)	親魚餌料の調餌作業	32
1-4	診断方法	6	3)	親魚の飼育管理の改善	32
1-5	感染経路と防除対策	7	4)	PCR法による親魚選別	33
II	宮古栽培漁業センターにおける ヒラメVNNの発生状況	9	5)	採卵時期	33
1	親魚養成と採卵状況	9	6)	採卵結果	36
1-1	親魚養成	9	7)	受精卵の洗浄	37
1-2	採卵	9	8)	卵およびふ化仔魚の管理	37
2	種苗生産と後期育成状況	9	9)	まとめ	37
2-1	種苗生産	9	4-2	種苗生産過程における対策	39
2-2	後期育成	11	1)	飼育水槽等の洗浄	39
3	種苗生産結果とVNNの発生	12	2)	飼育用水の殺菌	39
4	宮古で発生したヒラメVNNの 原因ウイルスの性状	13	3)	飼育担当者の施設への進入方法	40
4-1	PCR法による診断	13	4)	飼育に使用する器具、 道具および長靴の殺菌・洗浄	40
4-2	H&E染色および蛍光抗体法による 病理組織の観察	14	5)	底掃除で吸い出された仔稚魚の 取り扱いと器具類の規制	44
4-3	電子顕微鏡観察	15	6)	生産種苗のVNN検査	44
4-4	原因ウイルスの遺伝子型と血清型	15	7)	種苗生産結果	44
4-5	原因ウイルスの病原性	15	4-3	後期育成過程における対策	46
4-6	他機関におけるヒラメのVNN発生状況	15	1)	取り上げと後期育成	46
5	まとめ	17	2)	種苗輸送用トラックの洗浄	46
III	ヒラメのVNN防除技術	19	3)	外来者の規制	46
1	診断技術	19	4-4	まとめ	47
1-1	PCR法を用いた診断手法	19	IV	今後の技術開発について	50
2	ヒラメにおけるVNNの感染経路の探査	21	1	親魚養成技術開発に関わる課題	50
2-1	ヒラメ天然魚のNNV保有状況の調査	21	2	種苗生産技術開発に関わる課題	50
2-2	親魚餌料のNNV保有調査	23	3	総括	50
3	受精卵の消毒方法	24	V	引用文献	53
3-1	試験方法	25	VI	添付マニュアル	58
3-2	試験結果	27			
3-3	まとめ	27			

# I ウイルス性神経壊死症について

## はじめに

ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) は、海産魚の栽培漁業対象種の中でも最も放流尾数が多く、現在では年間約2.5千万尾の種苗が全国2千ヶ所近い場所で放流されており、栽培漁業において最も重要な魚種と言える(平成17年度栽培漁業種苗生産, 入手・放流実績)。またヒラメは養殖業においても、収穫量で5千万トン、生産額にすると約70億円と海面魚類養殖業では収穫量、生産額ともに第4位の規模をほこる重要な対象種である(農林水産省, 農林水産統計)。

これらヒラメの栽培漁業および養殖業の発展の礎となった種苗生産に関する研究開発は、1965年に近畿大学水産研究所において人工ふ化仔魚の飼育に成功したことにはじまり、その後多くの機関で研究開発が成されヒラメの人工種苗の大量生産が可能になった(青海, 1986)。独立行政法人水産総合研究センター宮古栽培漁業センター(旧日本栽培漁業協会宮古事業場; 以下宮古センターと記す)では、1980年からヒラメの種苗生産を開始し、1987年以降は飼育技術の急速な発展によって、年間200万尾の全長20~30mmのヒラメ種苗を安定生産することが可能になった。

しかしながら、1995年の種苗生産過程において一部の飼育例で浮遊期の仔魚にウイルス性神経壊死症(Viral nervous necrosis: VNN)が発生した。そこでまず本章では、ウイルス性神経壊死症と当該疾病に関するこれまでの研究成果について概要を紹介する。

## 1-1 疾病発生の背景と国内外での発生状況

ウイルス性神経壊死症は、主に海産魚の種苗生産過程に発生するウイルス性疾病で、Yoshikosh and Inoue (1990)によってイシダイ仔稚魚で初めて報告され、その中枢神経系にみられる主病変からウイルス性神経壊死症と名付けられた。その後、キジハタ(Mori *et al.*, 1991)やシマアジ(Mori *et al.*, 1992; 有元ら, 1994)などでもVNNが発生し、いずれの魚種において種苗生産過程の仔稚魚期において発生し、高い死亡率による大きな被害をもたらしている。また諸外国においてもVNNに類似した疾病(encephalomyelitisあるいはvacuolating encephalopathy and retinopathy (VER)などと呼ばれる)がオーストラリア、タヒチヤインドネシア、フィリピン、マレーシアおよびシンガポールといったオセアニア、東南アジアなどのパラマンデ

イ (Glazebrook *et al.*, 1990; Renault *et al.*, 1991; Munday *et al.*, 1992)、ノルウェーのターボット (Bloch *et al.*, 1991)、フランスのヨーロッパズキ (Breuil *et al.*, 1991)、シンガポールのヒトミハタ (Chua *et al.*, 1995)、およびタイのチャイロマルハタ (Danayadol *et al.*, 1995)など国内外問わず数多くの魚類で同様の被害が報告されている (Munday *et al.*, 2002; 表I-1)。

## 1-2 本病の症状

本疾病はいずれも主として仔稚魚期に発生し、外見的には殆ど症状は認められないが、病魚は旋回あるいは回転等の異常遊泳を示す。マハタなどの一部の魚種においては、鰓の異常膨満による横転、転覆といった症状も認められる (Fukuda *et al.* 1996)。また組織学的には、中枢神経系および網膜の神経細胞の壊死崩壊に伴う大型の空胞形成を特徴とし、壊死細胞および周辺細胞の細胞質中に小型で球形のウイルス粒子が高密度に観察される(写真I-1A~C)。ウイルス粒子の大きさは25nm前後で22~34nmと記載によりやや異なる (Munday *et al.*, 2002)。

## 1-3 原因ウイルスの性状と分類

本病が発生した当初は、前述のウイルスを分離培養する培養細胞が開発されていなかったことから、シマアジの感染死亡魚から分画遠心法や密度勾配遠心法などにより、ウイルスが濃縮・純化されたことにより、初めてウイルスの性状が明らかにされた (Mori *et al.* 1992)。即ち、本ウイルス性状は、エンベロープを持たず、ウイルスの構造タンパク質は、分子量42kおよび40kの2つから成り、ウイルスの核酸は、1本鎖のRNAで、分子量約 $1.01 \times 10^6$  (RNA1)と $0.49 \times 10^6$  (RNA2)の2分節のRNA分子(2分節ゲノム:bipartite genome)を有し、これらのRNAは、3'末端にポリ(A)鎖をもたないメッセンジャー活性を有するプラスセンスのRNAであり、RNA1は分子量約100kのタンパク質であるRNA依存RNAポリメラーゼを、またRNA2は42kと40kのタンパク質である外被タンパク質をコードしていることが報告されている(表I-2)。

これらの特徴から、第5回国際ウイルス命名委員会(ICTV)の報告 (Francki *et al.*, 1991)に従い、ノダウイルス科(*Nodaviridae*)に分類された。それまでノダウイルス科のウイルスは昆虫からのみ見いだされており (Longworth, 1978; Kaesberg, 1989)、魚類からの報告はなかったことから、本ウイルスは未報告の新しいウイ

表 I-1 国内外における魚種別のウイルス性神経壊死症の発生報告 (その1)

目/科	魚種名(学名)	発生国	報告
<b>ウナギ目</b>			
ウナギ科	ヨーロッパウナギ ( <i>Anguilla anguilla</i> )	台湾	Chi <i>et al.</i> , 2001
<b>タラ目</b>			
タラ科	大西洋タラ ( <i>Gadus morhua</i> )	英国 カナダ ノルウェー	Starkey <i>et al.</i> , 2001 Johnson <i>et al.</i> , 2001 Samuelsen <i>et al.</i> , 2002
<b>カレイ目</b>			
カレイ科	マツカワ ( <i>Verasper moseri</i> )	日本	Watanabe <i>et al.</i> , 1998
	ハリバット ( <i>Hippoglossus hippoglossus</i> )	ノルウェー スコットランド	Grotmol <i>et al.</i> , 1995 Starkey <i>et al.</i> , 2000
ヒラメ科	ヒラメ ( <i>Paralichthys olivaceus</i> )	日本	Nguyen <i>et al.</i> , 1994
スコプタルムス科	ターボット ( <i>Scophthalmus maximus</i> )	ノルウェー	Bloch <i>et al.</i> , 1991 Johansen <i>et al.</i> , 2004
ササウシノシタ科	ドーバーソール ( <i>Solea solea</i> )	英国	Starkey <i>et al.</i> , 2001
<b>フグ目</b>			
フグ科	トラフグ ( <i>Takifugu rubripes</i> )	日本	Nakai <i>et al.</i> , 1994
<b>トウゴロウイワシ目</b>			
カダヤシ科	グッピー ( <i>Poecilia reticulata</i> )	シンガポール	Hedge <i>et al.</i> , 2003
<b>スズキ目</b>			
ハタ科	キジハタ ( <i>Epinephelus akaara</i> )	日本 台湾 中国	Mori <i>et al.</i> , 1991 Chi <i>et al.</i> , 1997 Lin <i>et al.</i> , 2001
	アオハタ ( <i>E. awoara</i> )	台湾	Lai <i>et al.</i> , 2001
	アカマダラハタ ( <i>E. fuscogutatus</i> )	台湾	Lai <i>et al.</i> , 2001
	ヤイトハタ ( <i>E. malabaricus</i> )	タイ	Danayadol <i>et al.</i> , 1995
	ダスキーグルーパー ( <i>E. marginatus</i> )	地中海	Le Breton <i>et al.</i> , 1997
	クエ ( <i>E. bruneus</i> )	日本	Nakai <i>et al.</i> , 1994
	マハタ ( <i>E. septemfasciatus</i> )	日本 韓国	Fukuda <i>et al.</i> , 1996 Sohn and Park, 1998
	ヒトミハタ ( <i>E. tauvina</i> )	マレーシア フィリピン シンガポール	Bondad <i>et al.</i> , 2000 Chua <i>et al.</i> , 1995 Hedge <i>et al.</i> , 2002
	チャイロマルハタ ( <i>E. coioides</i> )	中国 フィリピン	Lin <i>et al.</i> , 2001 Maeno <i>et al.</i> , 2002
	ホワイグルーパー ( <i>E. aeneus</i> )	イスラエル	Ucko <i>et al.</i> , 2004
	サラサハタ ( <i>Cromileptes altivelis</i> )	インドネシア	Zafran <i>et al.</i> , 2000
アジ科	シマアジ ( <i>Pseudocaranx dentex</i> )	日本	Mori <i>et al.</i> , 1992
	カンパチ ( <i>Seriola dumerili</i> )	日本	Muroga <i>et al.</i> , 1995
	マルコバン ( <i>Trachinotus blochii</i> )	台湾	Chi <i>et al.</i> , 2001
タイ科	ヨーロッパヘダイ ( <i>Sparus aurata</i> )	イタリア	Dalla <i>et al.</i> , 2000

表 I-1 国内外における魚種別のウイルス性神経壊死症の発生報告 (その2)

目/科	魚種名(学名)	発生国	報告
スズキ目			
ニベ科	レッドドラム( <i>Sciaenops ocellatus</i> )	韓国	Oh <i>et al.</i> , 2002
		イスラエル	Ucko <i>et al.</i> , 2004
	イシモチ( <i>Umbrina cirrosa</i> )	フランス	Comps <i>et al.</i> , 1996
		イタリア	Bovo <i>et al.</i> , 1999
	ホワイトシーバス( <i>Atractoscion nobilis</i> )	米国	Curtis <i>et al.</i> , 2001
イシダイ科	イシダイ( <i>Oplegnathus fasciatus</i> )	日本	Yoshikoshi and Inoue, 1990
	イシガキダイ( <i>O. punctatus</i> )	日本	Iwamoto <i>et al.</i> , 1999
スギ科	スギ( <i>Rachycentron canadum</i> )	台湾	Chi <i>et al.</i> , 2001
スズキ科	ヨーロッパスズキ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	カリブ海,	Bellance and Gallet, 1998
		フランス	Breuil <i>et al.</i> , 1991
		イタリア	Bovo <i>et al.</i> , 1999
		マルタ	Skliris <i>et al.</i> , 2001
		ポルトガル	
		スペイン	
		ギリシャ	Athanassopoulou <i>et al.</i> , 2003
		イスラエル	Ucko <i>et al.</i> , 2004
	スズキ( <i>Lateolabrax japonicus</i> )	日本	Jung <i>et al.</i> , 1996
アカメ科	バラマンディー( <i>Lates calcarifer</i> )	オーストラリア	Glazebrook <i>et al.</i> , 1990
		タヒチ	Renault <i>et al.</i> , 1991
		タイ	Glazebrook <i>et al.</i> , 1990
		マレーシア,	Zafran <i>et al.</i> , 1998
		インドネシア	
		シンガポール	Chang <i>et al.</i> , 2001
		イスラエル	Ucko <i>et al.</i> , 2004
フエダイ科	ヨコフエダイ( <i>Lutjanus erythropterus</i> )	台湾	Chi <i>et al.</i> , 2003
ボラ科	ボラ( <i>Mugil cephalus</i> )	イスラエル	Ucko <i>et al.</i> , 2004
ナマズ目			
ナマズ科	ナマズ( <i>Parasilurus asotus</i> )	台湾	Chi <i>et al.</i> , 2003
チョウザメ目			
チョウザメ科	ロシアチョウザメ( <i>Acipenser gueldenstaedtii</i> )	ギリシャ	Athanassopoulou <i>et al.</i> , 2004

Munday *et al.*, (2002)を改変

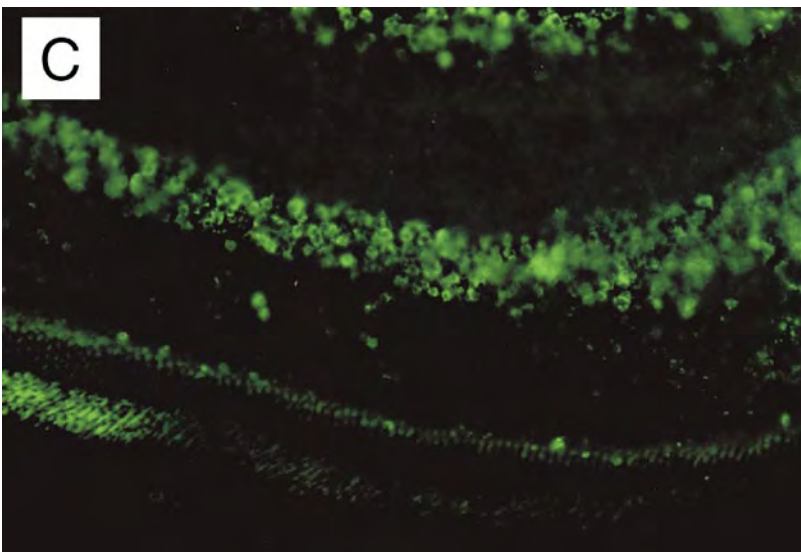
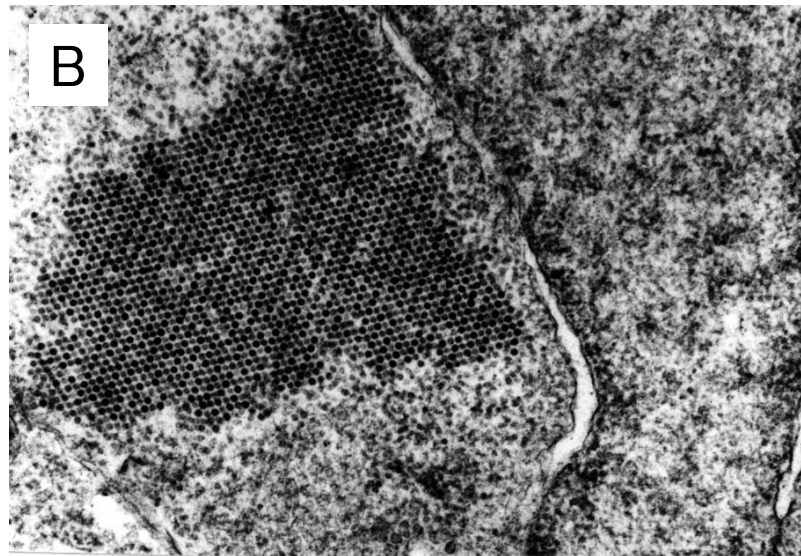
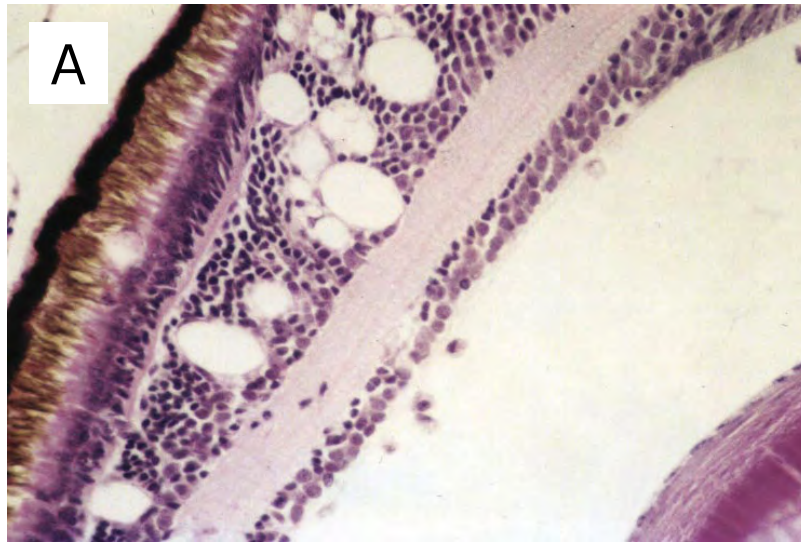


写真 I-1 ウイルス性神経壊死症に感染した病魚の病理組織  
 A：眼球の網膜に認められる神経細胞の壊死と空胞（H&E 染色）  
 B：細胞質内に結晶状に配列した原因ウイルス（直径は約 25nm）  
 C：蛍光抗体法（FAT）によって眼球の網膜に認められるウイルス感染細胞（緑色の蛍光部分）



表 I-2 ウイルス性神経壊死症原因ウイルスの性状

形状	球形 (エンベロープなし)
大きさ(直径)	約25nm
構造タンパク質	42kDa, 40kDa
核酸	<ul style="list-style-type: none"> <li>一本鎖RNA (2分節)</li> <li>1.01MDa(RNA1), 0.49MDa(RNA2)</li> <li>RNA1: 外被タンパク質をコード</li> <li>RNA2: RNA依存RNA合成酵素をコード</li> <li>3'末端にポリA鎖を保有しない</li> </ul>
分類	ノダウイルス科 (Nodaviridae) ベータノダウイルス属 (Betanodavirus) 基準種: SJNNV (striped jack nervous necrosis virus)

(Mori *et al.*, 1992; Schneemann *et al.*, 2005)

表 I-3 ウイルス性神経壊死症原因ウイルスの遺伝子型と感染宿主

遺伝子型	血清型	代表株	感染宿主	培養細胞中での至適増殖温度
SJNNV タイプ	A	SJNNV	シマアジ	20~25°C
TPNNV タイプ	B	TPNNV	トラフグ	20°C
BFNNV タイプ	C	BFNNV	マツカワ, ハリバット, ヒラメなど	15~20°C
RGNNV タイプ	C	RGNNV	ハタ類, ヨーロッパスズキ, スズキなど	25~30°C

(Nishizawa *et al.*, 1997; Mori *et al.*, 2003; Iwamoto *et al.*, 2000)

ルスと考えられ、シマアジ神経壊死症ウイルス (striped jack nervous necrosis virus: SJNNV) と命名された。なお、現在の第8回国際ウイルス命名委員会の報告 (Schneemann *et al.*, 2005) では、昆虫を宿主とするものをアルファノダウイルス属 (Alphanodavirus)、魚類を宿主とするノダウイルス科のウイルスをベータノダウイルス属 (Betanodavirus) に細分されている。本ウイルスの呼名については、単に神経壊死症ウイルス (NNV) あるいは、これに魚種名を合わせたもの (例えばシマアジの神経壊死症ウイルス: SJNNV) が使われているが、統一された表記方法は示されていない。以下本書では、本病原ウイルスをNNVと称する。

またベータノダウイルス属内では、外被タンパク質遺伝子 (RNA2) の塩基配列の遺伝学的相同性により、シマアジのSJNNVに代表されるSJNNVタイプ、トラフグのtiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV) に代表されるTPNNVタイプ、マツカワのbarfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV) に代表されるBFNNVタイプおよびキジハタのredspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) に代表されるRGNNVタイプの4つの遺伝子型に大別されることが報告されている (Nishizawa *et al.* 1997; 表 I-3)。

これらの遺伝子型のウイルスが感染する宿主は、論文報告されているものでSJNNVタイプとTPNNVタイプではそれぞれ、シマアジとトラフグのみで、BFNNVタイプは、マツカワ、ハリバット、大西洋タラなど、RGNNVタイプは、イシダイ、イシガキダイ、ハタ類、ヒラメ、スズキなどがある。また論文報告されていないものの、(独)水産総合研究センターの栽培漁業センター (旧 (社) 日本栽培漁業協会) の行った国内の種苗期疾病情報の取りまとめにおいては、SJNNVタイプでは、マコガレイ、マダイ、ヒラメで、BFNNVタイプでは、マダラ、ヒラメで、RGNNVでは、マゴチ、クロマグロ、マダイ、オオニベでも感染が報告されている (表 I-4)。

また、本ウイルスの血清型については、各遺伝子型のウイルス株で作製した抗ウイルス血清を用いた中和試験により、遺伝子型で構成される3つの血清型 (A, BおよびC) に分けられることが明らかにされた (Mori *et al.* 2003; 表 I-3)。即ち遺伝子型がSJNNVタイプのウイルス株は血清型A、TPNNVタイプは血清型B、RGNNVおよびBFNNVタイプは血清型Cであった。一般に血清型は、ウイルスの宿主特異性を反映している可能性が高く、同一の血清型となったRGNNVおよび

表 I -4 国内のウイルス性神経壊死症発生状況

魚種	年次別発生件数							合計	原因ウイルスの 遺伝子型
	1996年	1999年	1998年	1999年	2000年	2001年	2002年		
ヒラメ	4	1	2	1		1	3	12	SJNNV, RGNNV, BFNNV
イシガキダイ	1							1	RGNNV
マゴチ	2							2	不明
マダラ	1	1	1	1				4	BFNNV
ムシガレイ	1							1	不明
マガレイ	1							1	不明
マツカワ	1							1	BFNNV
オオニベ						1	1	2	RGNNV
シマアジ	4		1		2	1		8	SJNNV
スズキ		1						1	RGNNV
マダイ							1	1	RGNNV
クエ	1	1	2	1	2	1	2	10	RGNNV
マハタ		2	2	1	1	1	1	8	RGNNV
キジハタ	1	1	1				1	4	RGNNV
クロマグロ						1	1	2	RGNNV

(平成8年から平成14年; 種苗期疾病情報まとめ)

BFNNV タイプの遺伝子型のウイルスは、共通の宿主に被害を及ぼす可能性が強く示唆される。

また、ウイルスの至適増殖温度が培養細胞を用い調べられ、RGNNV タイプのウイルスでは25～30℃、SJNNV タイプのウイルスでは20～25℃、TPNNV タイプのウイルスでは20℃、BFNNV タイプのウイルスでは15～20℃でよく増殖し、4つの遺伝子型のウイルス株において至適増殖温度が大きく異なることが確認されている (Iwamoto *et al.*, 2000; 表 I -3)。これらの遺伝子型毎の増殖温度の違いは、遺伝子型毎の対象となる被害魚種の育成水温、即ち疾病発生水温の偏りともよく一致しており、至適増殖温度が高いRGNNVタイプの被害魚種は暖水性、至適増殖温度が低いBFNNVタイプでは冷水性の魚種が多く認められる。

#### 1-4 診断方法

VNNの診断方法を表 I -5 にまとめた。本病の診断方法は、組織切片を作製し、本病の特徴である神経組織の壊死やそれに伴う空胞形成の確認、あるいは電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察以外に、免疫学的手法として抗SJNNV ウサギ血清を用いたELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) による病魚あるいは親魚生殖腺サンプルからのウイルスタンパク質の検出 (Arimoto *et al.*, 1992)、同じく抗血清を用いた蛍光抗体法 (FAT: fluorescent antibody technique) による組織切片中のウイルスタンパク質の検出 (Nguyen *et al.*, 1994) が報告されている。また分子生物学的手法として、外被タンパク質遺伝子 (RNA2) の塩基配列を基に作製し

たプライマーを用いたRT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) (Nishizawa *et al.*, 1994; Mushiake *et al.*, 1994)、ウイルス核酸の標識cDNA (complimentary DNA) を用いた *in situ* hybridization によるウイルス核酸の検出 (Comps *et al.*, 1996) が報告されている。

さらに、培養細胞を用いた診断手法として、C-type レトロウイルス (SnRV) が持続感染したSSN-1細胞がベータノダウイルスを培養可能であることが報告され、さらに、より分離培養に適したSSN-1細胞のクローン細胞であるE-11細胞が作製されている (Frerich *et al.*, 1996; Iwamoto *et al.*, 1999, 2000; 写真 I -2A, B)。

表 I -5 VNNの診断方法

診断方法	参考文献
病理組織学的手法	Yoshikoshi and Inoue, 1990
蛍光抗体法	Nguyen <i>et al.</i> , 1994
免疫病理組織学的手法	OIE, 2006
酵素結合抗体法	Arimoto <i>et al.</i> , 1992
電子顕微鏡観察	Mori <i>et al.</i> , 1992
分離・培養法	Frerich <i>et al.</i> , 1996; Iwamoto <i>et al.</i> , 1999, 2000
ポリメラーゼ連鎖反応	Nishizawa <i>et al.</i> , 1994; Mushiake <i>et al.</i> , 1994
<i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	Comps <i>et al.</i> , 1996 (虫明・有元, 2000)
虫明・有元, 2000	

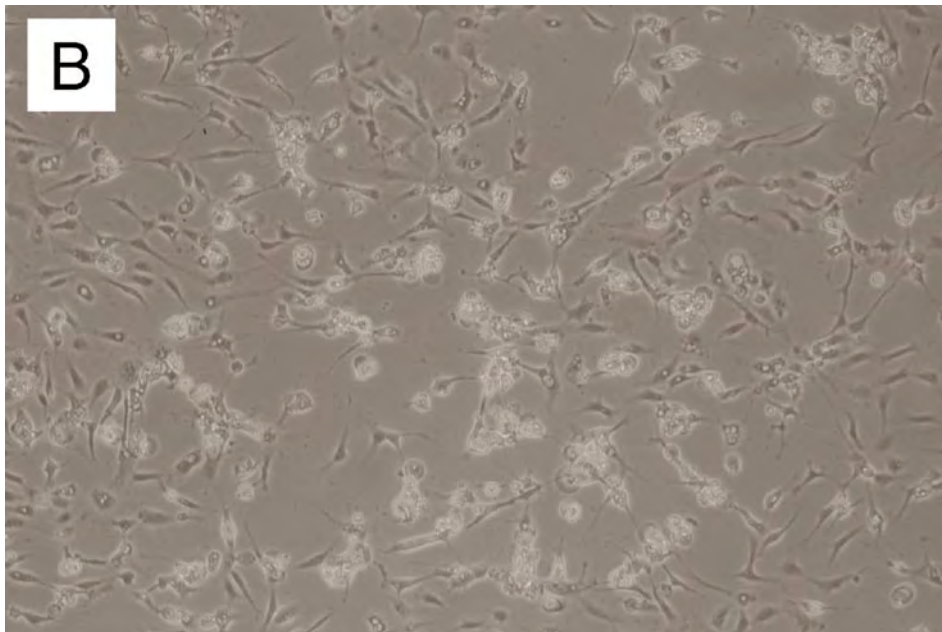
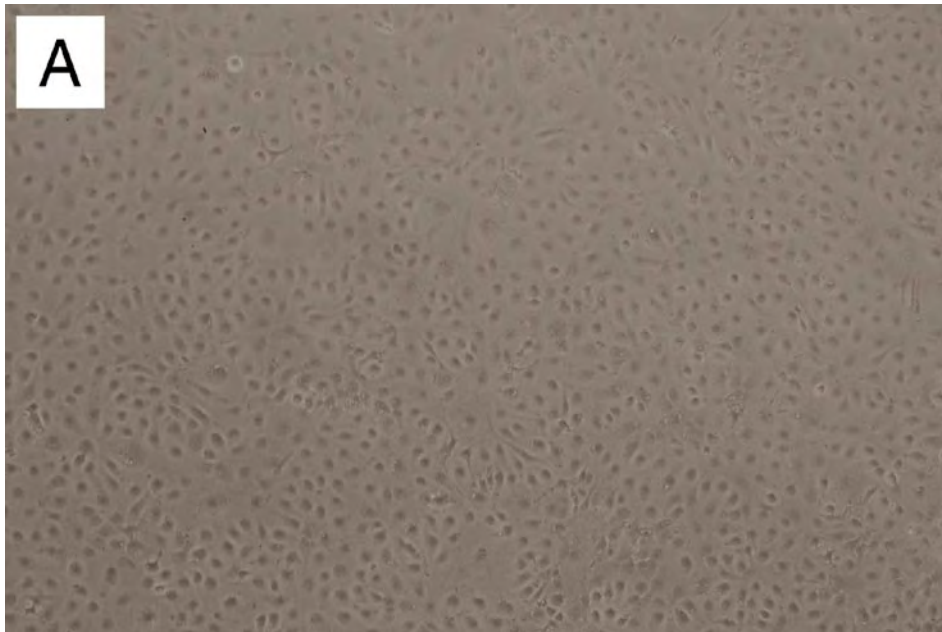


写真 I -2 ウイルス性神経壊死症原因ウイルスの感染によってE-11細胞に認められた細胞変性効果 (CPE)  
A: 正常細胞, B: 感染細胞

### 1-5 感染経路と防除対策

種苗生産過程のウイルス病の感染経路としては、親魚からの垂直感染や飼育水等からの水平感染が考えられるが、シマアジで発生したVNNについては、上述のELISAやRT-PCR法でも生殖腺および受精卵からウイルスが高率に検出されることから、垂直感染が主要な感染経路であることが報告されている (Arimoto *et al.* 1992; Mushiake *et al.* 1994)。同様な報告は、マツカ

ワ、ヨーロッパスズキおよびマハタにおいても成されている (Watanabe *et al.* 2000; Breuil *et al.*, 2002; 土橋ら, 2002)。また一方で水平感染については、ヨーロッパスズキおよびヨーロッパヘダイ (*Sparus aurata*) で海上生簀での感染例が報告されており、特に海上での中間育成時には水平感染も感染経路の一つとして重要であることが示されている (Breuil *et al.*, 2002)。

防除対策に関しては、シマアジにおいてRT-PCRによる親魚生殖腺の検査で陰性の親魚だけを採卵に用いる

親魚選別法，さらにオキシダント海水を用いた受精卵の消毒やオキシダントによる飼育水の殺菌が防除に有効であったことが報告されている (Mushiake *et al.*, 1994; Mori *et al.*, 1998)。同様にマツカワにおいても，マツカワで発生したBFNNVタイプのBFNNVに対する抗体を検出する抗ヒラメIgMウサギ血清を作製し，組換えBFNNV外被タンパク質をELISAプレートに固層化後，サンプルマツカワ血清，抗マツカワIgMウサギ血清，標識抗ウサギIg抗体を順次反応させ，血清中の抗ウイルス抗体価を測定する方法が開発され，抗ウイルス抗体価による親魚選別が有効であったことが報告されている (Watanabe *et al.*, 2000)。また，オキシダント海水を用いた消毒の実際の有効性に関しては，ノルウェーのハリバットにおいて，有意にVNNに対する生残率が上昇することが報告されている (Grotmol *et al.* 2000)。

一方，水平感染対策のための予防免疫を目的としたワクチン開発については，マハタにおいて組換え外被タンパク質を用いた成分ワクチン (Tanaka *et al.*, 2001) および培養ウイルスのホルマリン不活化ワクチン (Yamashita *et al.*, 2005) の有効性が報告されている。海外においては，サラサハタにおいてマハタと同様の組換え外被タンパク質を用いた成分ワクチン (Yuasa *et al.*, 2002) の有効性が確認されている。これらのワクチンは，中間育成時の予防対策としては有効と思われるが，何れも注射による接種でワクチネーションが行われることから，現状では種苗生産時の対策に応用することは望めない。

## ポイント

- ウイルス性神経壊死症は，encephalomyelitisあるいはvacuolating encephalopathy and retinopathy (VER) と呼ばれ，国内外を問わず多くの魚種で発生し大きな被害が報告されている。
- 本疾病は仔稚魚期に発生し，病魚は旋回あるいは回転等の異常遊泳を示し，中枢神経系および網膜の神経細胞の壊死崩壊に伴う空胞形成を特徴とし，細胞質中に小型で球形のウイルス粒子 (直径25nm前後) が観察される。
- 本ウイルスはRNAウイルスでノダウイルス科ベータノダウイルス属に分類され，SJNNV，TPNNV，BFNNVおよびRGNNVタイプの4つの遺伝子型，A，BおよびCの3つの血清型に分けられる。
- 種苗生産過程のウイルス病の感染経路としては，親魚からの垂直感染や飼育水等からの水平感染が重要な感染経路として報告されている。
- 防除対策に関しては，シマアジなどにおいて親魚生殖腺の検査で陰性の親魚だけを採卵に用いる親魚選別法，受精卵の消毒および飼育水の殺菌が防除に有効であったことが報告されている。

(森 広一郎)

## II 宮古栽培漁業センターにおけるヒラメ VNN の発生状況

### はじめに

宮古センターでは、1995年のヒラメの種苗生産過程において一部の飼育例で浮遊期の仔魚にウイルス性神経壊死症が発生し、翌年の1996年には当センターおよび種苗の配付機関で放流を目的に後期育成中の種苗においてもVNNが原因と思われる大量死が認められた。また、その後も1998年に後期育成中の種苗にVNNが発生するなど、1996年以降は従来の量産体制での種苗生産の遂行は事実上、不可能な状態に陥った。本章では以下に1995年から1998年におけるVNNの発生状況を記す。

### 1 親魚養成と採卵状況

#### 1-1 親魚養成

1995年から1998年までの期間の親魚の養成状況と採卵方法を表II-1に示した。宮古センターでは、1995年まで採卵親魚には1983年に生産した人工生産魚および同時期に搬入養成した天然魚の混成群を用いていた。1995年の種苗生産過程でのVNN発生を機に、これらの混成親魚はすべて殺処分した。このため、1996年は別途養成していた人工生産魚（9、10歳魚）から採卵を行うとともに、危険分散として他機関の受精卵の供給も受けて、各々のふ化仔魚を種苗生産に供した。また、1996年より次年以降の種苗生産に備えて新たな天然魚の養成を開始した。

1996年の種苗生産過程でもVNNが発生したため、1997年以降は親魚をすべて天然魚に切り替え、厚岸栽培漁業センターのマツカワでVNNの垂直感染防除を目的に実施している大腸菌発現組換えBFNNV外被タンパク質を用いた抗体検出ELISAによる親魚選別を試みた。そして、ELISA吸光値（VNNウイルス抗体価）の低い個体のみを選抜して採卵試験に供した。

#### 1-2 採卵

産卵水槽は、60kl円型RC水槽を用い、1995年はこの他に30kl円型キャンパス水槽を用いた。換水方法は、1995年、1996年に60kl円型RC水槽で循環ろ過方式としていた以外は、すべてかけ流し方式で行った。養成水温は、1995年の30kl円型キャンパス水槽で自然水温とした以外は、すべて加温を行った。加温は、自然水温が8～9℃となる1月下旬から飼育水を加温し、2月下旬に12℃、3月下旬に14℃、4月上旬に15℃まで昇温させて行った（表II-1）。

水槽内に産出された卵の採集は、水槽に隣接した採卵槽に設けたゴースネットを用い、得られた受精卵は以下

の方法で消毒を行った。1995年は市販のポピドンヨード剤（以下、ヨード剤）を用いて、有効ヨウ素濃度が50mg/lとなるように調整した海水に10分間浸漬する方法で行った。1996年以降はオゾンを反応させることにより発生させたオキシダント海水に2分間浸漬する方法で消毒を行い、その際の浸漬濃度は1996年が残留オキシダント濃度として0.6mg/l、1997年および1998年は同0.75mg/lとした（表II-2）。

### 2 種苗生産と後期育成状況

#### 2-1 種苗生産

種苗生産方法を表II-2に示した。種苗生産には50kl角型コンクリート水槽（4.8×8.0×1.6m）を使用した。1995、1996年の飼育は、1水槽当たりのふ化仔魚の収容尾数を150万尾前後（飼育密度3万尾/kl）とし、日齢14前後（全長7.0～8.0mm）、同23～33（全長13.0～15.0mm）の期間に、直径50mmのホースを用いて他の水槽へ2～5回にわたって分槽を行い、収容密度を1槽当たり20～30万尾程度（飼育密度0.4～0.6万尾/kl）となるように調整した。また、1997、1998年では、1水槽当たりのふ化仔魚の収容尾数を50～60万尾（飼育密度1.0～1.2万尾/kl）とし、着底直前の日齢25～30付近で密度を下げる目的で間引く以外は、取り上げまで同一水槽で飼育を継続した。飼育水温はふ化仔魚収容時は15℃を維持し、その後は日齢6までに17.8℃を目安に昇温し、日齢7以降は取り揚げまでこの水温を維持した。

飼育水への植物プランクトンの添加は、1995、1996年ではふ化仔魚収容時から日齢30付近までナンノクロロプシスを添加し、濃度を50～200万セル/mlに維持した。1997、1998年ではワムシの給餌開始（日齢3前後）から日齢25付近まで、飼育水に濃縮淡水クロレラを添加し、濃度を50～100万セル/mlに維持した。

餌料にはワムシ、アルテミア、配合飼料を用い、給餌期間はワムシが日齢3前後から30まで、アルテミアが日齢13から取り上げ前日まで、配合飼料は日齢20前後から取り上げ前日までとした。生物餌料の給餌密度はワムシが5～8個体/ml、アルテミアが0.6～0.8個体/mlを維持した。

換水は、1995、1996年では飼育開始時の水量を40klとし、2日間かけて50klまで徐々に増水させた。そして、その後は日齢8前後まで日中のみ流水飼育とし、それ以降は終日流水とした。1997年以降は飼育開始直後から終日流水飼育を行った。換水率は日齢8前後までが0.6～4%、日齢15～20付近で10～14%、以降は取り

表II-1. 1995年から1998年の親魚の養成状況と採卵結果

年度	種苗生産 回数	由来 (推定年齢)	収容水槽	尾数	平均全長 (cm)	平均体重 (kg)	収容密度 (kg/m <sup>3</sup> )	採卵期間 (日数)	総採卵数 (万粒)	受精率*1 (%)	ふ化率*2 (%)	親魚選別 ELISA	種苗生産でのVNN の発生の有無
1995	1, 2	天然, 人工混成 (8~15才)	60kℓ 円型RC水槽	♀ : 21	82.6	8.47	4.58	3.27~7.28 (124)	44,842	73.7	75.4	×	未検査(1回次) 有(2回次)
				♂ : 34	57.8	2.44							
	3	人工生産魚 (9才)	30kℓ 円型 キヤンバス水槽	♀ : 68	66.4	2.9	8.45	6.14~7.28 (39)	13,521	63.6	54.4	×	未検査
				♂ : 42	49.1	1.34							
1996	1	人工生産魚 (10才)	60kℓ 円型RC水槽	♀ : 44	66.4	2.9	3.23	4.2~8.10 (130)	46,191	66.6	69.0	×	有
				♂ : 42	49.1	1.34							
	1	人工生産魚 (9才)	"	♀ : 34	62.5	2.66	2.36	4.13~8.10 (118)	26,171	50.7	57.2	×	有
				♂ : 37	48.8	1.19							
1997	1~8	天然魚 (2~5才)	60kℓ 円型RC水槽	♀ : 11	44.5	0.97	0.23	4.17~8.8 (114)	7,041	81.0	59.6	○	無
				♂ : 5	36.4	0.53							
1998	1~3	天然魚 (4~6才)	60kℓ 円型RC水槽	♀ : 5	57.4	2.88	0.31	4.12~6.9 (59)	4,368	81.0	58.7	○	有(1回次)
				♂ : 3	45.5	1.16							

飼育水は紫外線殺菌処理海水。飼育水の加温は自然水温が8~9℃を示す1月上旬から開始し、2月下旬までに12℃、3月下旬には13~14℃に調整した。4月以降は15℃を維持。

\*1 : 総採卵数に対する受精率, \*2 : 受精卵におけるふ化率, ○ : 実施, × : 未実施

表Ⅱ-2. 1995年から1998年の種苗生産の飼育方法と取り上げ結果

年度	生産 回次	収容 尾数 (万尾)	収容 密度*1 (万尾/ kℓ)	分槽 の有無	取揚 尾数 (万尾)	生残率 (%)	採卵親魚 の由来	親魚の 更新	ELISAに よる親魚 の選別	受精卵の 消毒法	低密度 飼育*3	VNNの 発生	VNN以外の飼育 不調の有無
1995	1	158.1	3.95	有	139.2	88.0	天然、人工混成 (8~15才)	×	×	ヨウ素 50mg/ℓ ×10分	×	未検査	ALC装着後の飼育 で死亡増加
	2	169.6	4.24	〃	-	-	〃	×	×	〃	×	日齢14	
	3	154.6	3.87	〃	131.0	84.7	人工生産魚 (9才)	×	×	〃	×	未検査	ALC装着後の飼育 で死亡増加
	合 計	482.3	4.02	有	270.2	56.0	天然、人工混成 (8~15才)	×	×	ヨウ素 50mg/ℓ ×10分	×	VNN発生	
1996	1	137.8	2.81	有	113.1	81.6	人工生産魚 (10才)	×	○	キシダント 0.75mg/ℓ ×2分	×	日齢65	
	2	129.6	2.64	〃	87.5	69.8	天然魚*2	○	×	〃	×	日齢72	
	合 計	267.4	2.73	有	200.6	75.0	人工生産魚 あるいは天然魚			キシダント 0.75mg/ℓ ×2分	×	VNN発生	
1997	1~7	11.0~ 66.0	0.22~ 1.32	無	-	-	天然魚 (2~5才)	○	○	キシダント 0.75mg/ℓ ×2分	○	陰性	フムシに起因する 飼育不調で飼育を 中止
	8	50.0	1.00	〃	24.3	48.6	〃	○	○	〃	○	陰性	
	合 計	361	1.10	無	24.3	6.7	天然魚 (2~5才)	○	○	キシダント 0.75mg/ℓ ×2分	○	陰性	
1998	1	42.0	0.84	無	18.5	44.1	天然魚 (4~6才)	○	○	キシダント 0.75mg/ℓ ×2分	○	日齢88	
	2	57.4	1.15	〃	28.2	49.1	〃	○	○	〃	○	陰性	日齢57~59で大量 死亡, VNNは陰 性, 原因不明
	3	51.4	1.03	〃	19.5	37.9	〃	○	○	〃	○	陰性	日齢62~66で大量 死亡, VNN陰性, 原因不明
	合 計	150.8	1.01	無	66.2	43.9	天然魚 (4~6才)	○	○	キシダント 0.75mg/ℓ ×2分	○	VNN発生	

\*1: 水槽は50kℓ 角型RC水槽 1~5槽を使用した。  
 \*2: 他機関で養成された天然魚の受精卵を使用した。  
 \*3: 2万尾/kℓ以下を低密度飼育とした。  
 ○: 実施, ×: 未実施

上げ直前までに25~28%とした。

底掃除は日齢6から開始し、着底直前の日齢30付近まで毎日行った。そして、着底期以降は水槽中央部に集積する残餌と糞のみをホースで回収した(1995, 1996年)。1997, 1998年は上記の作業に加えて、着底期以降、底掃除に使用するホースの先端から海水を噴射し、着底個体を移動させると共に水槽底面の汚れを擦り落とし、水槽中央部に蟄集した堆積物をホースで回収した。

1995年から1998年に実施した種苗生産および中間育成の飼育結果を表Ⅱ-2に示した。種苗の取り上げは日齢46~50付近で行い、選別は取り上げと同時に進

めた。回収した稚魚は隣接する50kℓ水槽に設置した目合い90径の小割網(3.5×3.0×1.0m)2面に収容し、網の中に残った大型個体(全長26~27mm)は重量法で計数した後、別途、他の水槽に設置した育成用の小割網へ収容した。網を通過した小型個体(全長20mm前後)は水槽内での飼育を継続し、約7~10日後に再度、同一の工程で取り上げ、選別を行った。

## 2-2 後期育成

取り上げ後の種苗の後期育成は50kℓ角型コンクリート水槽および120kℓ角型コンクリート水槽に小割網(ナ

イロンモジ網3.45×2.95×1.20 m)を設置して行った。小割網1面当たりの収容密度は、取り上げ直後から全長30mmサイズまでが3.2万尾、全長35mmサイズでは2.0万尾、全長40mmサイズが1.0万尾、全長45mmが0.8万尾とした。飼育水は自然水温の砂ろ過海水を使用し、1日当たり3.0～4.8回転の割合で換水を行った。飼料は市販配合飼料を用い、給餌回数は成長に合わせて1日当たり2～4回とした。選別は成長に応じて7～10日間毎に、小割網(1.8×1.8×1.0m:目合い7, 9mm), ステンレス製籠(0.6×0.6×0.4m:目合い10, 13, 16, 20mm)を用いて適宜行った。

### 3 種苗生産結果とVNNの発生

1995年から1998年までの期間の種苗生産の取り上げ結果を表Ⅱ-2に、種苗生産でのVNNの発生状況を表Ⅱ-3に示した。なおVNNの診断は、後述(Ⅱ章-4)の通り組織観察、蛍光抗体法およびPCRにより行った。

VNNの発生が認められたのは、1995年の2回目(日齢14)、1996年の1回目(日齢65)、2回目(日齢72)、1998年の1回目(日齢88)の生産回次の4例であった。親魚の更新を行わず、長期養成魚の受精卵を用いていた1996年以前では、1995年の2回目の飼育をはじめ、ウイルス検査を行わなかった未検査の2例を除く3例すべての生産回次でVNNの発生が確認された。

#### [1995年]

浮遊期でVNN発生が認められたのは、1995年のみであり、本事例では日齢12付近より摂餌不良個体が増加し、全長が7mmに達する日齢14で全滅した。また、未検査の2例も日齢12～14で空胃個体出現、死亡の増加、ALC装着後の小割網での飼育で死亡が増加するなど、飼育経過は必ずしも順調ではなかった。

#### [1996年1回次]

1996年は、前年度の生産でVNNが発生したことを受けて、親魚からの垂直感染の有無を確認するため、さらに放流種苗確保のための危険分散を計るため、2回目の生産回次では他機関の受精卵を収容した。VNNの発症時期を特定するため、飼育開始後20日目までは5日毎に、20日目以降50日目までは10日毎にRT-PCR法で供試魚のウイルス検査を随時行った。その結果、自場の受精卵を用いた1回目の飼育では、供試魚を取り上げて屋外水槽の小割網に移槽した飼育50日目まで検査陰性であったが、全長が30～44mmに達した飼育64日目に遊泳緩慢、摂餌不良(空胃)、頭部の発赤等のVNNが疑われる症状を呈する個体が出現し、PCR法によりウイルス検査を実施した結果、陽性と診断された。その際の小割網での収容密度は1,500～2,000尾/kℓであり、ろ過海水と生海水を3.2回転/日で注水していた。

#### [1996年2回次]

一方、他機関の受精卵を用いて1回次の飼育より4日遅れて飼育を開始した2回次の飼育では、1回次でVNNが発生した時点では既に屋外水槽での飼育に移行しており、検査結果は依然として陰性であった。しかしながらその後1回次の生産でVNNが発生してから11日後に、1回次と同様の症状を呈する個体が出現し、ウイルス検査を行った結果、陽性と診断された。なお、2回次と同じ受精卵は卵の配付元の機関においても種苗生産に使用されたがVNNは発生しなかった。以上のように、2回次でのVNNの発生は、卵由来(垂直感染)ではなく、1回次の水槽からの水平感染に起因していると考えられた。

#### [1998年1回次]

本飼育例でも罹患魚は1997年と同様の遊泳緩慢、

表Ⅱ-3. 1995年から1998年の種苗生産におけるVNNの発生状況

年度 (種苗生産回次)	1995 2回次	1996 1回次	1996 2回次	1998 1回次
日齢	14	65	72	88
水温(℃)	17.7～17.8	17.4～18.6	17.4～18.6	16.9～17.5
サイズ(TL:mm)	7	30～44	30～44	35～50
発生時の飼育密度 (千尾/kℓ)	14	1.5～2.0	1.5～2.0	0.75～2.0
診断方法	RT-PCR	RT-PCR, 病理 組織及び蛍光 抗体法	RT-PCR, 病理 組織及び蛍光 抗体法	RT-PCR



摂餌不良、頭部の発赤といった症状を呈し、全長35～50mmサイズ（日齢88）で死亡する個体が増加し、ウイルス検査を行ったところ陽性と診断された。その際の小割網での収容密度は750～2,000尾/kℓであり、ろ過海水を3.0～4.8回転/日で注水していた。なお、当該年においては、別の10kℓ角型RC水槽で同じ受精卵を用い種苗生産と併行して進めていた飼育試験でも、日齢74、75の個体に同様の症状が認められ、死亡が増加し、ウイルス検査陽性となった。

これら4発生事例での死亡率は、1995年が100%、1996年が1回次、2回次を合わせて54.5%、1998年が22.1%であった。発生時の水温は、1995年が17.8℃、1996年が17.4～18.6℃、1998年が16.9～17.5℃であった。

（太田 健吾）

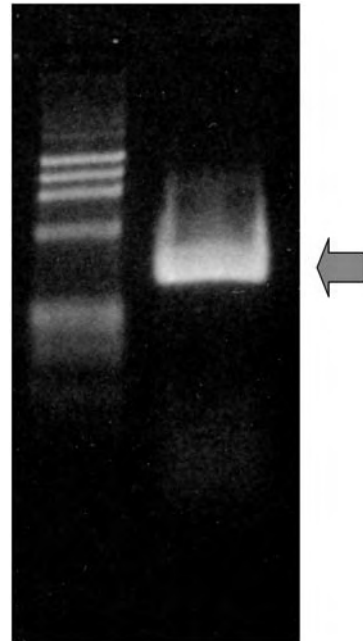
#### 4 宮古で発生したヒラメVNNの原因ウイルスの性状

1996年および1998年に宮古センターで採取した死亡魚あるいはひん死魚を材料に以下の診断並びにウイルスの性状解析を行った（写真Ⅱ-1は死亡した病魚）。これらの事例のひん死魚の症状は、前述の通り、遊泳緩慢、摂餌不良（空胃）、頭部の発赤を呈していた。このうち頭部の発赤については、全ての個体で顕著に認められるものではなかった。

##### 4-1 PCR法による診断

死亡魚の眼球あるいは脳を採取し、市販の核酸抽出試薬であるISOGEN（ニッポンジーン）を用いRNAの抽出を行った。PCR検査は、Nishizawa *et al.* (1994) が

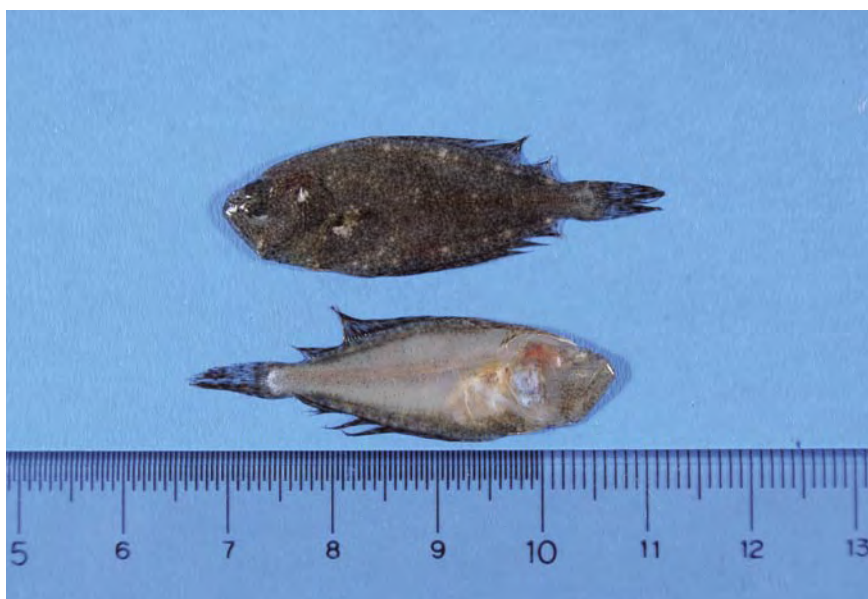
報告したRT-PCR即ち、RT-PCRには外被タンパク質遺伝子（RNA2）のT4領域（427bの領域）の増幅用プライマーとしてF2とR3プライマーを用い、逆転写反応を行ったのち、PCR反応を行った（添付マニュアル参照）。その結果、ヒラメ病魚から、427bpの標的とするウイルス遺伝子のPCR産物が電気泳動により検出され、NNVの感染が確認された（図Ⅱ-1）。



図Ⅱ-1. RT-PCR法によりヒラメ病魚から検出されたウイルス遺伝子のアガロース電気泳動像

左：DNA マーカー（ $\phi$  X174Hae III digest）

右：1998年ヒラメ病魚（矢印部分が増幅されたウイルス遺伝子）



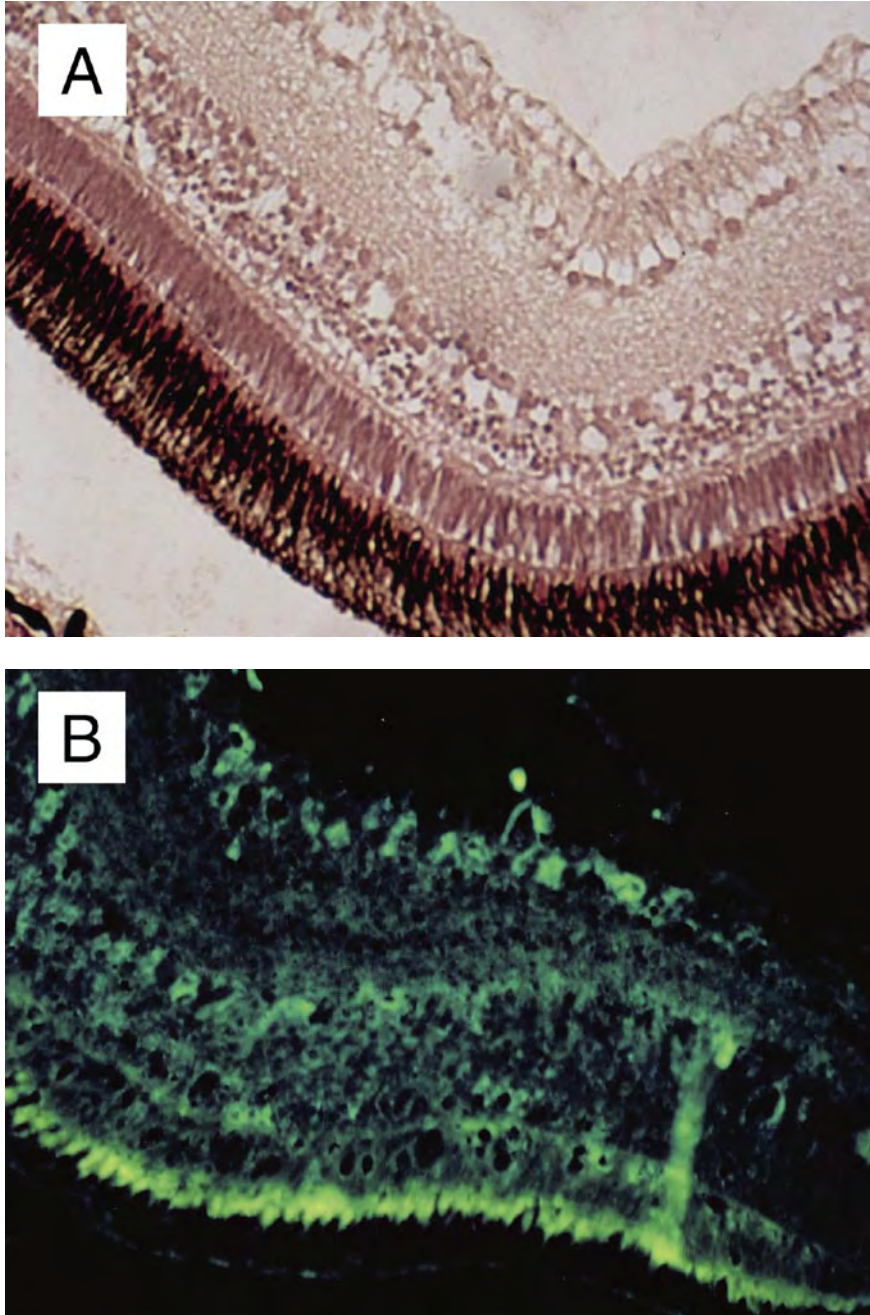
写真Ⅱ-1. 死亡したヒラメ病魚の外観症状

#### 4-2 H&E染色および蛍光抗体法による病理組織の観察

H&E染色にはブアン固定液あるいは蛍光抗体法には10%中性ホルマリンで固定した類死魚を常法に従いパラフィンで包埋し、切片を作製し、H&E染色し、顕微鏡観察すると共に、一次抗体に100倍希釈の抗SJNNVウサギ血清、標識二次抗体にFITC標識抗ウサギIgGブタ血清を反応させ、落射型蛍光顕微鏡により観察した。

その結果、病魚の脳および網膜顆粒層に細胞の壊死と空胞の形成が観察され、蛍光抗体法により神経細胞質に強い特異蛍光が認められた(写真II-2A, B)。

抗SJNNVウサギ血清を用いた蛍光抗体法により病変部の細胞に特異蛍光が認められたことから、死亡原因がVNNであることが再確認され、ヒラメ由来のウイルスはSJNNVと共通抗原を有することが明らかになった。



写真II-2. ヒラメ瀕死魚の病理組織像

A: 眼球の網膜に認められた神経細胞の壊死と空胞 (H&E染色)

B: 蛍光抗体法 (FAT) によって眼球の網膜に認められたウイルス感染細胞 (緑色の蛍光部分)

### 4-3 電子顕微鏡観察

前述の10%中性ホルマリン固定サンプルを2.5%グルタルアルデヒド-2%パラホルムアルデヒドで再固定し、オスミウム酸で後固定した後、常法に従ってエポキシ樹脂に包埋し、頭部組織の超薄切片を作製し、80kVの加速電圧で透過型電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、他の魚種のVNNと同様に眼球および脳の空胞周辺の壊死した神経細胞の細胞質中に小型の球形のウイルス（直径約25nm）が多数観察された。

### 4-4 原因ウイルスの遺伝子型と血清型

Nishizawa *et al.* 1995が報告した外被タンパク質遺伝子RNA2のウイルス株毎に塩基配列の変異部位が多く確認されている領域であるT4領域を前述の通り増幅し、ExoSAP-IT (USB) で処理後、市販のシークエンスキット (BigDye Terminator v.3.1; ABI) を用い、オートシークエンサー (3130xl Genetic Analyzer; ABI) で塩基配列を決定した。遺伝子解析ソフトPHILIP ver.3.6 (Felsenstein, 2004) を用い遺伝学的近縁性から系統樹を作製したところ、本ウイルス株はNishizawa *et al.* (1997) で示されたBFNNVタイプの遺伝子型に分類された (図II-2)。

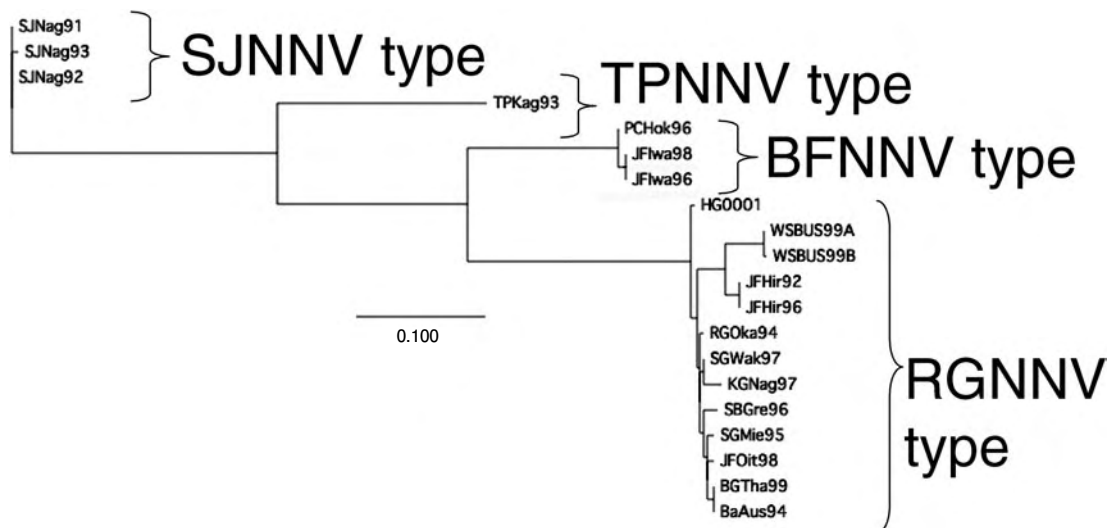
さらにMori *et al.* (2003) が報告した、4タイプの遺伝子型のウイルスに対するウサギ血清を用い、E-11細胞を用いた中和試験により血清型を調べたところ、1996年および1998年に宮古センターで発生したヒラメ病魚由来株は、何れの株もC型となった (表II-4)。

### 4-5 原因ウイルスの病原性

検出されたウイルスのヒラメに対する病原性を確認するため、感染実験を行った。即ち、1996年のヒラメ病魚の頭部を切断回収し、これに9倍量の10mMのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH7.4) を加え磨砕後、遠心分離し上精を孔径が0.45 $\mu$ mのフィルターでろ過し、病魚磨砕液を作製した。供試ヒラメ仔魚 (ふ化15日齢) を収容した1 $\ell$ の海水の入ったビーカーに、作製した病魚磨砕液を添加し1時間静置した。その後、30 $\ell$ の海水の入ったパンライト水槽に移し、飼育水温は20 $^{\circ}$ Cで、適宜ワムシを給餌し2週間観察した。その結果、PBSのみに暴露した対照区では、死亡率が9.0%であったのに対し、病魚磨砕液暴露区では、10日目くらいから遊泳緩慢個体さらには死亡個体が目立ち始め、2週間目までに69.5%の個体が死亡した (表II-5)。死亡個体については、前述のFATによるVNNの診断を行ったところ陽性となったことから、PCR等で検出されたウイルスのヒラメに対する病原性が確認された。

### 4-6 他機関におけるヒラメのVNN発生状況

ヒラメのVNNは、1992年以降、西日本の種苗生産過程の稚魚に本病が発生し大きな問題となっている (Nguyen *et al.* 1994)。(独)水産総合研究センターの栽培漁業センター (旧社)日本栽培漁業協会) の行った種苗期疾病情報で集められた平成8年から14年までの公的機関におけるヒラメVNN発生状況を、表II-6にまとめ



図II-2. 外被タンパク質遺伝子 (RNA2) の遺伝的近縁性を基にした系統樹  
ヒラメVNN原因ウイルス (平成8年株): JFIwa96株  
(平成10年株): JFIwa98株

表Ⅱ-4. 異なる遺伝子型のウイルスに対する抗血清を用いた中和結果と血清型

ウイルス	株名	由来	遺伝子型	抗ウイルス血清を作製したウイルス株				血清型
				SJNag93 (SJNNV)	TPKag93 (TPNNV)	SGWak97 (RGNNV)	JFIwa98 (BFNNV)	
NNV	SJNag91	シマアジ	SJNNV	+	-	-	-	A
	SJNag92	シマアジ	SJNNV	+	-	-	-	A
	SJNag93	シマアジ	SJNNV	+	-	-	-	A
	TPKag93	トラフグ	TPNNV	-	+	-	-	B
	SGWak97	マハタ	RGNNV	-	-	+	+	C
	SGMie95	マハタ	RGNNV	-	-	+	+	C
	RGOk94	キジハタ	RGNNV	-	-	+	+	C
	JSOit98	スズキ	RGNNV	-	-	+	+	C
	KGOit97	クエ	RGNNV	-	-	+	+	C
	HG0001	サラサハタ	RGNNV	-	-	+	+	C
	BGTha99	チャイロマルハタ	RGNNV	-	-	+	+	C
	SBGre96	ヨーロッパスズキ	RGNNV	-	-	+	+	C
	WSBUS99A	ホワイトシーバス	RGNNV	-	-	+	+	C
	WSBUS99B	ホワイトシーバス	RGNNV	-	-	+	+	C
	BAAus94	バラマンディー	RGNNV	-	-	+	+	C
	JFHir92	ヒラメ	RGNNV	-	-	+	+	C
	JFHir96	ヒラメ	RGNNV	-	-	+	+	C
	JFIwa96	ヒラメ	BFNNV	-	-	+	+	C
	JFIwa98	ヒラメ	BFNNV	-	-	+	+	C
	PCHok96	マダラ	BFNNV	-	-	+	+	C
IPNV	VR299			-	-	-	-	
IHNV	ChAb			-	-	-	-	
VHSV	Obama25			-	-	-	-	

宮古のヒラメ病魚由来株: JFIwa96(平成8年株), JFIwa98(平成10年株)  
 10,000倍以上の希釈倍率の抗血清で中和された株をプラス(+), されなかった株をマイナス(-)とした。

表Ⅱ-5. ヒラメ仔魚(日齢15)を用いた病魚磨砕ろ液による感染試験

試験区	累積死亡率	蛍光抗体法(FAT) による死亡個体のVNN診断
ヒラメ病魚磨砕ろ液区*1	69.5%	陽性
対照区	9.0%	陰性

\*1:1996年の病魚を使用し, 攻撃は浸漬攻撃, 飼育水温は20°Cで2週間観察

表Ⅱ-6. 他の公的機関におけるヒラメのウイルス性神経壊死症発生状況

年	地域	発病期間	発病サイズ 全長mm(日齢)	発生 水温(°C)	被害 累積死亡率(%)	原因ウイルスの 遺伝子型
1996	東北	7月下旬 ～9月中旬	26～33(66)	ND	ND	BFNNV
	関東	7月下旬 ～8月中旬	18～34(66)	ND	ND	ND
	九州	5月中旬 ～6月中旬	ND(30～40)	ND	ND	ND
1997	四国	3月下旬 ～4月上旬	25～35(57)	ND	ND	ND
1998	関東	8月上旬 ～下旬	ND(35～45)	ND	30	RGNNV
1999	東北	6月中旬 ～下旬	15～20(ND)	14～15	80	BFNNV
2001	九州	4月中旬 ～5月中旬	ND(57～85)	17～20	74	SJNNV
2002	四国	3月初旬 ～3月中旬	10(28～31)	16	10～20	RGNNV
	四国	2月初旬 ～3月初旬	10～30(30～58)	18	10～15	RGNNV
	九州	4月中旬 ～8月初旬	30(57)	18～27	殺処分	RGNNV

ND: 不明, (平成8年から平成14年; 種苗期疾病情報より)

た。ヒラメのVNNの発生は東北地域から九州地域の広い地域で認められており, 原因となるウイルスの遺伝子型は, RGNNVタイプ, SJNNVタイプおよびBFNNVタイプが確認されている。ヒラメにおいては, TPNNVタイプがNishizawa *et al.* (1997) で論文報告されていることから, ヒラメは全ての遺伝子型のベータノダウイルスに感受性があり, これら全てのタイプのウイルスがヒラメの種苗生産で被害を与えていることが視える。発生の傾向としては, 第1章で紹介した至適増殖温度が低いBFNNVタイプは, 日本の東北部地域で, 至適増殖温度が高いRGNNVタイプは, 日本の南西部地域(関東以南)で発生している。本病が発生した際のヒラメ種苗のサイズは, 最も小型のもので全長10mmであり, 宮古センターの1996年1回次および1998年1回次の事例と同様に, その多くは主に仔魚期後期以降, 中でも稚魚期にVNNの発生が集中している。このような発生状況は, ふ化直後に発生するシマアジのVNNと発生時期が大きく異なっている。

(森 広一郎)

## 5 まとめ

宮古センターでは, 1995年以前の種苗生産でも, 浮遊期の仔魚には1995年以降に認められたVNNによる大量減耗事例で認められた症状と酷似した症状, 即ち遊泳緩慢, 摂餌不良, 頭部の発赤などを呈する死亡例が認め

られていた。当時は長期間の養成に伴う養成親魚の加齢が卵質に悪影響を及ぼしていると考えられ, それ以上の原因については究明されなかった。よって1995年以前にも宮古センターにおいてはVNNが発生していたかもしれない。また, 1996年までヒラメの親魚は, 8～15歳といった高齢魚が産卵親魚の主群であり, 長期間にわたって循環ろ過方式の水槽で養成されていたことから, 一旦, 親魚水槽内にウイルスが混入した場合には親魚間で容易に水平感染が成立し易い環境であった。このような親魚の養成環境が種苗生産過程でのVNNの発生要因となった可能性も考えられる。

このような事態を打開するため, 1997年以降は, 親魚候補としての天然魚の新規導入, ELISAによる親魚の選別, オキシダント海水による受精卵の消毒, 水平感染の防除を目的とした低密度飼育等を実施した結果, 実施した4例のうち, 3例ではVNNは発生しなかった。このことから, これらの対策がある程度, VNN防除に功を奏したと考えられた。しかし, 1998年の1例ではVNNが発生したこと, 1996年の2回次では他機関の受精卵を用いた飼育例では他の飼育水槽からの水平感染が成立していた可能性があり水平感染の対策が十分でなかったことが伺えた。そのため, 現行の対策では, ヒラメのVNN防除対策としては, 不完全であり, 新たな親魚選別法や水平感染を防除する対策の導入が必要と考えられた。

## ポイント

- 宮古センターでは、1995年、1996年、1998年のヒラメ種苗生産において大量死亡が発生しVNNと診断された。
- 1995年は、浮遊期の全長7mm、水温17.8℃、死亡率は100%であった。1996、1998年は、後期育成時に発生し、全長30～50mm、飼育水温16.9～18.6℃、死亡率22.1～54.5%であった。罹患魚は、何れも遊泳緩慢、摂餌不良、頭部の発赤の症状を示した。
- 1996年に他機関の受精卵を搬入して飼育試験を行った結果、自場の養成親魚から垂直感染が成立している可能性が示唆された。
- 防除対策として以下の対策を講じた。
  - ① 当時、長期養成していた天然および人工生産親魚

の入れ替え（1997、1998年）

- ② マツカワVNN対策で実施しているBFNNV外被タンパク質を用いた抗体検出ELISAによる親魚選別の実施（1996、1997、1998年）
  - ③ オキシダント海水を用いた受精卵消毒法の導入（1996、1997、1998年）
  - ④ 飼育魚のストレス負荷低減および水平感染防止のため、飼育初期の収容密度を低下させ、飼育途中で分槽を行わない飼育方法への転換（1997、1998年）
- その結果、1997年以降は、検査を実施した4例のうち、3例でVNNの防除に成功した。しかし、1998年の種苗生産では1例でVNNが発生したことから、現行の対策では、不完全であり、新たな親魚選別法の導入等が必要と考えられた。

（太田 健吾）

### Ⅲ ヒラメのVNN防除技術

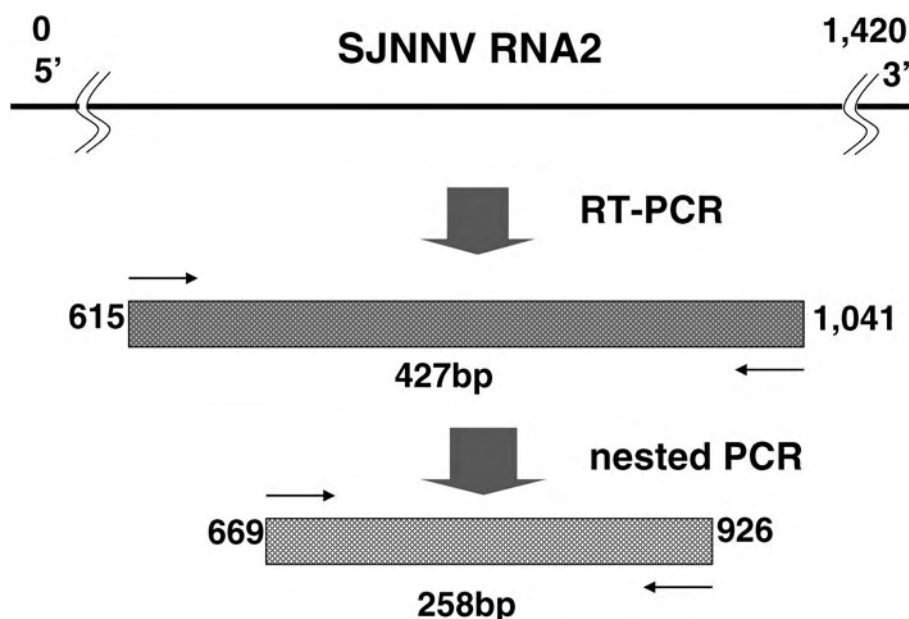
#### 1 診断技術

シマアジのウイルス性神経壊死症では、シマアジのVNN原因ウイルスであるSJNNVに対する抗ウイルス血清を用いたELISAあるいはFATによるウイルス（外被タンパク質）の検出法、同血清を用いたELISAによるシマアジ血中の抗ウイルス抗体の検出法、さらには明らかにしたSJNNV外被タンパク質遺伝子（RNA2）の遺伝子配列をもとに、開発したRT-PCRによるウイルス（遺伝子）の検出法が確立された。これらの手法を用いた診断により、同疾病に対する防除技術開発が進められてきた（Mushiake *et al.*, 1994; Mori *et al.*, 1998）。一方で、シマアジ以外の魚種におけるVNN原因ウイルスに関する研究が進められるにつれ、これまでの章でも紹介したように、遺伝子型では4タイプ、血清型では3タイプのウイルスのバリエーションが確認されている。この様に塩基配列やウイルス外被タンパク質がSJNNVと同一ではないことが明らかにされたことで、SJNNVの塩基配列や外被タンパク質の抗原性をもとに開発された従来の診断法では、異なる遺伝子型あるいは血清型のウイルスに対しては十分に機能しないことが危惧された。さらに、SJNNVとヒラメのVNN原因ウイルスの異同については当初明らかでなかったが、第Ⅱ章で紹介したように宮古センターのヒラメで認められたウイルスの性状が明らかにされ、SJNNVとは異なる遺伝子型（BFNNVタイプ）および血清型（C型）であったことから、これに対応した診断技術についての開発が必要となった。

#### 1-1 PCR法を用いた診断手法

前述の通りNishizawa *et al.*, (1994)によりVNNの診断法として開発されたRT-PCRはSJNNV（SJNNVタイプの遺伝子型）検出用に開発されたものであり、他の遺伝子型（TPNNV, BFNNVおよびRGNNVタイプ）のウイルスに用いた場合、検出感度の低下が予想され、不顕性感染状態にあるような親魚など特にウイルス量が少ないことが予想される試料の診断においては、本来は陽性と判断されるべき結果を陰性と判断してしまう偽陰性という結果を招く恐れがある。そこで、各遺伝子型のウイルスの検出感度について調査を行うと共に、RT-PCRで増幅される領域内部に、さらに各遺伝子型に合った新たなPCRプライマーを作製し、それらを用いたnested PCRによりウイルス検出感度および特異性の向上を試みた。

各遺伝子型の代表株としては、シマアジ由来のSJNNVタイプ（SJNag93株）、トラフグ由来のTPNNVタイプ（TPKag93株）、ヒラメ由来のBFNNVタイプ（JFIwa98株）およびマハタ由来のRGNNVタイプ（SGNNV SGWak97株）の株を用い、これらのウイルスから第Ⅱ章-5と同様にRNAを抽出し、以下の試験に供試した。プライマーとして、現行のT4領域（RNA2から427bpを増幅）を増幅するプライマー（F2およびR3）を用いると共に、さらにT4領域の内部に258 bpを増幅するnested PCR用のプライマーを遺伝子型毎に1組ずつ作製した（図Ⅲ-1；表Ⅲ-1）。RT-PCRは前述（第Ⅱ章）の通り行い、nested PCRは、25サイクル行



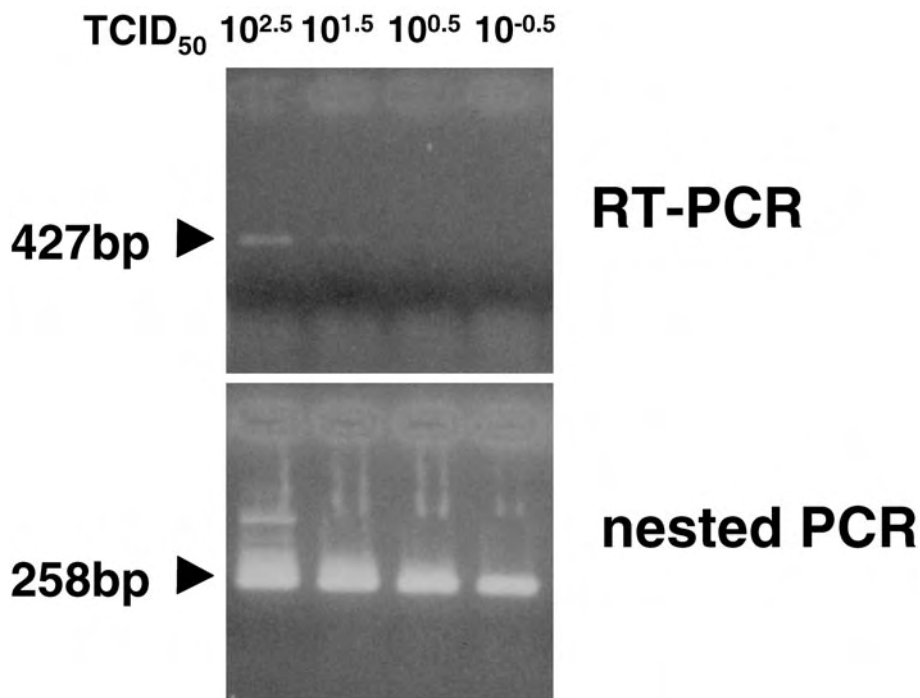
図Ⅲ-1 外被タンパク質遺伝子（RNA2）におけるRT-PCRと開発したnested PCRの増幅部位

表Ⅲ-1 ウイルスの遺伝子型毎に作製したnested PCRプライマーの塩基配列

プライマーの特性			
方向性	遺伝子型	プライマー名	塩基配列
センス鎖	SJNNV	SJ-669f	5'-acctgaggacaccaccgctc-3'
	TPNNV	TP-485f	5'-acctgaggaaacattcgctc-3'
	BFNNV	BF-485f	5'-acctgaagatacattcgctc-3'
	RGNNV	RG-485f	5'-acctgaggagactaccgctc-3'
アンチセンス鎖	SJNNV	SJ-926r	5'-cagtcaaagtaccagcagg-3'
	TPNNV	TP-735r	5'-caatccaagaagcctgcagg-3'
	BFNNV	BF-735r	5'-cagtggaaccaccccgagg-3'
	RGNNV	RG-735r	5'-cagcgaaccagcctgcagg-3'

表Ⅲ-2 遺伝子型の異なるウイルス 4 株の RT-PCR および nested PCR の検出限界

ウイルス名 (遺伝子タイプ)	検出限界 ( $\log_{10}$ -TCID <sub>50</sub> /反応液)	
	RT-PCR	nested PCR
SJNNV (SJNNVtype)	0.25	-0.75
JFNNV (BFNNV type)	1.5	-0.5
TPNNV (TPNNVtype)	1.75	-0.25
SGNNV (RGNNV type)	1.25	0.25



図Ⅲ-2 ヒラメのVNN原因ウイルス(BFNNV型)のRT-PCRおよびnested PCRによる検出結果 (検出量は、1反応中のウイルス感染価TCID<sub>50</sub>で示した)



表Ⅲ-3 nested PCRプライマーのウイルスの遺伝子型に対する特異性

NNV株名	宿主	発生国	遺伝子型	nested PCRプライマー			
				SJNNV用	TPNNV用	RGNNV用	BFNNV用
SJNag91	シマアジ	日本	SJNNV	+	-	-	-
SJNag92	シマアジ	日本	SJNNV	+	-	-	-
SJNag93	シマアジ	日本	SJNNV	+	-	-	-
TPKag93	トラフグ	日本	TPNNV	-	+	-	-
SGWak97	マハタ	日本	RGNNV	-	-	+	-
SGMie95	マハタ	日本	RGNNV	-	-	+	-
RGOka94	キジハタ	日本	RGNNV	-	-	+	-
JSOit98	スズキ	日本	RGNNV	-	-	+	-
KGOit97	クエ	日本	RGNNV	-	-	+	-
HG0001	サラサハタ	インドネシア	RGNNV	-	-	+	-
BGTha99	チャイロマルハタ	タイ	RGNNV	-	-	+	-
SBGre96	ヨーロッパスズキ	ギリシャ	RGNNV	-	-	+	-
WSBUS99A	ホワイトシーバス	米国	RGNNV	-	-	+	-
WSBUS99B	ホワイトシーバス	米国	RGNNV	-	-	+	-
BAAus94	バラマンディー	オーストラリア	RGNNV	-	-	+	-
JFHir92	ヒラメ	日本	RGNNV	-	-	+	-
JFHir96	ヒラメ	日本	RGNNV	-	-	+	-
JFIwa96	ヒラメ	日本	BFNNV	-	-	-	+
JFIwa98	ヒラメ	日本	BFNNV	-	-	-	+
PCHok96	マダラ	日本	BFNNV	-	-	-	+

った（マニュアル参照）。

その結果、RT-PCRの感度は、SJNNV以外のウイルスでは、10倍以上感度が劣ることが明らかになった（表Ⅲ-2）。新たに開発したnested PCRでは1st PCRに比べて10～100倍程度検出感度の上昇が認められ、RT-PCRで増幅された電気泳動では非常に弱いシグナルのバンドにおいても、nested PCRでは強いシグナルのバンドとして検出できたことから、検出された遺伝子の特異性の確認（ウイルス遺伝子が増幅されたものか、非特異的にウイルス以外の遺伝子が増幅されたものか）にも利用できると考えられた（図Ⅲ-2）。また、nested PCRプライマーは各遺伝子型のウイルスのみを検出できるように設計したことから、各遺伝子型に特異性があるかを確認したところ、同じ遺伝子型のウイルスでのみnested PCRによりウイルス遺伝子の増幅が確認され、よって本nested PCRは遺伝子型の判別にも利用可能であることが示された（表Ⅲ-3）。

（森 広一郎）

## 2 ヒラメにおけるVNNの感染経路の探査

### 2-1 ヒラメ天然魚のNNV保有状況の調査

NNVの感染経路については、シマアジでは、親魚からの垂直感染であることが明らかにされており、PCR法による親魚生殖腺の検査で陰性の個体だけを産卵に用

いることによりVNNの発生率を低下させることに成功している（Mushiake *et al.*, 1994）。しかしながら、その他の魚種では、ふ化直後の仔魚期に本病が発生することは希で、稚魚期以降の後期育成過程でも発生する事例があり、シマアジ以外の魚種でのNNVの感染経路については不明な点が多く残されている。

ヒラメにおいても、1992年以降、種苗生産過程の稚魚に本病が発生し大きな問題となったが、感染経路については未だ明らかにされていない。ここでは、親魚候補として新たに種苗生産場に導入するヒラメ天然魚が種苗生産過程での本病の感染源になる可能性について明らかにするため、天然魚におけるNNVの保有状況を調査した。

#### 1) 供試魚

宮古湾、駿河・相模湾、若狭湾および瀬戸内海西部の4海域で、2001年2月から2004年10月の間に漁獲されたヒラメ（平均体重535g；範囲204～1,293g）を合計586尾入手した（表Ⅲ-4）。搬入後速やかに解剖し、それぞれの個体の眼球（網膜組織）および脳を検査サンプルとして採取した。その際、生殖腺を肉眼で観察して雌雄を判別するとともに、無眼側黒化等の体色異常を観察し、色素異常を有する個体を放流魚と判定した。

#### 2) PCRによるウイルス検出

採取したサンプルに9倍量のHBSS（Hank's balanced salt solution）を加え磨砕し、0.45 μmのメンブレンフィルターで濾過後、磨砕濾液の一部から市販の核酸抽

出試薬である ISOGEN (ニッポンジーン) を用い RNA の抽出を行った。PCR 検査は、前述の RT-PCR および nested PCR により実施した。

### 3) 調査結果

4 海域から入手した合計 586 尾のヒラメ天然魚を調査したところ、RT-PCR では何れの海域で漁獲された個体からも NNV は検出されなかった (表 III-4)。しかしながら nested PCR では、宮古湾で 2001 年 5 月に漁獲さ

れた 10 個体のうち 1 個体から SJNNV タイプのウイルスが検出された。調査海域全体では、SJNNV タイプの検出率は 0.17% であった。なお、SJNNV タイプ以外のウイルスは何れの個体からも検出されなかった。今回調査した 586 尾のうち、296 尾は雄、247 尾は雌 (不明が 43 尾) で、このうち体色の異常から放流魚と判断される個体は合計 31 尾確認されたが、これらの個体からはウイルスは検出されなかった。

表 III-4 ヒラメ天然魚からのベータノダウイルス検出結果

漁獲場所	調査年月	調査尾数 (♂/♀/放流魚)*1	平均体重g (範囲g)	検出率 %				
				RT -PCR	nested PCR			
					SJNNV Type	RGNNV Type	BFNNV Type	TPNNV Type
宮古湾	Mar/2001	12 (3/9/0)	470 (330~740)	0	0	0	0	0
	Apr/2001	9 (0/9/0)	538 (390~685)	0	0	0	0	0
	May/2001	10 (4/6/0)	557 (490~675)	0	10	0	0	0
	Apr/2002	13 (6/7/1)	593 (335~910)	0	0	0	0	0
	May/2002	7 (0/7/1)	711 (460~850)	0	0	0	0	0
	Jul/2002	16 (6/10/0)	695 (329~1,293)	0	0	0	0	0
	Oct/2002	22 (10/12/1)	418 (204~818)	0	0	0	0	0
	Jan/2003	16 (8/8/1)	604 (328~1,000)	0	0	0	0	0
	May/2003	13 (5/8/0)	647 (333~1,000)	0	0	0	0	0
	Jul/2003	17 (1/16/0)	686 (290~1,006)	0	0	0	0	0
	Nov/2003	3 (1/2/1)	426 (394~470)	0	0	0	0	0
	May/2004	21 (8/13/1)	417 (262~731)	0	0	0	0	0
	Oct/2004	32 (ND/ND/8)	419 (332~560)	0	0	0	0	0
駿河・相模湾	Mar/2001	9 (5/4/0)	568 (490~685)	0	0	0	0	0
	Apr/2001	10 (7/3/0)	995 (630~1,300)	0	0	0	0	0
	May/2002	16 (10/6/0)	823 (575~1,200)	0	0	0	0	0
	Nov/2002	10 (6/4/0)	486 (435~541)	0	0	0	0	0
	Jan/2003	14 (10/4/0)	598 (321~1,111)	0	0	0	0	0
	May/2003	15 (8/7/0)	853 (485~1,358)	0	0	0	0	0
	Nov/2003	5 (5/4/0)	608 (508~758)	0	0	0	0	0
	Dec/2003	4 (5/4/0)	534 (448~595)	0	0	0	0	0
	Jan/2004	11 (6/5/1)	776 (645~917)	0	0	0	0	0
	若狭湾	Mar/2001	10 (7/3/2)	683 (575~970)	0	0	0	0
Apr/2001		11 (ND/ND/2)	475 (165~1,070)	0	0	0	0	0
Jun/2001		10 (3/7/0)	402 (255~535)	0	0	0	0	0
Apr/2002		22 (7/15/2)	697 (380~1,135)	0	0	0	0	0
Jul/2002		14 (7/7/0)	525 (262~939)	0	0	0	0	0
Oct/2002		20 (12/8/1)	467 (332~725)	0	0	0	0	0
Jan/2003		15 (9/6/0)	642 (456~1,029)	0	0	0	0	0
May/2003		14 (10/4/1)	620 (418~1,029)	0	0	0	0	0
Jun/2003		19 (10/9/3)	558 (230~745)	0	0	0	0	0
Jan/2004		5 (3/2/0)	665 (510~910)	0	0	0	0	0
瀬戸内海西部	Feb/2001	11 (4/7/1)	667 (420~1,170)	0	0	0	0	0
	Mar/2001	9 (3/2/0)	776 (485~1,135)	0	0	0	0	0
	Apr/2001	15 (14/1/0)	963 (745~1,155)	0	0	0	0	0
	Apr/2002	20 (20/0/1)	834 (615~1,090)	0	0	0	0	0
	Nov/2002	9 (4/5/1)	337 (206~471)	0	0	0	0	0
	Dec/2002	7 (7/0/0)	253 (120~380)	0	0	0	0	0
	Jan/2003	20 (13/7/1)	706 (386~1,088)	0	0	0	0	0
	Apr/2003	17 (14/3/0)	1,290 (963~1,906)	0	0	0	0	0
	Jan/2004	20 (13/7/2)	594 (332~838)	0	0	0	0	0
	Apr/2004	20 (19/1/1)	698 (471~1,050)	0	0	0	0	0
全体	2001.2~ 2004.10	586 (296/247/31)	535 (204~1,293)	0	0.17	0	0	0

\*1: 調査群の雄、雌および放流個体の尾数を示す。  
NDは、雌雄判別が出来なかった群を示す。

#### 4) まとめ

これまでに、天然魚からのNNVの検出例は、カナダのwinter flounder (*Pleuronectes americanus*) (Barker *et al.*, 2002) や我が国のキジハタ (森ら, 2004), 最近では増養殖場付近で漁獲された数種の天然魚からの検出例 (Gomez *et al.*, 2004) が報告されている。これらの報告例の中で、winter flounderの事例では、ウイルスの検出率は0.23%と報告されており、ほぼ同程度であった。一方、キジハタの事例では、検出率はRT-PCRで7.9~16.7%, nested PCRで15.8~46.7%と今回のヒラメでの検出率よりも明らかに高い結果が報告されている。ヒラメの種苗生産には親魚として放流種苗の遺伝的多様性確保の観点から天然魚を養成した親魚が用いられているが、今回の調査では親魚候補となる天然魚から高率にはNNVは検出されなかった。しかしながら、検出率は低いものの今回の調査で天然魚からウイルスが検出された。この事実は、キジハタと比べるとその可能性は非常に低いと言えるが、親魚候補群となるヒラメ天然魚が汚染源となり得る可能性を示唆していると考えられた。

### 2-2 親魚餌料のNNV保有調査

前述の通り近年、数種の天然魚からNNVが検出され

ていることから、疫学調査の一環として餌料となる天然魚9種について、NNV保有状況を調査し、餌料を介した感染が成立する可能性の有無を検討した。

#### 1) 検査試料

種苗生産機関で通常親魚養成用の餌料として使用されている、あるいは今後餌料の対象となる可能性があるマアジ、マサバ、カタクチイワシ、イカナゴなど9魚種を入手した(表Ⅲ-5)。検査には、これら魚介類から取り出した眼球の網膜組織および脳を用いた。

#### 2) PCRによる検出

ウイルスRNAは、市販のRNA抽出試薬 (ISOGEN) を用いて抽出し、RT-PCRおよびnested PCRは、前述(Ⅱ章; Ⅲ章)の方法に準じて実施した。

#### 3) 調査結果

調査した魚種のうちマアジ、マサバおよびウルメイワシよりNNVが検出された(表Ⅲ-5)。検出されたウイルスの遺伝子型については、マアジおよびウルメイワシからはSJNNVタイプ、マアジ、マサバおよびウルメイワシからはRGNNVタイプのウイルスが検出された。特にマアジについては、nested PCRで高いものでは50%と高率に検出され、RT-PCRにおいても陽性となる個体が数多く認められた。これ以外の6魚種(カタクチイワシ、キビナゴ、イカナゴ、チカ、サンマおよびスケ

表Ⅲ-5 餌料魚のウイルス性神経壊死症原因ウイルス保有状況の調査結果

魚種名	水揚場所	検査尾数 (平均全長)	陽性率(%)		
			RT-PCR	nested PCR	
				SJNNV Type	RGNNV Type
マアジ	岩手	62(12.1cm)	1.6	6.5	3.2
		30(16.6cm)	23.3	50.0	33.3
	大分	30(20.3cm)	30.0	50.0	10.0
		60(ND) 60(19.3cm)	18.3 11.7	50.0 28.3	3.3 33.3
マサバ	岩手	39(27.4cm)	0	0	17.9
	大分	30(28.9cm)	0	0	3.3
ウルメイワシ	大分	30(15.5cm)	0	6.7	6.7
カタクチイワシ	岩手	30(11.8cm)	0	0	0
		60(14.0cm)	0	0	0
		60(10.4cm)	0	0	0
キビナゴ	大分	60(10.4cm)	0	0	0
イカナゴ	岩手	30(16.2cm)	0	0	0
チカ	岩手	30(16.7cm)	0	0	0
サンマ	岩手	30(33.4cm)	0	0	0
スケトウダラ	岩手	30(11.0cm)	0	0	0

TPNNV型, BFNNV型のウイルスは何れからも検出されなかった。NDは未測定。

トウダラ)については、今回の調査を行った限りではNNVは検出されなかった。

#### 4) まとめ

今回の調査では、BFNNVタイプとTPNNVタイプの遺伝子型のウイルスは何れの魚種からも検出されなかった。宮古センターのヒラメのNNVと同型になるBFNNVタイプのウイルスは、ここではデータを示さないが、他の調査において、マアジ、ニギスから検出されており、SJNNVタイプやRGNNVタイプのウイルスと同様にBFNNVタイプのウイルスもこれらの餌料となる天然魚が保有しているものと考えられた。

以上の結果、ベータノダウイルスが天然魚から検出されたことから、この様な天然魚を親魚等の餌料として種苗生産場に導入した際にはVNNの感染源になる可能性が示唆された。親魚餌料からの水平感染対策としては、①親魚餌料は配合飼料、あるいはやむを得ない場合(親魚候補として天然魚を入手した直後の餌付けが必要な時期など)は検査陰性の餌料魚を使用すること、②さらに生の魚を扱う場合、調餌場などから種苗生産施設へウイルスの汚染が拡大しないように、調餌場や親魚水槽から種苗生産水槽を隔離することや、調餌する作業者が種苗生産水槽での給餌作業などを行わないよう担当者を区分するなどの対策が必要と考えられた。

(森 広一郎)

### 3 受精卵の消毒方法

SJNNVでは次亜塩素酸、塩化ベンザルコニウムおよびヨウ素では50mg/ℓの濃度で10分間の浸漬処理、加熱処理では60℃で10分間、pH12のアルカリ液では10分間の処理、紫外線では $1.0 \times 10^5 \mu W \cdot sec/m^2$ で、海水をオゾンで処理することによって発生するオキシダ

ント(Total residual oxidants : TROs)では、0.1mg/ℓで2.5分、0.5mg/ℓで0.5分、で不活化されるとの報告がある(表Ⅲ-6 : Arimoto *et al.*, 1996 ; 有元, 1996)。ヒラメのNNVの感染経路は明らかになっていないものの、この様なウイルスを不活化できる薬剤を用いて、感染経路の一つとして考えられる垂直感染を防除するために受精卵の消毒を行い、その経路を遮断する対策を講じることが必要と考えられる。

これまでに、五島栽培漁業センター、上浦栽培技術開発センターでは、シマアジのVNN防除対策として親魚選別と平行してオキシダントを用いた卵消毒を行い、防除に成功している(Mori *et al.*, 1998)。シマアジと同様にオキシダントに対する感受性が確認されているマツカワでは、オキシダント濃度0.5mg/ℓの海水に、桑実期の受精卵を5分間浸漬することによって、VNNの防除に成功している(Watanabe *et al.*, 1988)。また、受精卵は発生段階が桑実期であればオキシダント濃度0.5mg/ℓの海水に最長15分間浸漬しても、ふ化に悪影響を及ぼさないと報告されている。

オキシダント海水による消毒により、防除効果が明らかになっていない魚種の受精卵を消毒する場合、最大限の消毒効果を得るためにもオキシダントの濃度と浸漬時間はふ化に悪影響を及ぼさない範囲で、可能な限り高い濃度で長時間浸漬することが望ましい。しかし、オキシダントは、強い酸化力で病原性微生物のタンパク質等を損傷させ、不活化させてしまうもので、高濃度のオキシダントは受精卵に対する毒性も強く、シログス、ストライプトバス、ヒラメ、大西洋タラ、ターボット、ハリバットでは、過剰な濃度のオキシダントはふ化に悪影響を及ぼすことが報告されている(磯野ら, 1998 ; Hall *et al.*, 1981 ; 三村ら, 1988 ; Grotmol *et al.*, 2003)。

このため、本章ではオキシダント海水による卵消毒を

表Ⅲ-6 SJNNVの化学的、物理的処理による不活化条件

処理方法	処理量	処理時間
次亜塩素酸ナトリウム	50 $\mu g/ml$	10min
次亜塩素酸カルシウム	50 $\mu g/ml$	10min
塩化ベンザルコニウム	50 $\mu g/ml$	10min
ポビドンヨード	50 $\mu g/ml$	10min
クレゾール	10mg/ml	10min
アルコール(エタノール)	60%	10min
熱処理	60℃	10min
UV処理	410 $\mu W/cm^2$	4min
オゾン(オキシダント)	0.1 $\mu g/ml$	2.5min

(Arimoto *et al.*, 1996, 有元, 1995)

ヒラメの種苗生産現場で実用化することを目的に、ヒラメ受精卵を用いてオキシダント濃度と浸漬時間を変えて卵消毒を行い、これがふ化率に及ぼす影響について検討した。また、現状では海水のオゾン処理装置普及率はまだ低くことから、ヨード剤（ポビドンヨード）を用いた消毒試験も同時に行った。なお、このヨード剤については、現在サケ科魚類のみでしか効能・効果が認められていないことから、水産用医薬品としてそれ以外の水産動物に使用することは出来ない。ここでは、ヨード剤が将来的に効能拡大されることを期待し、試験に用いることにした。

### 3-1 試験方法

#### 1) 供試卵

採卵には宮古センターで養成した天然魚（雌11尾、雄5尾、平均全長41.8cm）を用いた。供試卵はこれらが4月初旬の産卵開始から産卵数がピークを迎える6月下旬までの産卵期前半の期間の5月15日および後半の6月10日に産卵したものを使用した。なお、供試卵の発生段階は桑実期であった。

#### 2) オキシダント海水およびポビドンヨード剤の調製

オキシダント海水は無声放電式オゾン発生機（荏原実業製）で発生させたオゾンガスを反応槽（オゾンバリアOZF-003；荏原実業製）内で砂ろ過海水に注入して作製した。オキシダント濃度はオゾンガスの発生量で調整し、濃度の測定はオキシダント濃度が0.5mg/ℓ以下の場合には分光光度計（DR-2000, HACH社製）を用いた $\alpha$ -トリジン法（大橋の変法）を用い、0.5~1.0mg/ℓの範囲ではヨウ素滴定法によって行った（三村ら、1988；大橋ら、1994）。

ポビドンヨード剤は市販品（水産用イソジン液10%、明治製菓製）を用い、処方に従ってオキシダント処理海水（砂ろ過海水をオキシダント濃度1.0mg/ℓで処理後、活性炭で無毒化）で希釈して消毒液の調製を行った。消毒液中の有効ヨウ素濃度の測定は日本薬局方の局外規定のポビドンヨード定量法に準拠して行った（「ポビドンヨード」日本薬局方解説書編集委員会編、2000）。

#### 3) 供試卵の前処理

採卵時には供試卵の他に様々な夾雑物が混ざって回収されるため、試験開始前にオキシダント処理海水をかけ流し、夾雑物の除去を行った。なお、採卵時の水温が15℃であったため、供試卵の前処理、消毒、ふ化管理時の水温は15℃に調温した。

#### 4) オキシダント海水による消毒試験

卵消毒試験の概要を図Ⅲ-3および4に示した。試験は合計2回行った。両試験は何れも、オキシダント濃度を0（対照区）、0.10、0.25、0.50、0.75および1.00mg/ℓに調製した6区を設定した。供試卵は各濃

度のオキシダント海水を満たした50ℓポリカーボネート製角型水槽に設置したナイロン製観賞魚用ネットに、約200粒ずつ収容した。オキシダント海水への浸漬時間はいずれの試験区も1、2、3、5、10および15分間の6段階とし、浸漬中は供試卵に常時一定濃度のオキシダント海水を接触させるため、内径5mmのビニールホースを用いてネット内に毎分500mlのオキシダント海水を注入した（図Ⅲ-3）。

浸漬が終了した供試卵はネットごとオキシダント処理海水をかけ流した500ℓポリカーボネート製円型水槽に移し、3分間放置して卵表面のオキシダントを洗い流した。その後、供試卵はカナマイシン硫酸塩5mgと共に1,000mlのオキシダント処理海水が入ったポリエチレン製容器に移して密栓し、ふ化管理を行った。なお、ふ化管理中は500ℓ水槽の海水を攪拌して容器を常時振盪させた。

試験は対照区の卵がすべてふ化した時点で終了し、終了時には各容器にホルマリン原液を20mlずつ添加して試料を固定した。なお、試験中のオキシダントの減衰を調べるため、試験開始時と15分間浸漬区の処理が終了した時点の海水を採水し、オキシダント濃度を測定して減衰率を算出した。減衰率は、減衰率（%）=（（試験開始時の濃度-試験終了時の濃度）/試験開始時の濃度）×100によって算出した。

#### 5) ポビドンヨード剤による消毒試験

試験区は有効ヨウ素濃度を25、50および75mg/ℓに調製した3区を設定した。試験方法は卵を浸漬する際に消毒液を止水状態にした以外はすべてオキシダント海水の場合と同一とした（図Ⅲ-3,4）。また、ポビドンヨード剤でも、試験開始時と15分間浸漬区の処理が終了した時点の海水を採水し、有効ヨウ素濃度を測定して減衰率を算出した。

#### 6) 試験結果の判定方法

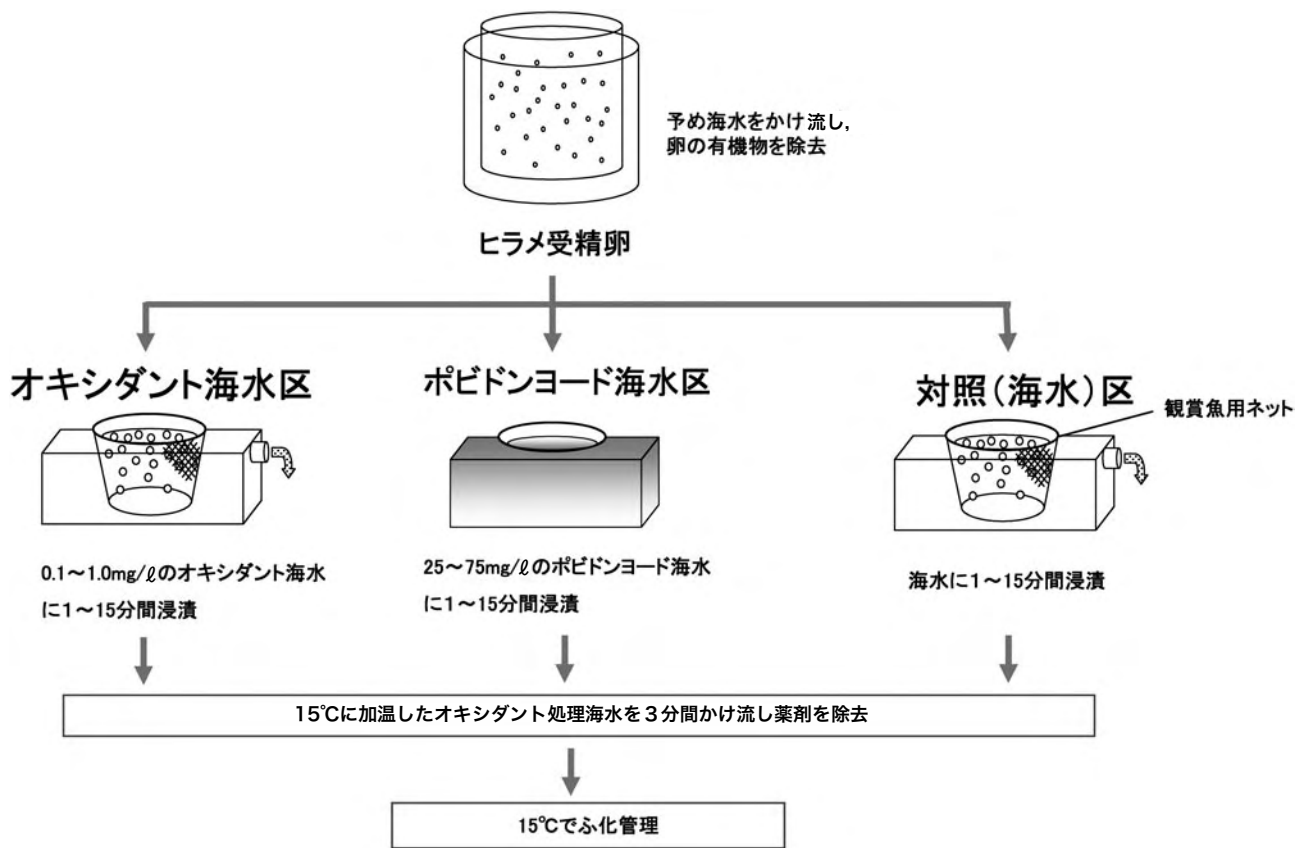
ホルマリン固定した試料は群ごとにふ化仔魚、未ふ化生残卵（透明でふ化直前の状態であるが、ふ化していない卵）、死卵（白濁した卵）に区分して計数を行い、以下のようにふ化率、未ふ化生残卵発生率および死亡率それぞれを算出した。なお、未ふ化生残卵は、以後もふ化することなく卵内で胚発生が停止し、死卵となることが確認されている。

$$\text{ふ化率}(\%) = \text{ふ化仔魚数} / \{(\text{ふ化仔魚数} + \text{未ふ化生残卵数} + \text{死卵数})\} \times 100$$

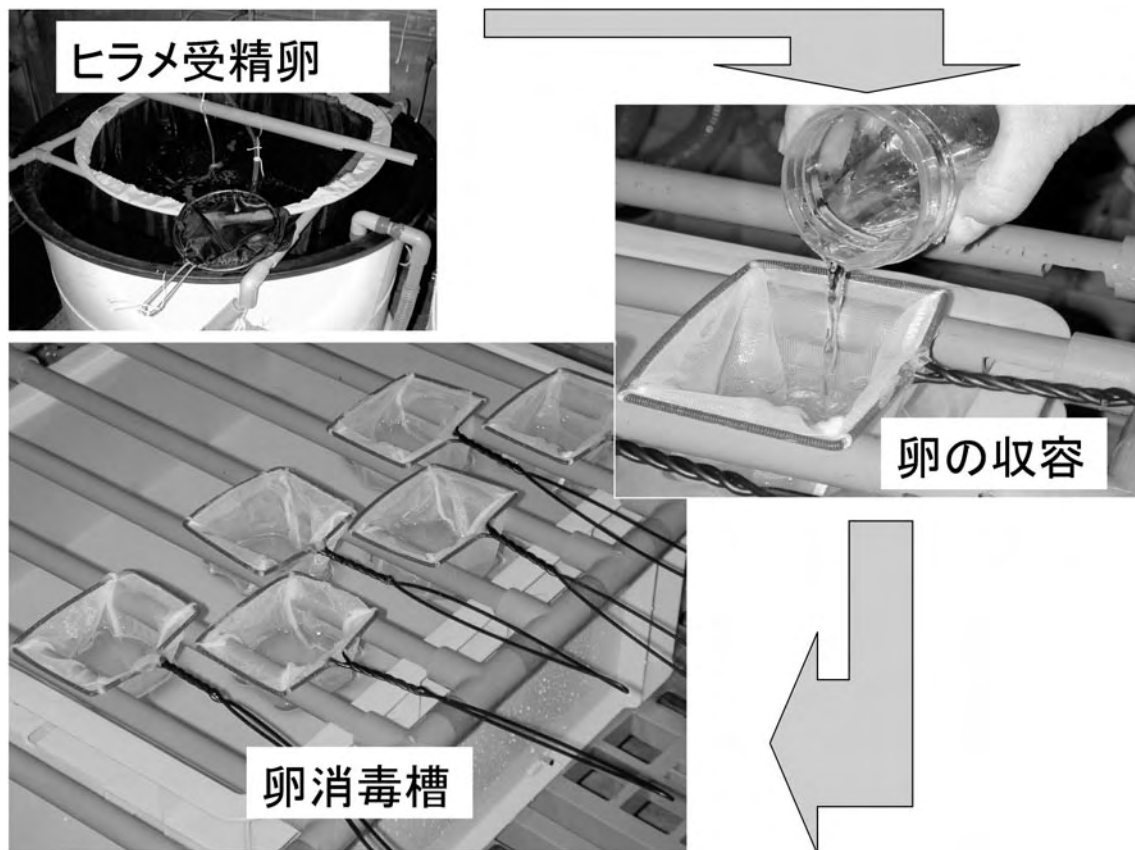
$$\text{未ふ化生残卵発生率}(\%) = \text{未ふ化生残卵数} / \{(\text{ふ化仔魚数} + \text{未ふ化生残卵数} + \text{死卵数})\} \times 100$$

$$\text{死亡率}(\%) = \text{死卵数} / \{(\text{ふ化仔魚数} + \text{未ふ化生残卵数} + \text{死卵数})\} \times 100$$

統計処理は、1回目、2回目のふ化率について、それぞれ二元配置の分散分析を行い、浸漬濃度および浸漬時間の各因子間の交互作用の有無をF検定で判定した。交



図Ⅲ-3 受精卵の消毒試験の作業概要



図Ⅲ-4 卵消毒試験の実施風景

相互作用が認められた場合は、浸漬時間毎に一元配置の分散分析を行い、薬剤濃度の効果をF検定で判定した。判定の結果、有意差が認められた水準は、*t*検定により、対照区と平均値の差の検定を行った。また、交互作用の発生に伴い、統計処理の際の誤差の分布に歪みの有無を確認する目的でふ化率を逆正弦変換した値を求めて、同様の統計処理を施し、変換前の値と検定結果を比較した。以上の統計処理の危険率は5.0%とした。なお、未ふ化生残卵発生率および死亡率は統計処理の対象から除外した。

### 3-2 試験結果

#### 1) オキシダント海水による消毒試験

(ふ化率) 浸漬濃度別、浸漬時間別のふ化率を表Ⅲ-7に示した。ふ化率は1回目、2回目のいずれにおいても浸漬濃度と浸漬時間の各因子間で相互作用が認められた。生残率のデータの大部分が30~70%の範囲外にあり、等分散性が失われるおそれが考えられたため、ふ化率の逆正弦変換値で再度、二元配置の分散分析を行い、百分率の検定結果と比較した。その結果、両者には差が認められなかったことから、統計処理の誤差の分布には歪みが生じていないものと判断し、ふ化率は百分率で表記した。

ふ化率はオキシダント濃度が高く、浸漬時間が長い試験区ほど低くなり、0.75mg/ℓ区では浸漬開始後3分以降、0.50、0.25mg/ℓ区では5分以降から低下した。そして、最もオキシダント濃度が高かった1.00mg/ℓ区のふ化率は、浸漬時間が2分に達した時点で1回目が58.3%、2回目が20.6%まで急激に低下した。

1回目の試験でふ化率が80%以上を示したのは対照区および0.10mg/ℓ区のすべての浸漬群、0.25および0.50mg/ℓ区の1~5分間浸漬群、0.75mg/ℓ区の1、2分間浸漬群、1.00mg/ℓ区の1分間浸漬群であった。また、2回目では対照区および0.10mg/ℓ区のすべての浸漬群、0.25mg/ℓ区の1~10分間浸漬群、0.50mg/ℓ区の1~3分間浸漬群、0.75および1.00mg/ℓ区の1分間浸漬群でふ化率が80%を上回った。

ふ化率が対照区のそれより有意に低かったのは、1回目では1.00mg/ℓ区の2分以降、0.75mg/ℓ区の5分以降、0.50mg/ℓ区の10分以降の浸漬群であり、2回目では1.00mg/ℓ区の1分以降、0.75mg/ℓ区の1分および5分以降、0.50mg/ℓ区の1分および15分、0.25mg/ℓ区の15分間浸漬群であった。また、この他に浸漬濃度毎でも一元配置の分散分析を行い、有意差の認められた水準について、1分間浸漬群のふ化率を基準に*t*検定による有意差の検定を行った。その結果、各試験区のふ化率の有意性は前述の浸漬時間毎の検定結果と同一の傾向を示すことを確認した。

(未ふ化生残卵出現率) 浸漬濃度別、浸漬時間別の未ふ

化生残卵発生率を表Ⅲ-8に示した。未ふ化生残卵出現率はふ化率の変動とは逆の変動を示した。すなわち、オキシダント濃度が高く、浸漬時間が長いほど未ふ化生残卵の出現は高率になる傾向を示した。特にオキシダント濃度が0.50mg/ℓ以上の試験区では、オキシダント濃度と浸漬時間が1回目の試験と同一条件であっても、2回目の未ふ化生残卵出現率は1回目のそれよりも高くなった。特に0.75、1.00mg/ℓ区の10、15分間浸漬群では未ふ化生残卵出現率は90.2~95.6%で推移した。(死亡率) 死亡率はふ化率や未ふ化生残卵出現率に比べて浸漬濃度別、浸漬時間別で顕著な差は認められず、1回目が0.7~18.4%、2回目では1.0~11.6%で推移した(表Ⅲ-9)。

#### 2) ポビドンヨード剤による消毒試験

(ふ化率) 浸漬濃度別、浸漬時間別のふ化率を表Ⅲ-10に示した。ふ化率は1回目、2回目のいずれの試験でも有効ヨウ素濃度が高く、浸漬時間が長い試験区で値が低下した。しかし、その幅は小さく、統計処理の結果では、いずれの試験区でも対照区との間に有意差は認められなかった。ふ化率は1回目の試験が67.9~97.7%、2回目の試験では87.2~97.2%で推移した。

(未ふ化生残卵出現率) 未ふ化生残卵出現率は1回目の試験の75mg/ℓの15分間浸漬区で最高28.7%を示したが、他の試験区のそれはいずれも低く、0.0~7.9%で推移した(表Ⅲ-11)。

(死亡率) 死亡率は1回目の試験の75mg/ℓの10分間浸漬区が最高13.6%を示し、他の試験区では1.6~9.6%で推移した(表Ⅲ-12)。

#### 3) オキシダント濃度および有効ヨウ素濃度の減衰状況

試験中のオキシダントおよび有効ヨウ素の減衰状況をそれぞれ表Ⅲ-13と表Ⅲ-14に示した。2回目の試験で著しく、特に消毒剤の設定濃度が低い試験区ほど、減衰率は高くなった。最も減衰が著しかったのは、2回目の試験のオキシダント濃度0.10mg/ℓ区の57.3%、有効ヨウ素濃度25.0mg/ℓ区の29.6%であった。これに対し、1回目の試験の減衰率はオキシダントでは2.2~7.3%、有効ヨウ素では、1.9~6.7%といずれも低い値で推移した。

### 3-3 まとめ

今回の試験結果からヒラメ卵の消毒では産卵期前半の桑実期の卵を用いた場合、オキシダント濃度1.00mg/ℓで1分間、0.75mg/ℓで2分間、0.25~0.50mg/ℓで5分間までの浸漬であれば、無処理の卵と同程度のふ化率が得られることが明らかとなった。これは、胚体形成期の卵でオキシダント濃度0.8mg/ℓ、浸漬時間3分間以内、もしくはオキシダント濃度1.0mg/ℓ、浸漬時間1分間以内の浸漬であれば、ふ化への影響は少ないとされる既報の結果ともほぼ一致した(三村

表Ⅲ-7 オキシダント海水に浸漬したヒラメ卵の浸漬濃度別、浸漬時間別でのふ化率

試験区分	浸漬時間 (分)	ふ化率 (%)					
		対照区* <sup>1</sup>	残留オキシダント濃度 (mg/ℓ)				
			0.10	0.25	0.50	0.75	1.00
1	1	86.7	92.4	95.2	95.1	96.9	93.9
	2	92.0	92.7	95.6	93.5	92.8	58.3 *
	3	91.6	91.6	89.1	91.0	77.0	38.1 *
	5	93.1	95.5	91.3	85.8	22.4 *	2.1 *
	10	92.0	91.3	68.7	43.1 *	7.2 *	2.1 *
	15	93.2	97.5	65.7	25.3 *	5.8 *	15.9 *
2	1	94.5	96.5	92.3	87.5 *	87.7 *	89.2 *
	2	94.4	96.8	93.8	85.3	78.8	20.6 *
	3	95.6	97.3	95.2	84.9	70.0	18.2 *
	5	95.0	95.7	94.6	75.0	22.5 *	17.8 *
	10	94.5	95.2	85.1	63.6	4.9 *	2.9 *
	15	95.8	94.0	76.6 *	3.6 *	2.3 *	5.4 *

\*<sup>1</sup>オキシダント処理海水（残留オキシダント1.0mg/ℓに10分間曝露後、活性炭で無毒化した砂ろ過海水）を使用

\*対照区のふ化率と有意差あり（t検定p<0.05）

■；ふ化率80%以下

表Ⅲ-8 オキシダント海水に浸漬したヒラメ卵の浸漬濃度別、浸漬時間別での未ふ化生残卵出現率

試験区分	浸漬時間 (分)	未ふ化生残卵出現率 (%)					
		対照区* <sup>1</sup>	残留オキシダント濃度 (mg/ℓ)				
			0.10	0.25	0.50	0.75	1.00
1	1	10.8	4.6	1.1	1.2	1.6	1.3
	2	2.9	1.3	0.0	2.4	4.8	37.8
	3	2.7	6.5	0.2	5.1	19.4	30.2
	5	1.6	0.9	0.6	11.0	76.3	94.6
	10	2.6	5.0	25.2	55.5	87.4	95.6
	15	4.2	1.8	15.9	73.1	91.4	82.0
2	1	1.6	1.6	3.1	10.6	10.0	7.0
	2	2.1	1.6	2.9	13.2	19.8	77.4
	3	1.9	1.7	3.3	12.8	29.0	70.3
	5	2.4	3.1	2.5	21.9	74.6	77.1
	10	1.2	3.6	12.3	31.8	90.2	94.1
	15	1.2	4.0	20.5	93.7	95.6	91.4

\*<sup>1</sup>オキシダント処理海水（残留オキシダント1.0mg/ℓに10分間曝露後、活性炭で無毒化した砂ろ過海水）を使用

表Ⅲ-9 オキシダント海水に浸漬したヒラメ卵の浸漬濃度別、浸漬時間別での死亡率

試験区分	浸漬時間 (分)	未ふ化生残卵出現率 (%)					
		対照区* <sup>1</sup>	残留オキシダント濃度 (mg/ℓ)				
			0.10	0.25	0.50	0.75	1.00
1	1	10.8	4.6	1.1	1.2	1.6	1.3
	2	2.9	1.3	0.0	2.4	4.8	37.8
	3	2.7	6.5	0.2	5.1	19.4	30.2
	5	1.6	0.9	0.6	11.0	76.3	94.6
	10	2.6	5.0	25.2	55.5	87.4	95.6
	15	4.2	1.8	15.9	73.1	91.4	82.0
2	1	1.6	1.6	3.1	10.6	10.0	7.0
	2	2.1	1.6	2.9	13.2	19.8	77.4
	3	1.9	1.7	3.3	12.8	29.0	70.3
	5	2.4	3.1	2.5	21.9	74.6	77.1
	10	1.2	3.6	12.3	31.8	90.2	94.1
	15	1.2	4.0	20.5	93.7	95.6	91.4

\*<sup>1</sup>オキシダント処理海水（残留オキシダント1.0mg/ℓに10分間曝露後、活性炭で無毒化した砂ろ過海水）を使用



表Ⅲ-10 ポビドンヨード海水に浸漬したヒラメ卵の浸漬濃度別、浸漬時間別でのふ化率

試験区分	浸漬時間 (分)	ふ化率 (%)			
		対照区* <sup>1</sup>	有効ヨウ素濃度 (mg/ℓ)		
			25	50	75
1	1	86.7	96.4	90.9	83.1
	2	92.0	97.2	97.7	93.2
	3	91.6	96.2	95.0	91.1
	5	93.1	97.0	94.7	95.3
	10	92.0	96.9	86.4	84.9
	15	93.2	95.7	88.8	67.9
2	1	94.5	91.8	89.4	92.1
	2	94.4	96.9	97.2	94.3
	3	95.6	96.3	96.6	95.7
	5	95.0	95.4	91.5	93.9
	10	94.5	91.1	87.2	93.5
	15	95.8	95.4	93.7	88.5

\*<sup>1</sup>オキシダント処理海水（残留オキシダント1.0mg/ℓに10分間曝露後、活性炭で無毒化した砂ろ過海水）を使用

\*対照区のふ化率と有意差あり（t検定p<0.05）

■；ふ化率80%以下

表Ⅲ-11 ポビドンヨード海水に浸漬したヒラメ卵の浸漬濃度別、浸漬時間別での未ふ化生残卵出現率

試験区分	浸漬時間 (分)	未ふ化生残卵出現率 (%)			
		対照区* <sup>1</sup>	有効ヨウ素濃度 (mg/ℓ)		
			25	50	75
1	1	10.8	0.7	3.8	7.5
	2	2.9	0.4	2.9	1.4
	3	2.7	0.2	3.1	4.9
	5	1.6	0.4	3.0	1.0
	10	2.6	0.9	4.0	1.4
	15	4.2	0.0	2.4	28.7
2	1	1.6	3.4	3.3	1.8
	2	2.1	0.8	1.0	1.4
	3	1.9	1.2	0.4	1.0
	5	2.4	1.6	3.4	3.0
	10	1.2	5.8	7.9	2.3
	15	1.2	3.0	3.8	5.4

\*<sup>1</sup>オキシダント処理海水（残留オキシダント1.0mg/ℓに10分間曝露後、活性炭で無毒化した砂ろ過海水）を使用

表Ⅲ-12 ポビドンヨード海水に浸漬したヒラメ卵の浸漬濃度別、浸漬時間別での死亡率

試験区分	浸漬時間 (分)	死亡率 (%)			
		対照区* <sup>1</sup>	有効ヨウ素濃度 (mg/ℓ)		
			25	50	75
1	1	2.5	2.9	5.3	9.3
	2	5.1	2.4	2.4	5.4
	3	5.8	3.6	1.9	4.0
	5	5.3	2.6	2.3	3.4
	10	5.4	2.2	9.6	13.6
	15	2.3	4.3	8.9	3.4
2	1	3.9	4.8	7.3	6.1
	2	3.5	2.3	1.7	4.3
	3	2.5	2.6	3.0	3.4
	5	2.6	3.0	5.1	3.2
	10	4.3	3.1	4.9	4.2
	15	3.0	1.6	2.5	6.1

\*<sup>1</sup>オキシダント処理海水（残留オキシダント1.0mg/ℓに10分間曝露後、活性炭で無毒化した砂ろ過海水）を使用

表Ⅲ-13 卵消毒試験中のオキシダントの減衰状況

試験区分	薬剤の種類	薬剤濃度 (mg/ℓ)			減衰量 (%)	減衰率* <sup>1</sup> (%)
		設定濃度	浸漬開始前	浸漬終了後		
1	対照区* <sup>2</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0
	残留オキシダント濃度	0.10	0.11	0.10	0.01	7.3
	〃	0.25	0.25	0.24	0.01	5.1
	〃	0.50	0.51	0.50	0.01	2.2
	〃	0.75	0.76	0.74	0.02	3.2
	〃	1.00	1.07	1.00	0.07	6.5
2	対照区	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0
	残留オキシダント濃度	0.10	0.12	0.05	0.07	57.3
	〃	0.25	0.25	0.13	0.12	47.0
	〃	0.50	0.50	0.35	0.14	28.7
	〃	0.75	0.76	0.66	0.10	13.0
	〃	1.00	1.03	0.93	0.10	10.1

\*<sup>1</sup>(浸漬開始前濃度-浸漬終了後濃度) / 浸漬開始前濃度 × 100

\*<sup>2</sup>オキシダント処理海水（残留オキシダント1.0mg/ℓに10分間曝露後、活性炭で無毒化した砂ろ過海水）を使用

表Ⅲ-14 卵消毒試験中のヨード剤の減衰状況

試験区分	薬剤の種類	薬剤濃度 (mg/ℓ)			減衰量 (%)	減衰率* <sup>1</sup> (%)
		設定濃度	浸漬開始前	浸漬終了後		
1	対照区* <sup>2</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0
	有効ヨウ素濃度	25.0	11.9	11.1	0.80	6.7
	〃	50.0	28.6	26.7	1.90	6.6
	〃	75.0	42.3	41.5	0.80	1.9
2	対照区	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0
	有効ヨウ素濃度	25.0	15.2	10.7	4.50	29.6
	〃	50.0	30.1	25.4	4.70	15.6
	〃	75.0	54.6	52.9	1.70	3.1

\*<sup>1</sup>(浸漬開始前濃度-浸漬終了後濃度) / 浸漬開始前濃度 × 100

\*<sup>2</sup>オキシダント処理海水（残留オキシダント1.0mg/ℓに10分間曝露後、活性炭で無毒化した砂ろ過海水）を使用

ら、1998)。しかし、1回目の試験より約1ヶ月遅れて採卵した卵を用いた2回目の試験のオキシダント濃度0.50mg/ℓ以上の試験区では、オキシダント濃度と浸漬時間の条件が1回目の試験と同じでも、ふ化率は1回目より低下していることから、ふ化率は、消毒を施す卵が産卵期間中のどの時期に産出されたか、あるいは産卵個体によって変動することが伺える。ふ化率が80%以上を示した試験区が占める領域を安全領域、80%未満のそれを回避領域とした場合、後者は対照区のふ化率と有意差が生じた試験区が占める領域とほぼ一致する。したがって、この領域で消毒を施した場合、ふ化率はほぼ確実に対照区の水準に達しないと判断できる。

一方、安全領域では80%以上のふ化率が保証されるものの、消毒時のオキシダント濃度と浸漬時間は、病原体に対する十分な殺菌、不活化効果を保証するものではない。このため、消毒はできるだけ回避領域の近くで施すことが望ましいが、逆に接近しすぎた場合には薬剤の影響を受けて、ふ化率が低下する危険性が高くなるため、注意が必要である。また、消毒を施した卵から確保した種苗の健全性の問題は、安全なふ化率を維持することとは異なる問題を含んでおり、ヒラメ卵の消毒を施す水準と、この水準で生産された種苗の健全性の問題との関係追跡は今後の重要な課題である。

ヨード剤による消毒では、産卵期前半の桑実期の卵を用いた場合、有効ヨウ素濃度75mg/ℓで10分間までの浸漬であれば、80%以上のふ化率が得られることが明らかとなった。また、ヨード剤ではオキシダント海水の試験結果とは異なり、2回目の試験でも、1回目と同様にふ化率が低下することはなかったことから、ヨード剤では今回の試験で設定した濃度よりも、より高い濃度での消毒が可能であることが予想され、より病原体の殺菌、不活化効果を高められる可能性が示唆された。

これまでヒラメ卵のヨード剤に対する耐性については有効ヨウ素濃度50mg/ℓで10分間、同10mg/ℓ以下で10分間、同100mg/ℓで15分間と報告されている（松田ら、1988；佐藤ら、1994；中野・開、1992）。これらの報告には卵の発生段階に関係なく、低濃度の有効ヨウ素によってふ化率が低下したり、卵の発生段階によってふ化率が大幅に変動した事例、高濃度の有効ヨウ素を含む消毒液に長時間浸漬しても90%以上のふ化率が保持された事例などがあり、今回の結果も含めて一様の傾向は見い出せていない。

ヨード剤に対する受精卵の耐性は、ヒラメ以外にもシマアジ、マダイ *Pagrus major*、ホシガレイ *Verasper variegatus* などで報告されている（Hirazawa *et al.*, 1999）。各々の魚種のふ化率に影響を及ぼさない最高濃度と最長浸漬時間は、シマアジが有効ヨウ素濃度80mg/ℓで15分間、マダイが桑実期の卵で有効ヨウ素濃度200mg/ℓで5分間、ホシガレイが心臓拍動開始時

期の卵で75mg/ℓで15分間とされており、ふ化率は卵の発生段階、産卵時期によっても変動すると報告されている。すなわち、シマアジでは、発眼期の卵を有効ヨウ素濃度80mg/ℓ以上の濃度で消毒した場合に、ふ化率が低下し、マダイでは産卵初期の卵を消毒すると、ふ化率の低下とともに、得られたふ化仔魚の飼育成績にも影響が及ぶとされている。また、ホシガレイでは受精後1時間目、眼胞形成期、クッパー氏胞形成期に消毒を施すことにより、ふ化率の低下を招くと指摘されている。このため、マダイやホシガレイでは、消毒時の卵質もふ化率に影響を及ぼす要因のひとつとして考えられている。ヒラメでは、このような現象を確認した報告例がないが、同様の現象が起こっている可能性も考えられるため、今後はヨード剤を用いる場合も含めて、消毒後の卵から確保した種苗の健全性の問題と、消毒を施す水準の関係については検討しておく必要がある。

今回の試験ではオキシダント海水、ヨード剤のいずれの薬剤で消毒を施した場合でも、薬剤濃度の減衰は1回目よりも2回目の試験で高かった。使用した海水や、供試卵は同じであったことから、減衰は海水に含まれる有機物によって変化した可能性が考えられる。オキシダント海水やポビドンヨード剤を用いて卵を消毒する以上、薬剤濃度の減衰は避けて通ることはできない問題であり、これは消毒効果を大きく左右する。特に、実際の種苗生産に使用する規模の卵数で、消毒を行う場合は、薬剤の減衰が高まることが予想される。したがって、この場合は消毒を行う前に卵を清浄な海水で洗卵し、可能な限り卵表面および海水中に懸濁している夾雑物を除去するなどの前処理を施すことが重要と考えられる。また、ヨード剤のように、止水状態で消毒を行う場合には、1回当たりの卵数を減らして、卵を含む有機物の絶対量を減らしたり、オキシダント海水では、卵を収容したネット内に海水を直接注ぐなどの処置を施して、卵に消毒剤を効率的に接触させることも有効と考えられる。

## ポイント

- VNN防除対策として、シマアジ、マツカワで有効とされている受精卵の消毒をヒラメに应用するため、オキシダントおよびヨウ素がふ化に及ぼす影響について検討した。
- 産卵期前半と後半のモルラ期の受精卵を用いた試験の結果、産卵期前半では、オキシダント濃度1.0mg/ℓで2分、有効ヨウ素濃度75mg/ℓで15分までの条件であれば、ふ化に影響は認められなかった。
- 一方、産卵期後半では、薬剤濃度が同じでも、短期間の浸漬でふ化率が低下したことから、本種の卵に対して安全な浸漬条件は、産卵時期によって異なることが示唆された。

- オキシダント濃度と有効ヨウ素濃度の減衰状況を調べた結果、薬剤濃度の減衰の割合は、1回目よりも2回目で高く、試験の条件が同じでも、減衰量が変化することが示唆された。
- 卵に消毒剤を効率的に接触させるためには、消毒前に卵を清浄な海水で洗浄し夾雑物を除去することや、ネット内に消毒剤を直接注ぐなどの処置が有効と考えられた。

(太田 健吾)

#### 4 宮古栽培漁業センターにおけるヒラメのVNN防除対策

宮古センターでは、1995年、1996年および1998年においてヒラメの種苗生産過程あるいは後期育成過程において、VNNが発生し、種苗放流ができなくなるなどの多大な被害を受けた。このため早急なヒラメのVNNに対する防除対策の確立が必要になった。

ヒラメのVNNについては感染源およびその伝播経路の特定に至っていないことから、宮古センターのヒラメのVNN対策としては、シマアジやマツカワの事例と同様に垂直伝播と水平伝播の何れに対する対策も必要と考え、ヒラメ親魚養成および種苗生産において、シマアジおよびマツカワのVNN防除技術をもとに、本章で紹介した新に開発した診断法や得られた疫学情報を対策に加え、防除対策を再構築した。即ち、①ウイルスの遺伝型に対応したnested PCRによる親魚の選別、②ヒラメの卵に適切な条件での卵消毒、③オキシダントを用いた飼育用水の殺菌、④親魚の餌にはウイルス検査した安全なもの使用、⑤飼育密度などの飼育環境を再考し適切な飼育および⑥水槽や器具や手足の消毒の徹底などの対策を行い、防除を試みた。

これら一連のVNN防除対策を実施した結果、宮古センターでは過去7年間(1999年～2005年)、ヒラメの種苗生産過程および後期育成過程でVNNは全く発生しなくなった。以下に、これまで取り組んできたヒラメのVNN防除対策の詳細について記す。

##### 4-1 親魚養成におけるVNN防除対策

###### 1) 親魚の養成用餌料

宮古センターでは、過去に宮古湾周辺で漁獲されたマアジを親魚の餌として使用してきた。しかし、本章Ⅲ-2に示すとおり、マアジがNNVと同様のウイルスを保有することが明らかになり、餌のマアジを介したヒラメ親魚または種苗へのウイルス汚染の可能性も考えられたことから、ヒラメ親魚の餌としてマアジの使用を中止した。このため、宮古湾周辺海域で漁獲され、ウイルス検査(nested PCR法)で陰性と判定されたスケトウダラを生餌として使用した。スケトウダラは、魚市場で購

入後直ちに冷凍業者に委託してマイナス20℃以下で海水とともに凍結保存し、ヒラメ親魚への給餌直前に解凍させたものを、週2～3回の頻度で毎回飽食量を給餌した。なお、本来であれば生餌を使用せず、配合飼料などを使用するのが望ましい。

###### 2) 親魚餌料の調餌作業

ウイルス汚染の可能性のある生餌を介した種苗生産場内の汚染を避けるため、ヒラメ親魚の餌に使用している凍結スケトウダラの調餌作業は、専任の担当者が行った。さらに、調餌場と他の飼育施設とを完全に隔離し調餌作業を行った(図Ⅲ-5)。即ち調餌場所への出入り口は1カ所に制限し、出入り口には手指消毒用の消毒用アルコールを設置すると共に、スノコと長靴の踏み込み槽を設置し、長靴の消毒と履き換えを行った。

また、凍結餌料の解凍・調餌作業および親魚への給餌に使用する器具類は、調餌場の専用として、他所への持ち出しを禁止した。凍結餌料の運搬および親魚への給餌作業に使用する台車・ボールおよび、調餌作業後の鮮魚の残材回収用バケツは、親魚水槽などへの運搬経路をそれぞれ制限した。調餌後の残材や残餌はバケツに回収し、生ゴミ処理機(ナショナル業務用生ゴミ処理機MS-N120G、写真Ⅲ-1)で熱処理後に廃棄した。

調理器具類は使用後、洗浄し消毒用アルコール噴霧後、水道水で水洗、乾燥させた。大型の台車等は、塩化ベンザルコニウム10%溶液(市販)を10倍希釈(終濃度1%)シジョウロを用いて消毒後、水洗、乾燥させた。また、ボールおよびバケツは1%塩化ベンザルコニウム液に一定時間浸漬後、水洗、乾燥させた。

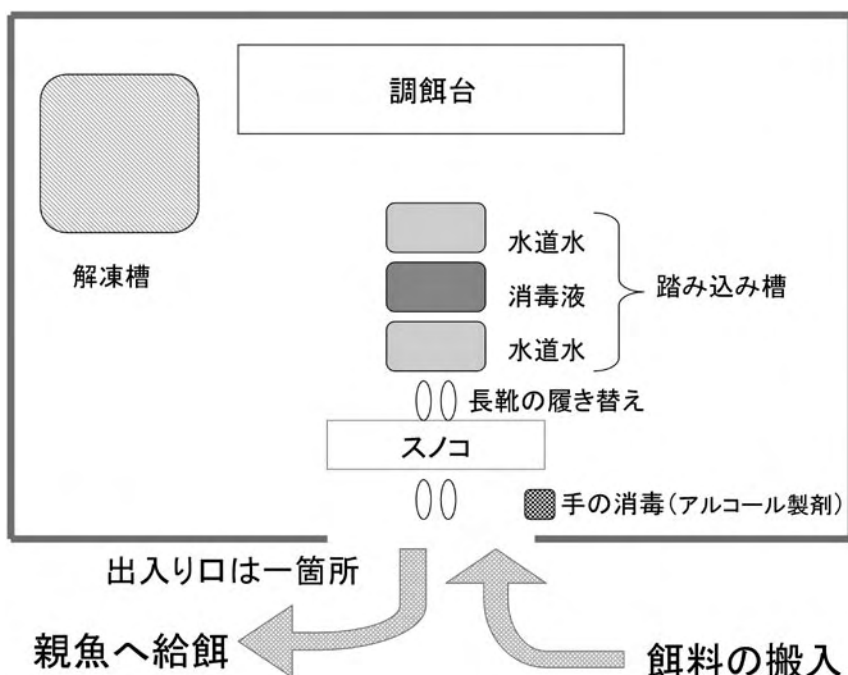
###### 3) 親魚の飼育管理の改善

親魚の飼育水温や収容密度、親魚検査時の魚の取り扱い方など、親魚の飼育管理の見直しを行った。

親魚の収容密度は、シマアジ親魚での事例(虫明2000)を参考に、これまでの収容密度(2.4～8.5kg/



写真Ⅲ-1 廃棄する死亡魚や死卵等を加熱・乾燥処理する生ゴミ処理機



図Ⅲ-5 隔離対策を取った親魚餌料（鮮魚）の専用調餌場

kl) よりも密度を下げ、魚体重で1.0kg/kl以下 (1.0kg/m<sup>3</sup>以下;水深は1m) を収容密度の目安とした(写真Ⅲ-2)。なお、村田(2005)は、一般的なヒラメの親魚の収容密度は1～3尾/kl程度が適切と報告しており報告しており、平均体重が2kgとすると、2～6kg/klの収容密度に相当し、宮古センターはこれよりも低い密度であった。

また、親魚へのハンドリングによる擦れなどを防止するため、検査や移槽時などの作業時にタモ網類は極力使用せず、水位を下げた水槽内にセンター職員が直接入り、胴長・カップ・ゴム手袋等を装着して親魚を個体ごとに丁寧に扱った。親魚を移動させる時は、近距離では少量の海水を入れた発泡スチロール製の角箱に1～2個体ずつ収容し運ぶか、やや遠い距離の移動では0.5～1kl容量の円型パンライト水槽に海水とともに親魚を収容して通気を確保しながらフォークリフトで運んだ。

岩手県北部に位置する宮古センターでは秋季から冬季にかけて海域の水温が低下し、養成水温も10℃以下に下降する。このため、宮古センターでは1月初旬頃以降は、10℃未満に低下しないように飼育水の加温を行った。翌シーズンに使用予定の産卵親魚群の編成は、前年の秋口(9月頃)を目安に行い、加温装置を付属した親魚養成水槽に収容した。また、親魚のウイルス検査は、必要最小減の回数に定め(年間2回)、ハンドリングの回数をできるだけ少なくした(図Ⅲ-6)。

寄生虫の駆除については、ヒラメの体表に寄生するカリグス科(雄)等の寄生虫は、淡水浴を30分間行う方法で駆除し、ネオヘテロボツリウム(未成熟虫)の駆除は、Yoshinaga *et al.* (2000)を参考にし、食塩3%添加海水に30分間浸漬する「濃塩法」と呼ばれる方法を約1ヶ月間隔で2回行った(添付マニュアル参照)。口腔内に寄生するネオヘテロボツリウムやカリグス科の成虫(雌)は、ピンセットを用いて搬入から養成開始までに2回の駆除を行った(写真Ⅲ-3A, B)。なお外部寄生虫の駆除作業は、ヒラメの健康状態、水温、溶存酸素濃度等の条件によって駆除作業中にヒラメが死亡することもあるので、これらの要因を考慮して、ヒラメにとって適水温ではない夏場などに作業は行わないなど、慎重に進める必要がある。特に濃塩法は魚体へのストレスが大きいと思われ、駆除中は魚の状態を観察するなど、特に注意が必要である。

#### 4) PCR法による親魚選別

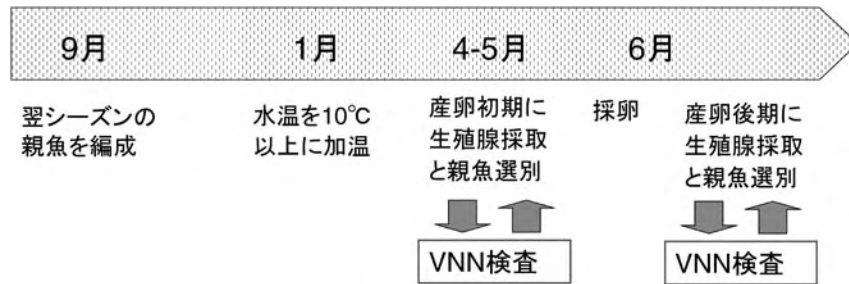
2001年からNNVを保有しない個体を採卵親魚用を使用するため親魚の選別を行った。宮古センターでは、産卵開始を確認後の産卵初期(4～5月)と産卵末期(7月)の2度に分けて、親魚の生殖腺の一部をカニューレ(写真Ⅲ-4, 5)で採取し、上浦栽培漁業センターにて前述のnested PCR法によるVNN検査を実施した。

#### 5) 採卵時期

採卵時期については、Mushiake *et al.* (1994)の報告



写真Ⅲ-2 親魚水槽で養成中のヒラメ親魚



図Ⅲ-6 宮古栽培漁業センターにおけるヒラメ産卵用親魚管理の年間スケジュール



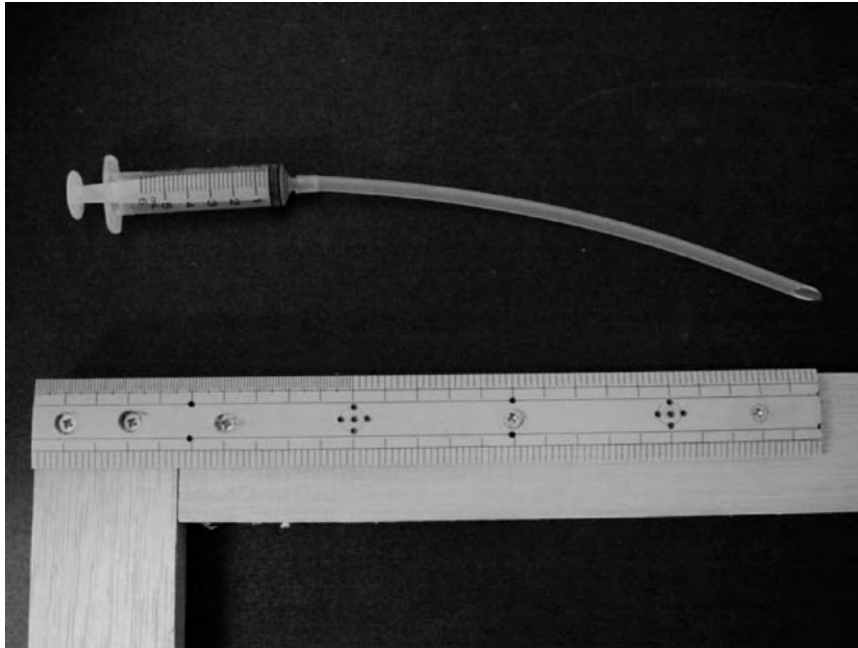
写真Ⅲ-3 親魚候補として市場から搬入し個別管理を行っている天然ヒラメ  
A：個別管理水槽風景，B：個別管理しているヒラメの駆虫作業

で、シマアジについては産卵期後期になると親魚生殖腺のウイルス検出率が上昇することが報告されていることから、種苗生産には、産卵盛期よりも前期（4～5月）に採卵した卵を使用した。1999年は、産卵期のごく初期の卵を生産に用いたが、種苗生産の飼育不調があり、2001年からは、産卵期の前期（産卵開始から1週間程度経た時期）に前述のPCR法による検査結果を確認した後、卵を採取し生産に供した。

#### 6) 採卵結果

1999年から2002年までの宮古センターにおける親魚養成および採卵結果を表Ⅲ-15にまとめた。

1999年は、Ⅱ章で報告したELISAによる選別基準に基づき、新規親魚候補魚として天然ヒラメの確保と養成を行い生産に成功したものの、2000年の産卵前に実施したELISA検査において殆どの親魚が抗体価陽性となった。このため、2000年は保有するヒラメ親魚をはじ



写真Ⅲ-4 ヒラメ親魚の生殖孔から生殖腺の一部を採取するために使用するカニユレ



写真Ⅲ-5 カニユレを用いたヒラメ親魚の生殖孔から生殖腺の採取作業



め若齢魚の全数処分し、同年の種苗生産を中止した。

2001年から、2000年に親魚候補魚として新たに搬入した親魚を用い、開発したnested PCRによる生殖腺の検査により親魚を選別した。その結果、陽性個体は認められず、十分な受精卵を確保することができた。2002年も同様にnested PCRにより親魚を選別した。その結果、陽性個体は認められず、十分な受精卵を確保することに成功した。

#### 7) 受精卵の洗浄

VNNの垂直伝播を防止する目的で、宮古センターの飼育施設内に設置したオゾンバリア（OZF003型、写真Ⅲ-6）を使用して、オキシダント海水を作製し、卵の洗浄を行った。

採卵時に、卵は海水とともに回収するが、夾雑物が混ざっていることが多い。本章のⅢ-3でも触れた通り、この様な夾雑物（有機物）が消毒成分の濃度低下を引き起こすため、オキシダント海水による卵消毒の前に、かけ流したオキシダント処理海水中で合計3分間の洗浄を行った。夾雑物除去後、卵消毒には0.75mg/ℓのオキシダント海水をかけ流した小型水槽中で合計2分間の洗浄を行っている。その後、再び流水状態のオキシダント処理海水中で洗浄し付着した薬剤を洗い流した（図Ⅲ-7、写真Ⅲ-7）。

卵の消毒に使用するオキシダント海水のオキシダント濃度は、オゾンバリアのオゾンガスの発生量あるいは処理海水量を操作し調整した。海水中のオキシダント濃度の測定は、分光光度計を用い、o-トリジン法（現在はDPD法）により行った。なお卵の洗浄に用いるオキシダント処理海水およびオキシダント海水の水温は、産卵時期の親魚水槽および採卵槽の水温と同じ15℃に調節した。

#### 8) 卵およびふ化仔魚の管理

受精卵のふ化管理は、受精卵を上述のとおりオキシダ



写真Ⅲ-6 オキシダント海水を調製するオゾンバリア

ント海水で消毒後、受精卵をポリカーボネート製アルテミアふ化槽（容量500ℓ）に收容し、15～16℃に調温したオゾン処理海水中でふ化させた（換水率50%、2～3日間）。0.5kℓアルテミアふ化器で卵管理中は、適宜、沈下卵の除去を行った。回収した沈下卵・死卵はオキシダント海水中（オキシダント濃度0.75mg/ℓ）で消毒後、生ごみ処理機を用いて熱処理後に廃棄した。

#### 9) まとめ

感染症は、宿主と寄生体のバランスが崩れた結果として起こる。よって、魚が本来持っている生体防御能を効率的に引き出すには、日常の飼育管理を充実させ、良好な健康状態を維持する必要がある。親魚養成では、シマアジのVNN防除対策で指摘されているように、いかにして親魚にストレスをかけず、生体内でウイルスを増殖させない飼育管理手法を開発するかが重要である（虫明ら、1993、Mushiake *et al.*, 1994、虫明・有元、2000）。

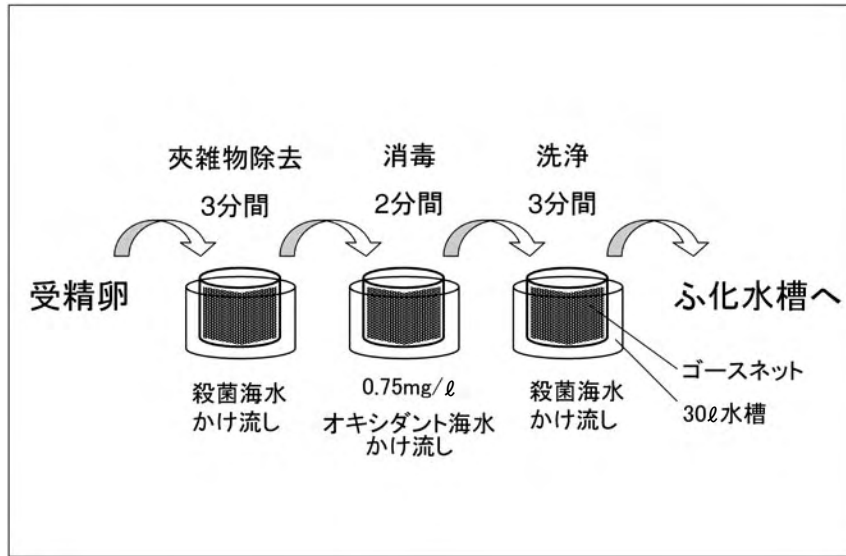
また、VNNウイルスを保有しない親魚を適切な時期

表Ⅲ-15 1995年から1998年の親魚の養成状況と採卵結果

年度	使用種苗 生産回次	由来 (推定年齢)	尾数	平均体重 (kg)	収容密度 (kg/kℓ)	総採卵数 (万粒)	受精率*1 (%)	親魚選別(陽性率%) ELISA nested PCR	種苗生産でのVNNの 発生の有無	
1999	1, 2	天然魚 (5～7)	♀ : 11	2.47	0.37	8,870	78.6	36.0	ND	無
			♂ : 14	1.2						
2001	1, 2	天然魚 (4～5)	♀ : 39	1.17	0.65	16,060	70.9	ND	0	無
			♂ : 14	0.95						
2002	1	天然魚 (4～5)	♀ : 40 ♂ : 11	0.71	3.23	19,493	80.1	ND	0	無

飼育水は紫外線殺菌処理海水。飼育水の加温は自然水温が8～9℃を示す1月上旬から開始し、2月下旬までに12℃、3月下旬には13～14℃に調整した。4月以降は15℃を維持した。産卵水槽は30～80kℓ円型RC水槽を用いた。ND：未実施。2000年は、ELISA陽性個体が多く採卵を中止した。

\*1：総採卵数に対する受精率、\*2：受精卵におけるふ化率



図Ⅲ-7 オキシダント海水によるヒラメ受精卵の洗浄方法



写真Ⅲ-7 オキシダント海水を用いたヒラメ受精卵の卵消毒作業

に選別するとともに、親魚の生体内のVNNウイルス増殖量ができるだけ少ないと考えられる時期に種苗生産に使用する採卵を行うことが重要と考えられている。シマアジでは、PCR陰性と判断された個体でも多回産卵後にPCR陽性に転じる個体の存在が知られ、親魚が受けるストレスによりウイルスの増殖が起こり易くなるとの報告がある（虫明ら，1993，Mushiake *et al.*，1994）。同様に、宮古センターでは、産卵期間中のヒラメ親魚体内でのVNNウイルスの増殖を間接的に捉えるために本ウイルスに対する抗体価を調査したことがあるが、産卵開始から産卵末期にかけて抗体価は徐々に高くなる傾向が見られた（山田，未発表）。以上のことからヒラメにおいてもシマアジと同様に産卵期の初期に採卵した卵を種苗生産に用いることがより安全であると考えられる。

2000年までは、ELISAによる抗ウイルス抗体の検出により親魚の選別を行っていたが、陽性と診断される個体が多く認められ親魚の確保が困難な状況になった。最近、Kim *et al.* (2007) によって、ヒラメなどの魚種において、ELISAで抗体検出を行うとバックグラウンドが高く、再現性が低くなることが明らかにされ、サンプル血清を予めブロッキング剤と反応させるような手法の必要性が報告されている。2000年まで宮古センターの親魚検査で、ELISAによって陽性と診断される個体が多く認められたことは、この様な、高いバックグラウンドを捉えていた可能性もあり、ELISAによる親魚選別を行う際には留意が必要である。

また、今回報告したように、nested PCRによりヒラメ親魚を検査したが、陽性個体は検出されなかった。宮古センターの親魚検査では、その後2007年の現在まで、陽性となった個体は検出されていない。他の栽培漁業センターで飼育されている親魚についても同様に検査しているが、年によっては、全体の2%弱の親魚の生殖腺からウイルスが検出された事例もある。

前述の通り、NNVの汚染のない餌料を使用することは極めて重要である。宮古センターでは現在、親魚の餌としてスケトウダラを使用しているが、たとえPCR検査でNNV陰性と判断されたとしても、検出限界以下の極微量のウイルスが存在する可能性もあり、完全にウイルスフリーであるとは断言できない。今後は、製造時のエクストルーダで発生する熱により、仮に材料にウイルス混入していたとしても不活化されていると考えられる配合飼料（EP）の使用も視野に入れる必要がある。配合飼料を用いた親魚の養成については、配合飼料を使用

し養成したヒラメ親魚から得られた卵を用い種苗生産試験が実施され、生餌を使用したものと比べ遜色のない結果が得られている（本藤ら2006）。搬入天然魚の餌付けの問題は残されているものの、今後は生餌から配合飼料への移行に関する技術の確立が期待される。

## ポイント

親魚養成におけるVNN防除対策として、以下の対策を実施した。

- ① NNVを保有しない産卵親魚をnested PCRにより選別
- ② 親魚がウイルスを保有していたとしても生体内のNNV保有量が少ないと考えられる産卵期の前期に採卵
- ③ ふ化に影響が無く、より強い条件でオキシダントに暴露できるよう、適切な条件を設定し、卵消毒を実施
- ④ 親魚の餌料は、NNVが感染していない可能性が高いものを使用
- ⑤ ハンドリングや飼育密度の低減などのストレスを減らす産卵親魚の養成管理を実施
- ⑥ 親魚は、定期的に更新し、長期間の養成を回避

（山田 徹生）

## 4-2 種苗生産過程における対策

### 1) 飼育水槽等の洗浄

各種消毒剤の特徴と使用方法および殺菌対象別の消毒剤使用例をそれぞれ表Ⅲ-16および表Ⅲ-17にまとめた。ヒラメ種苗生産の開始前、終了時および種苗生産中の水槽の消毒は、次亜塩素酸ナトリウムを有効塩素濃度100mg/ℓになるように調製した海水で一晩満たし、翌日、チオ硫酸ナトリウムで中和後に、水洗・乾燥させた。水槽のドレン口、エプロン部分通路（歩み板も含む）は、上述の塩素海水を、ジョウロ等を用いて散布した。塩素消毒には、塩素用マスク、長靴・ゴム手袋およびカップを着用し、換気を良くして作業した。

また、宮古センターでは、ヒラメ種苗生産期に先立ち、取水施設の砂ろ過槽（写真Ⅲ-8A～C）内のろ剤およびろ過海水を配水する高架水槽内を、次亜塩素酸ナトリウムを有効塩素濃度100mg/ℓになるように溶解させ一晩曝気した後、チオ硫酸ナトリウムで中和し、十分な水洗を行った。

### 2) 飼育用水の殺菌

飼育用水からの水平感染対策として、宮古センターでは、シマアジ等で実績のあるオゾン処理による飼育用水の殺菌処理を行った。飼育用水の殺菌には、センターの飼育施設内に設置されたオゾンバリア（荏原実業株式会社製 無声放電型OZF015型：写真Ⅲ-9A, B）を使用した。本装置から得られたオキシダント処理海水を、飼育水に添加する前に一旦60kℓ角型水槽に貯水し、15℃

表Ⅲ-16 各種消毒剤の特徴と使用方法

薬品名	塩化ベンザルコニウム	消毒用アルコール (エタノールなどアルコール製剤)	次亜塩素酸ナトリウム (あるいはカルシウム)	グルタラール (グルタールアルデヒド)
市販製品での濃度	10%など	76.9～81.4%など	10%など	25% (水産用)
使用濃度 (希釈倍率)	0.1% (10%場合, 100倍)	原液で使用	25ppm～100ppm (10%の場合, 4000～1000倍)	500ppm～1250ppm (500～200倍)
NNV不活化 濃度および時間	50ppm, 10min	60%, 10min	50ppm, 5～10min 25ppm, 30min 100ppm, 5min	未報告
使用対象例	手指 <sup>*1</sup> , 器具, 長靴など	手指 <sup>*2</sup> , 器具など	器具, 長靴, 水槽など	器具, 長靴など
使用方法	浸漬, 散布, 噴霧, 清拭	噴霧, 清拭	浸漬, 散布, 清拭	浸漬
留意事項	・腐食性は弱い。有機物により消毒効果が影響される。 ・石けん(陰イオン界面活性剤)と混合すると効力がなくなる。	・プラスチックやゴムの材質によっては劣化を引き起こす。引火するおそれ有り。 ・皮膚の乾燥化を引き起こす。 ・メタノールを含有するものは、手指の消毒には使用できない。	・金属の腐食, プラスチックやゴムの材質によって劣化を引き起こす。腐食のおそれがある場合はよく洗い流す。 ・有機物により消毒効果が著し影響される。 ・蒸気を発生する。マスク, メガネ, 手袋を着用し, 皮膚等に付着しないよう作業する。 ・使用した消毒剤はチオ硫酸ナトリウムで中和し廃棄する。 ・塩素ガスが発生するので酸性洗剤と併用しない(禁忌)。	・腐食性はない。 ・有機物により消毒効果は殆ど影響されない。 ・蒸気を発生する。マスク, メガネ, 手袋を着用し皮膚等に付着しないよう作業する。 ・使用した消毒剤は亜硫酸水素ナトリウムで中和し廃棄する。
一般的な殺菌能力	弱い	強い	特に強い	特に強い

(参考資料: Arimoto *et al.*, 1996, Frerichs *et al.*, 2000, 「魚類防疫への挑戦」委員会, 1993, 神谷・尾家, 1992)

\*1: 手指の消毒用のものが市販されている, \*2: 保湿成分が入ったものも市販されている

表Ⅲ-17 水槽、飼育器具類等の洗浄・殺菌例

洗浄・殺菌対象	消毒方法*1	使用薬剤例*2
水槽	溜めた海水に消毒剤を添加	HA
	ジョウロでの掛け流し	BC, GA, HA
プラスチック用具(バケツなど)・ 金属器具(包丁, ハサミ, など)・ガラス器 具(ピーカーなど)	消毒槽に浸漬	BC, GA, HA
	噴霧	BC, AL
	清拭	BC, GA, AL, HA
テーブル	噴霧	BC, AL
	清拭	BC, GA, AL, HA
たも網	消毒槽に浸漬	BC, GA, HA
カップ, ゴム手袋	消毒槽に浸漬	BC, GA, HA
	噴霧	BC, AL
長靴	消毒槽に浸漬(踏み込み槽など)	BC, GA, HA
手指	噴霧	BC, AL,
活魚トラック	ジョウロでの掛け流し	BC, GA, (HA)*3
	噴霧	BC, AL
VNNが発生した際の水槽	溜めた海水に消毒剤を添加	HA
	ジョウロでの掛け流し	GA, HA
〃 飼育水	消毒剤を添加	HA
〃 病魚	ネットで回収	何れも不適 生ゴミ処理機(加熱)で処理や 焼却が望ましい

BC: 塩化ベンザルコニウム, GA: グルタルール, AL: 消毒用アルコール, HA: 次亜塩素酸ナトリウム(あるいはカルシウム)

\*1: 消毒剤によっては, 有機物により効力が低下するため, 可能であれば消毒前には洗浄する。

\*2: VNN病魚を扱った器具は, より強い殺菌力を有する薬剤での消毒が望ましい(一般的な殺菌力:GA>HA>AL>BC)。

\*3: HAは腐食性が強いので, 使用する場合は活魚水槽のみに使用する。

に加温し, エアブロックを用いて十分に曝気した後に, 卵管理水槽または飼育水槽に送水した。オキシダント処理海水の水量不足から, 種苗生産試験における処理海水の使用期間は毎年の試験設定により若干異なるが, 宮古センターにおいて過去(1998年)にVNNの発生が見られた日齢88まで(8月中旬まで)を使用した。それ以降は, 未殺菌のろ過海水による飼育に切り替えて, 種苗放流を目的としたヒラメ稚魚の後期育成を行った。

また, ワムシの培養に用いる海水は海水からのウイルスの侵入を遮断する目的で, オキシダント処理海水かあるいは次亜塩素酸で消毒し(100mg/ℓで一晩), チオ硫酸ナトリウムで中和したものを用いた。

アルテミア卵のふ化および栄養強化に用いる海水も, 同様にオキシダント処理海水かあるいは塩素消毒後中和したものを用いた。

なお, 飛沫によるVNNの水平感染を防止するため, 水槽背面および側面をビニールシートで覆い, 通路を隔てた水槽外からの飛沫が混入するのを防止するとともに, 生産水槽間を遮断し, 飛沫による水平感染の防止策を講じた(図Ⅲ-8)。

### 3) 飼育担当者の施設への進入方法

ヒラメ飼育試験および種苗生産施設において, 施設の入りにスノコを常設し, 飼育担当者および専任のパート職員は, 施設内と施設外の長靴を区別し, 毎回の履き替えを行った(写真Ⅲ-10)。スノコ上で施設外用の長靴から施設内用の長靴を履き替え, 1)水道水の入った水槽でまず長靴についた汚れを落とし, 2)1%塩化ベンザルコニウム液の入った水槽で消毒し, 最後に3)水道水の入った水槽で薬剤を落として施設内に進入した。施設外に出る場合においても, 1)~3)の逆の順序で施設内と施設外用の長靴を履き替えた(図Ⅲ-9)。

その他の施設に進入する場合には, 長靴の履き替えは行わないが, 施設への進入は上述の1)~3)の順序で長靴の消毒を行い, 施設内から施設外に出る際は1)~3)の逆の順序で行った。

それぞれの施設出入り口およびヒラメ仔稚魚の飼育水槽の出入り口には消毒用アルコールの入った噴霧容器を常備し, 出入りの際に, 手・指の消毒を行った。

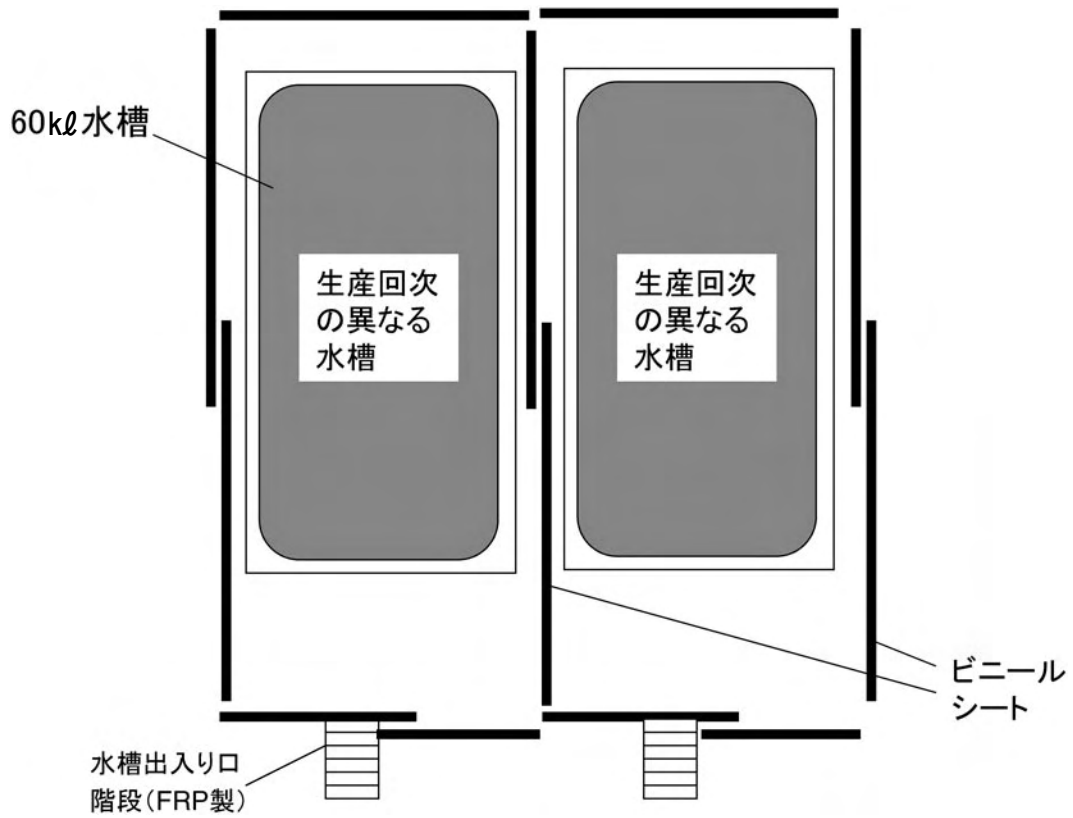
なお, 長靴の消毒用に踏み込み槽に使用する薬剤は1%塩化ベンザルコニウム溶液を使用し, 溶液の汚れ具



写真Ⅲ-8 センターの飼育用水のろ過装置  
A：圧力ろ過装置，B：重力ろ過装置，C：高架型の貯水槽



写真Ⅲ-9 飼育用水をオキシダントで殺菌処理するオゾンバリア  
A：オキシダント発生器を内蔵する制御盤  
B：オキシダント反応・吸着槽（右）と処理水貯水槽（左）



図Ⅲ-8 種苗生産水槽における飛沫感染防止用ビニールシートの設置事例



写真Ⅲ-10 飼育水槽入り口に設置した長靴の履き替え・消毒場所

合を見ながら 3～7 日間をめぐりに薬剤を交換した。

4) 飼育に使用する器具、道具および長靴の殺菌・洗浄  
ホース・バケツ類・プラスチックカップ等の飼育道具、ピーカーなどガラス器具および包丁など調理用具は、水槽ごとに専用に設置し、使用後は洗浄し、次亜塩素酸ナトリウムあるいは塩化ベンザルコニウムで消毒した(表Ⅲ-16, 17を参照)。

5) 底掃除で吸い出された仔稚魚の取り扱いと器具類の規制

底掃除で一旦水槽外に吸い出されたヒラメ仔魚は、活魚・死魚の計数後、全個体を廃棄し、ごみ処理機を用い処分した。底掃除で使用した器具は、すべて水槽毎に区分し、器具使用後は洗浄・殺菌処理後、乾燥後に再使用した。

6) 生産種苗のVNN検査

種苗生産期間中は、定期的に受精卵、仔稚魚を採取・保存し、VNN検査用のサンプルとした(表Ⅲ-18)。仔稚魚は、飼育0～40日目までは5日間隔、40日目以降は10日間隔で20～30尾を採取し、低温保存(-80℃)した。これらの仔稚魚のVNNウイルスの検査は、前述のPCR法(RT-PCR nested PCR)により行った。また種苗生産取り揚げ時、種苗放流前には一群60尾を、PCR法(nested PCR)により検査し、陰性であることを確認後、放流あるいは配付を行った。

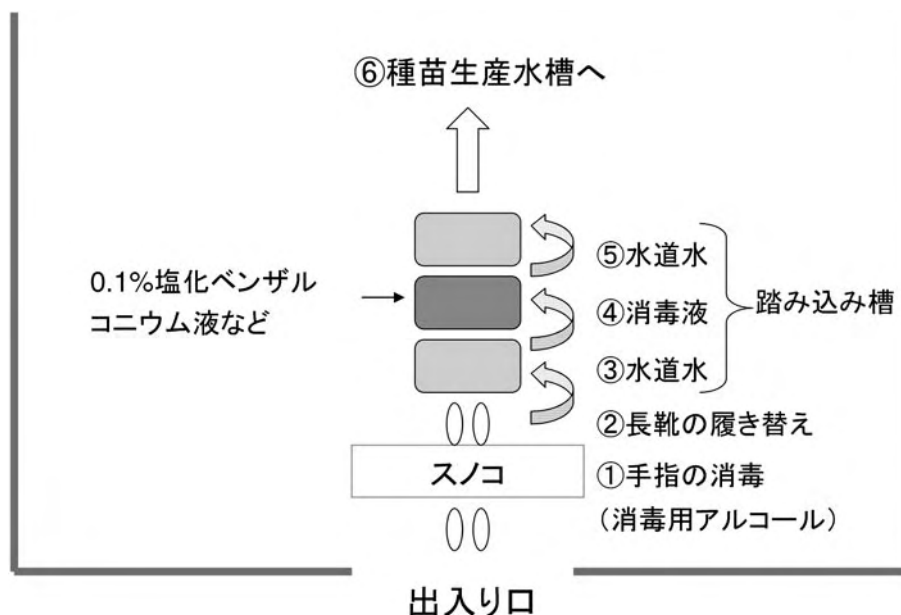
7) 種苗生産結果

ヒラメ種苗生産を行った各年の飼育成績等の概要を以下に示した(表Ⅲ-19)。1999年、2001年および2002年

においてもVNNは発生せず、防除に成功した。1999年は、ふ化仔魚を6月8～11日の期間に収容し飼育を開始し、オキシダント処理海水を飼育水として使用した生産区では8月9日に平均全長19.5mmの種苗16.4万尾(生残率32.8%)、水平感染に関する試験の対照として無処理のろ過海水を飼育水として使用した生産区では8月10日に平均全長19.2mmの種苗15.2万尾(生残率27.6%)を取り上げた。同年は、例年と比較して、両試験区においても飼育初期から仔稚魚の成長・発育の遅れが生じた。また何れの事例についてもVNNは発生しなかった。

すでに述べたとおり、VNNの垂直伝播対策を考慮しながらも、良質な受精卵を種苗生産用に確保することを前提とした採卵時期を選択するため、2001年からは産卵のごく初期に得た卵の種苗生産での使用はせず、産卵盛期の前期(産卵開始から1週間程度経過した時期)に得られた卵を種苗生産用に使用した。また、採卵した卵の受精率・ふ化率および飼育初期の減耗状況のモニタリングを行ない、良質な卵およびふ化仔魚の確保につとめた。これらの対策により、2001年以降は良質な受精卵が充分量得られるようになり、1999年に見られたような卵質によると思われる種苗生産の不調はその後見られなくなった。

2001年のヒラメ種苗生産において、オキシダント処理海水を飼育水として使用した生産区の生残は59.1%、無処理のろ過海水を飼育水として使用した生産区は、飼育後半に滑走細菌症による減耗が起り生残率32.3%とな



図Ⅲ-9 ヒラメ飼育関連施設における進入・退出手順  
進入： ①から⑥へ； 退出： ⑥から①へ



表Ⅲ-18 種苗生産したヒラメ仔稚魚のVNNを対象としたウイルス検査の実施スケジュール例

サンプル採取時期	採取サンプル*1	採取尾数(尾)*2	検査部位	検査方法*3
日齢0～40 (5～10日間隔で採取)	冷凍サンプル	20～30	全身あるいは頭部	PCR法
取り上げ時 (稚魚)	冷凍サンプル	60	頭部あるいは 眼球と脳	PCR法
放流あるいは配付時 (稚魚)	冷凍サンプル	60	頭部あるいは 眼球と脳	PCR法
原因不明の大量死亡 発生時	冷凍サンプル 固定サンプル (必要に応じ冷蔵サンプル)	各20～30	VNN用は、頭部あるいは 眼球と脳 その他は適宜選択	ウイルス分離 細菌検査 PCR法 組織観察など

\*1：冷凍サンプルは、-80℃で保存し、検査機関への送付時にはドライアイスを入れ輸送する。固定サンプル用の固定液は、検査に応じ適宜選択する。固定液の調製方法は、添付マニュアルを参照。また、細菌検査等が必要な場合は、冷蔵サンプルも採取する。詳細については、検査を担当する各都道府県の魚病担当者に相談する。

\*2：生産回次毎あるいは水槽毎に指定尾数を採取する。

\*3：原因不明の大量死亡が認められた場合の検査内容については、検査を担当する各都道府県の魚病担当者に相談する。

表Ⅲ-19 1999年から2002年の種苗生産の飼育方法と取り揚げ結果

年度	生産回次	収容尾数 (万尾)	収容密度*1 (万尾/kℓ)	分槽の有無	取揚尾数 (万尾)	生残率*4 (%)	採卵親魚の由来	親魚の更新	PCRによる親魚の選別	受精卵の消毒法	低密度飼育*5	VNNの発生	VNN以外の飼育不調の有無
1999	1*2	50.0	1.00	無	15.2	27.6	天然魚 (5～7才)	○	×	×	○	陰性	成長の遅れ
	2	50.0	1.00	〃	16.4	32.8	〃	○	×	キシダント 0.75mg/ℓ ×2分	○	陰性	〃
	合計	100.0	1.00	無	31.6	31.6	天然魚 (5～7才)	○	×		○	陰性	成長の遅れ
2001	1*2	61.0	1.22	無	19.7	32.3	天然魚 (4～5才)	○	○	×	○	陰性	滑走細菌症
	2	60.0	1.20	〃	35.5	59.1	〃	○	○	キシダント 0.75mg/ℓ ×2分	○	陰性	
	合計	121.0	1.21	無	55.2	45.6	天然魚 (4～5才)	○	○		○	陰性	
2002	1*3	89.0	1.78	有	36.4	40.9	天然魚 (5～6才)	×	○	キシダント 0.75mg/ℓ ×2分	○	陰性	白化個体出現
	合計	89.0	1.78	有	36.4	40.9	天然魚 (5～6才)	×	○	キシダント 0.75mg/ℓ ×2分	○	陰性	白化個体出現

\*1：水槽は50kℓ角型RC水槽を使用した。

\*2：1999年、2001年の1回次は、試験対照区とし未殺菌海水で飼育を行った。

\*3：オキシダント処理海水を飼育水に使用して飼育を開始したが、6.5～6.18に合計3回の分槽を行い、分槽先の飼育水は未殺菌る過海水に切り替えた。

\*4：密度調整のため途中20万尾を間引いており、それを勘案して生残数を算出した。

\*5：2万尾/kℓ以下を低密度飼育とした。

○：実施，×：未実施

った。

2002年は、オキシダント処理海水を飼育海水として使用し、仔稚魚の成長に伴う分槽の過程で順次無処理のろ過海水による飼育に切り替える種苗生産を行った。この結果、飼育57～59日目で平均全長33.5mmサイズの種苗36.4万尾を取り上げ、生残率は40.9%であった。なお、同年の種苗生産では、有眼側体色異常（白化）個体の出現が非常に目立った。特に取り上げ時までオゾン処理海水で長期間飼育した水槽ほど白化魚の出現率が高くなり（83.1%）、課題が残された。

2001年、2002年ともに、1999年と同様な無処理のろ過海水を飼育水として用いた対照区を試験区として設定したが、何れの事例についてもVNNは発生しなかった。（山田 徹生）

#### 4-3 後期育成過程における対策

##### 1) 取り上げと後期育成

種苗生産の取り上げ後、選別用小割網に残った稚魚は重量法による計数を行いながら、隣接する60kl角型コンクリート水槽（8.0×4.8×1.6m、実水量50kl）内に設置した小割網（目合160径：3.45×2.95×深さ1.20m）にバケツリレーにより移槽した（写真Ⅲ-11）。また後年では、種苗輸送ポンプ（MF21および松坂製作所製：写真Ⅲ-12）を使用し、上述の排水用側溝内に設置した取り揚げ専用容器内のヒラメ種苗を、中間育成用に設置した小割り網まで、ヒラメ種苗を海水とともに直

接輸送する方法も導入した。選別用小割網から抜けた小型の稚魚はそのまま継続飼育し、約1週間後に取り揚げた。取り揚げ後は、60klおよび120kl角型コンクリート水槽を使用した。

飼育用水として日齢88まではオキシダント処理海水を使用し、その後は未殺菌のろ過海水を用い、中間育成期間の小割網の収容密度は、1kl容量あたり全長30～35mmで3000尾、35～40mmで1500尾、40～50mmで1000～1500尾を目安とし、可能な範囲で収容密度の低減と換水の向上をはかった。

##### 2) 種苗輸送用トラックの洗浄

宮古センターでは、外部機関等の種苗輸送用トラックの事業場内への出入り口付近に「トラック洗浄場」を設けており（図Ⅲ-10、写真Ⅲ-13）、トラックは、まずここで消毒を行ってから、センター内の予め指定した種苗積み込みエリアに進入させた。トラックの洗浄には、タイヤや車体の下回りを中心に、ジョウロを使用して0.1%塩化ベンザルコニウム溶液で消毒後、水道水でよく洗い流した。なお同薬剤は弱いながらも腐食性を有することから、金属部の消毒には留意が必要である。

種苗輸送用トラックに付属または積載されている種苗輸送容器内の消毒には、消毒用アルコールを使用し、輸送容器内に噴霧後、水道水またはろ過海水で洗い流した。

##### 3) 外来者の規制

外来者を介して病原体が宮古センターに侵入しないよ



写真Ⅲ-11 種苗生産したヒラメの後期育成水槽への収容作業



写真Ⅲ-12 種苗生産したヒラメを後期育成水槽に輸送する種苗輸送ポンプ

うに、種苗配布時等の外来者には、宮古センターで予め用意した外来者専用の長靴を着用してもらおうと共に、消毒用アルコールによる手指の消毒を実施してもらった。外来者が宮古センター内の見学を希望する場合は、説明順路を決めて案内し、ヒラメ種苗生産期には、ヒラメ親魚養成・採卵施設、卵のふ化管理施設および種苗生産施設への出入りは、ヒラメ担当者以外の職員と同様に立ち入りを制限した。(山田 徹生)

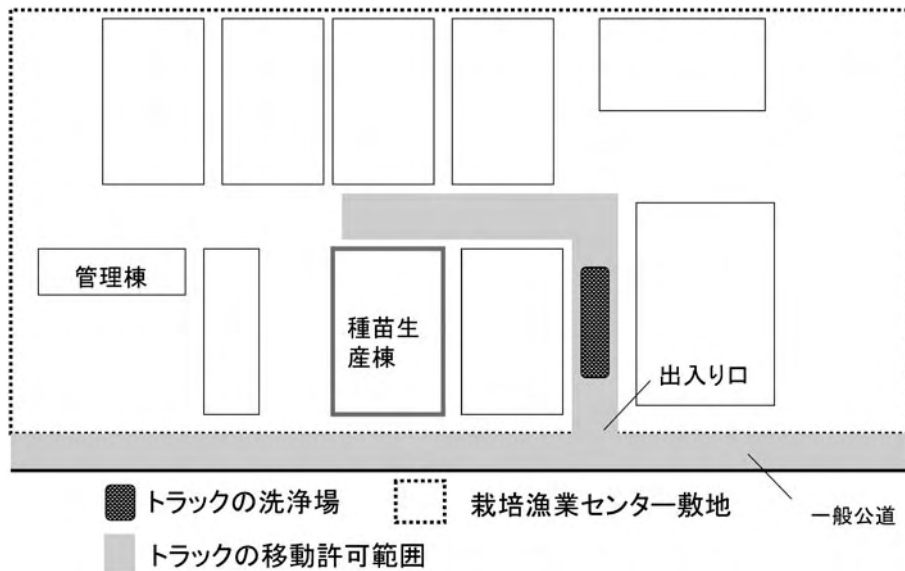
#### 4-4 まとめ

宮古センターでは1996年、1998年にヒラメの種苗生産でVNNが発生したことから、1999年以降、前述の通り、VNNの垂直伝播ならびに水平伝播対策を実施してきた。その結果、宮古センターにおけるヒラメ種苗生産過程では1999年以降、1999年から2002年以降の2007年まで9年間VNNは全く発生しなくなり、ヒラメ種苗(生残および死亡個体)のnestedPCR検査でも全個体がNNV陰性と診断されている。これらの結果から、ヒラメ種苗生産過程でVNNの発生は、未然に防除できたものと考えている。

海産魚介類の種苗生産における水平伝播の防除にあたり、仔稚魚の飼育に用いる海水の殺菌は重要な要素の一つである。VNNウイルスの紫外線感受性は、 $1.5 \times 10^5 \mu W \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ で不活化されると報告されている(Arimoto *et al.* 1996)。この照射量は、通常の低圧型紫外線殺菌装置の能力では十分ではなく、中圧型紫外線殺菌装置を用いる必要がある。一方、紫外線殺菌は光を利用する関係から、水中の懸濁物質の影響や溶存有機物や

鉄イオン量の影響を受ける。さらに、紫外線により損傷を受けた微生物のDNAは、可視光線にあたると修復されることが知られており、低温下では殺菌効果が低下することも知られている(マリノフォーラム21, 1991)。一方オゾンは、無色で特有の臭いを有する気体で、非常に分解しやすい。その発生には無声放電法、電解法、光化学法などが用いられている。中でも酸素を一对の電極間にガラスあるいはセラミックなどの誘導体をはさんで放電させた空間に通してオゾンを発生させる無声放電法が広く用いられている。海水にオゾンを注入することによって期待される効果はアンモニア、亜硝酸、有機物等の酸化や病原微生物の殺菌などであり、活性炭を通過させ残留オキシダントを除去することで病原体フリーの飼育用水を得ることができる(伊藤ら, 1996, 渡辺, 2000)。最近、海水を電気分解することで発生したオキシダントを用いた海水の殺菌装置が、オゾンを用いた殺菌装置に比べると、装置が簡素で故障が少ないこと維持費が余り掛からないことから普及しつつある。この電気分解によるオキシダント殺菌装置については幾つかの魚種で既に使用され、安全性、有効性が確認されていることから飼育水の殺菌装置として期待されている。

1999年、2001年および2002年ともに、水平感染の可能性を把握するため、無処理のろ過海水を飼育水として用いた対照区を試験区として設定したが、何れの事例についてもVNNは発生しなかった。これをもって、感染経路は垂直感染であり、飼育水の殺菌による水平感染は無用であると結論付けるのは時期尚早とおもわれる。しかし、全ての飼育例で取りあげ後の日齢88以降は、殺



図Ⅲ-10 宮古栽培漁業センター内での種苗輸送トラックの規制



写真Ⅲ-13 センター内に設定したトラック洗浄場での作業風景

菌水の水量不足から殺菌海水を使用しておらず、これまでVNNは発生していないことを考えると、同時以降で、宮古のセンターの地先海水を使用すれば、殺菌しなくても、VNNの発生する確率は低いように思われる。種苗生産施設により地先海水のウイルス汚染の程度は異なることが予想されることから、殺菌水を使用するか否かについては十分な調査が必要と考えられる。

採卵時期については、シマアジの事例を参考にして、1999年には、ヒラメ親魚のVNNウイルス保有量が少ないと考えられる産卵期のごく初期の卵を種苗生産に供試したが、VNNは発生しなかったものの、得られた卵は産卵初期には受精率が低く、ふ化率も安定しなかった。またそれらの卵からふ化した仔魚を用いた種苗生産試験では激しい初期減耗、仔稚魚の摂餌不良および顕著な成長遅滞が見られ、種苗生産成績や放流用種苗としての健全性への影響が懸念された。そこで2001年以降は、採卵盛期の前期に採卵した。これにより、1999年に見られたような卵質によると思われる種苗生産の不調は、その後は見られなくなった。

## ポイント

種苗生産および後期育成過程におけるVNN防除対策として、以下の対策を実施した。

- ① 種苗生産に使用する海水は、殺菌海水（オキシダント処理海水）を使用
- ② 飼育密度を低く保つと共に、添加する餌料についても、培養水の殺菌を実施
- ③ 親魚管理と種苗生産の担当者を分け、施設ごとに、長靴・手指の消毒および進入方法を規制
- ④ 飼育に用いる器具・道具を水槽、作業内容ごとに専用化

以上の対策を実施した結果、1999年から2005年までの7年間、ヒラメ種苗生産過程および後期育成過程でVNNの発生は全く認められなくなった。

(山田 徹生)

## IV 今後の技術開発について

### 1 親魚養成技術開発に関わる課題

2000年以降は定期的に、親魚候補として多数の天然ヒラメ活魚をセンター内に搬入している。親魚の搬入はVNNの潜在的な汚染源である天然魚を頻繁に生産場に持ち込み、VNN発生のリスクを増やすおそれがあるので、防疫の観点からは、宿主を極力多くの数を持ち込まない考え方が重要である。一方で、放流種苗においては遺伝的多様性を保持するため、ある程度数の親魚を確保することから、今後は親魚構成やペアリング等を勘案し、決まった親魚数を計画的に搬入・更新し、これらから効率的に採卵できるような技術を開発して行く必要がある。また、宮古湾および周辺海域では、天然魚の加齢に伴って雄が早期に漁場外の産卵場等へ移動するため、搬入親魚の性組成が著しく雌に偏る傾向にある。このため、天然養成親魚の雄個体が不足する事態を招いており、今後、効率的な親魚確保のためには必要な雄親魚を安定的に確保していく方法を検討していく必要がある。

親魚養成では天然魚を購入し親魚として仕立てるため、依然として搬入後の餌付きの不良、外部寄生虫の持ち込み防止対策が主要な課題となっている。特に低温性白点虫症（仮称）については、現状で寄生体の生活史や生態が全く不明であり、このため本症発生時の確たる対処法がない状況となっている。今後、本ウイルス病の対策や遺伝的多様性の保持のため、親魚確保を効率的に行う上で、寄生虫病など他の疾病についても対応した親魚養成技術を確立する必要がある。

近年、海域に分布するマアジ等がVNNウイルスに汚染されていることが判明している。過去にセンターでは近海で漁獲されるマアジ等の生餌を親魚餌料として使用してきた。それらの餌料がVNNの感染源になっているかどうかは現状で不明であるが、その可能性は否定できない。よって、今後は、宮古センターにおいても、生餌に依存した親魚餌料を見直し、配合飼料の利用技術の開発に取り組む必要がある。

### 2 種苗生産技術開発に関わる課題

前述の通り、1999年以降、飼育ヒラメ稚魚の白化の出現が増加し、健全種苗育成面で問題となっている。特に2002年のヒラメ量産試験において海水オゾン処理の期間が長い飼育例ほど白化率が高い傾向が認められ、飼育ヒラメ稚魚の白化出現と海水オゾン処理との関係が疑われた（山田ら、2004）。これまで異体類の白化出現原因に関する研究は数多いが（青海、1990、青海、

1995）、海水オゾン処理と白化出現の因果関係を検討した事例は少ない。わずかに、飼育したマツカワ稚魚において、オキシダント処理海水で飼育すると高率で白化が出現したと報告されているが（渡辺、2000）、海水オゾン処理が白化を助長させる機構は依然未解明である。

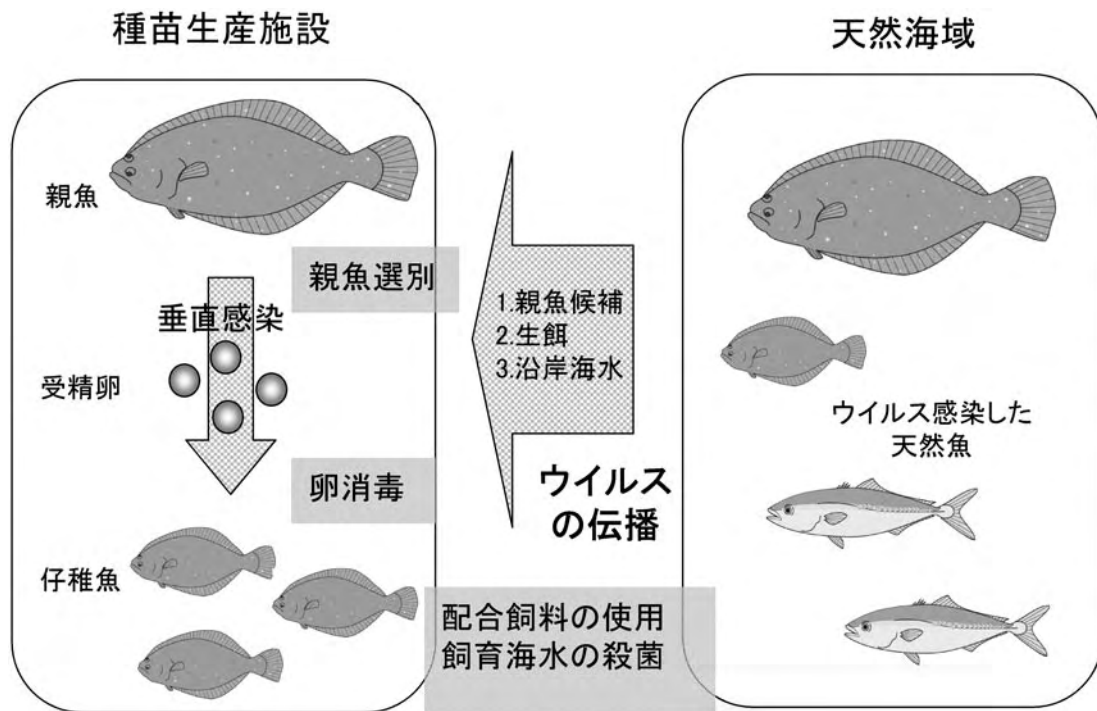
曝気および活性炭を通し、オゾンあるいはオゾンとの反応生成物を取り除いて飼育用水に用いているが、検出限界以下のオキシダントあるいは取り除けなかった何らかの反応物を含む海水を長期間使用した場合の魚毒性の有無の解明や、現状で使用しているオキシダント処理海水に代わる新たな海水殺菌法の開発についても今後検討する余地が残されている。

種苗生産過程で問題となるウイルス病は治療法がないことから、予防法を開発し対処していくしかない。一般的にウイルス病の流行予防を図るには、1) 伝播経路の遮断、2) 感染を助長・防御する環境要因の操作および3) 宿主の免疫力の強化が挙げられ、対象とするウイルスの伝播経路や感染様式を考慮した予防対策を立てていくことが必要とされている。これまでのVNN対策は、1) の伝播経路の遮断に主眼が置かれており、環境要因の操作や宿主の免疫力の強化についてはあまり研究が成されていない。今後は、VNNに対し、より完成した予防対策を構築するため、今回明らかに出来なかった伝播経路および感染様式の詳細の調査を進めると共に、これまでに着手されていない飼育環境要因の操作により感染を防御する方法や免疫力を強化する方法の開発も進めていく必要がある。

### 3 総括

種苗生産過程におけるウイルス性疾病の防除のためには、飼育管理が重要な役割を果たしていることは上述した通りである。疾病を防除するとの観点では、病原体、宿主および環境のそれぞれの観点からの研究開発が必要であることは言うまでもない。これまで魚病学の研究分野では、病原体に主眼を置いた研究が数多くなされてきたが、本質的に疾病の発生を低減させるためには、例えば、宿主である魚介類の適正飼育管理や栄養学的要因による免疫力の向上等も重要な研究開発分野である。そのためには、その種特有の生理学分野は無論のこと、免疫学、栄養学あるいは行動生態学など多方面からの研究開発が必要である。これらの基礎的知見を把握した上で親魚や種苗の適切な飼育管理下において、親魚選別や卵消毒などの対策を総合的に講じることにより、種苗生産過程でのウイルス性疾病の防除が可能になると言えよう。

種苗生産過程で発生するウイルス性疾病の原因ウイ



図IV-1. 種苗生産過程のウイルス病と天然海域からの伝播モデル

ルスの伝播には、垂直伝播と水平伝播の両方が深く関与していると考えられる。垂直伝播については、種苗生産過程でのウイルス性疾病による被害が問題となった当初から、その防除の重要性が指摘されていたが（室賀，1995），今回のヒラメも含め他の多くの海産魚でのVNNにおいても、やはり親魚が垂直伝播の重要な感染源になっていると考えられる。一方、水平伝播については、現段階で想定される経路としては、1) 親魚候補群として搬入した天然魚から養成した親魚への感染、2) 親魚育成用の餌料として使用される天然魚介類からの親魚への感染やその餌自体による施設の汚染、および3) 天然魚から放出されたウイルスが混入している沿岸水を飼育用水として導入することによる親魚や種苗への感染が想定される（図IV-1）。よってこれらの要因に由来するウイルスを種苗生産施設に持ち込まないような対策を講じる必要がある。そのためには、今回のヒラメの対策事例のように、採卵時には宿主体内でのウイルスの増殖や感染を助長しない適正な採卵および飼育管理技術の開発が必要であり、親魚の餌料についても如何なる病原体を保持しているか解らないので、今後は天然魚介類を生餌として使用するよりも、対象種の栄養要求に見合った配合飼料等を用いる方が、ウイルス汚染の可能性を低減させることができると考えられる。さらに、天然魚のウイルス保有状況を考えてやはり沿岸から取水した飼育用水は殺菌・消毒して親魚養成や種苗生産に用いる必要があ

る。これら一連の対策を併せて実施することにより、種苗期で問題となるウイルス病の流行を高い確率で防除することが可能となると考えられる。

加えて、今後は、飼育環境を高度に制御することで仔稚魚の体内でのウイルスの増殖を抑制し、ひいては水槽内での感染流行をくい止めるような種苗生産技術の研究やワクチネーション技術の開発などが、防疫面から見た種苗生産技術の進展の成否を握る重要な鍵になると考えている。

## 謝 辞

本研究開発に関し、御指導いただいた広島大学大学院生物圏科学研究科の室賀清邦教授（現広島大学名誉教授）、難波憲二教授（現広島大学名誉教授）、中井敏博教授ならびに北海道大学大学院水産科学研究院の吉水 守教授、西澤豊彦准教授に心より感謝を申し上げます。

本研究開発において、オキシダント濃度および有効ヨウ素濃度の測定方法について御指導を賜った荏原実業株式会社の三村 元博士、片山泰人氏に心からお礼申し上げます。

本研究開発に関し、御指導いただきました旧社団法人日本栽培漁業協会 元技術アドバイザー須田明博士、独立行政法人水産総合研究センター元理事古澤徹氏（現社団法人全国豊かな海づくり推進協会）、前理事今村茂生

氏，本部業務推進部次長福永辰廣氏，瀬戸内海区水産研究所栽培資源部長丸山敬悟氏，本部業務企画部チーフ研究開発コーディネーター有元操博士，小浜栽培漁業センター場長高橋庸一氏に心からお礼申し上げます。

ヒラメ天然魚入手にあたり御協力いただきました南伊豆栽培漁業センター，小浜栽培漁業センター，宮津栽培

漁業センター並びに伯方島栽培技術開発センターの職員の皆様に心からお礼申し上げます。

本書発刊に当たり，御協力いただきました本部業務推進部栽培管理課長岡雅一氏，栽培技術開発コーディネーター鴨志田正晃氏，業務推進係清水智仁氏に心からお礼申し上げます。



## V 引用文献

- Arimoto, M., K. Mushiake, Y. Mizuta, T. Nakai, K. Muroga and I. Furusawa (1992): Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathol.*, 27, 191-195.
- 有元 操・丸山敬悟・古澤 巖(1994) : シマアジのウイルス性神経壊死症の発生状況. 魚病研究, 29, 19-24.
- Arimoto, M., J. Sato, K. Maruyama, G. Mimura and I. Furusawa (1996): Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture*, 143, 15-22.
- 有元 操(1996) : シマアジのウイルス性神経壊死症に関する研究. 特別研究報告10号, p23-26. 日本栽培漁業協会
- Athanassopoulou, F., C. Billinis, V. Psychas and K. Karipoglou (2003): Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* (L.) farmed in fresh water in Greece. *J. Fish Dis.*, 26, 361-365.
- Athanassopoulou, F., C. Billinis and T. Prapas (2004): Important disease conditions of newly cultured species in intensive freshwater farms in Greece: first incidence of nodavirus infection in *Acipenser* sp. *Dis. Aquat. Org.*, 60, 247-252.
- Barker, D. E., A. Mackinnon, L. Boston, M. D. B. Burt, D. K. Cone, D. J. Speare, S. Griffiths, M. Cook, R. Ritchie and G. Olivier (2002): First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Dis. Aquat. Org.*, 49, 99-105.
- Bondad-Reantaso M. G., S. Kanchanakhan and S. Chinabut (2000): Review of grouper diseases and health management strategies for grouper and marine finfish diseases. In: *APE-CFWG02/2000 Workshop. Development of a regional research program on grouper virus transmission and vaccine development*, Bangkok, 18-20 Oct.2000, 27-60.
- Bovo, G., T. Nishizawa, C. Maltese, F. Borghesan, F. Mutinelli, F. Montesi and S. De Mas (1999): Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy. *Virus Res.*, 63, 143-146.
- Bloch, B., K. Gravningen and J. L. Larsen (1991): Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Dis. Aquat. Org.*, 10, 65-70.
- Breuil, G., J. R. Bonami, J. F. Pepin and Y. Pichot (1991): Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 97, 109-116.
- Breuil, G., J. F. P. Pepin, S. Boscher and R. Thiery (2002): Experimental vertical transmission of nodavirus from broodfish to eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Fish Dis.*, 25, 697-702.
- Chang, S., G. H. Ngoh, L. F. S. Kueh, Q. W. Qin, C. L. Chen, T. J. Lam and Y. M. Sin (2001): Development of a tropical marine fish cell line from Asian seabass (*Lates calcarifer*) for virus isolation. *Aquaculture*, 192, 133-145.
- Chi, S. C., C. F. Lo, G. H. Kou, P. S. Chang, S. E. Peng & S. N. Chen (1997): Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, 20, 185-193.
- Chi, S., B. Lo and S. Lin (2001): Characterization of grouper nervous necrosis virus (GNNV). *J. Fish Dis.*, 24, 3-13.
- Chi, S.C., J. R. Shieh and S. J. Lin (2003): Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, 55, 221-228.
- Chua, F., J. J. Loo and J. Y. Wee (1993): Mass mortality in juvenile greasy grouper, *Epinephelus tauvina*, associated with vacuolating encephalopathy and retinopathy. "Diseases in Asian Aquaculture II", (ed. by M. Shariff, J.R.Arthur and R.P. Subasinghe) Asian Fish. Soc., p235-241.
- Comps M., M. Trindade and C. Delsert (1996): Investigation of fish encephalitis viruses (FEV) expression in marine fishes using DIG-labelled probes. *Aquaculture*, 143, 113-121.
- Curtis, P. A., M. Drawbridge, T. Iwamoto, T. Nakai, R. P. Hedrick and A. P. Gendron (2001): Nodavirus infection of juvenile white seabass, *Atractoscion nobilis*, cultured in southern California: first record of viral nervous necrosis (VNN) in North America. *J. Fish Dis.*, 24, 263-271.
- Dalla Valle, L., L. Zanella, P. Patarnello, L. Paolucci,

- P. Belvedere and L. Colombo (2000): Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *J. Fish Dis.*, 23, 321-327.
- Danayadol, Y., S. Direkbusarakom and K. Supamattaya (1993): Viral nervous necrosis in brownspotted grouper, *Epinephelus malabaricus*, cultured in Thailand. "Diseases in Asian Aquaculture II", (ed. by M. Shariff, J.R. Arthur and R.P. Subasinghe) Asian Fish. Soc., p227-233.
- Francki, R. I. B., C. M. Fauquet, D. L. Knudson and F. Brown (1991): 5th report of the International Committee on Taxonomy of Virus "Classification and nomenclature of viruses," *Arch. Virol. [Suppl.]*, 2, 372-374.
- Felsenstein, J. (2004): PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Frerichs, G. N., H. D. Rodger and Z. Peric (1996): Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Gen. Virol.*, 77, 2067-2071.
- Frerichs, G. N., A. Tweedie, W. G. Starkey and R. H. Richards (2000): Temperature, pH and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. *Aquaculture*, 185, 13-24.
- Fukuda Y., H. D. Nguyen, M. Furuhashi and T. Nakai (1996): Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathol.* 31, 165-170.
- Glazebrook, J. S., M. Heasman and S. W. de Beer (1990): Picorna-like particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *J. Fish Dis.*, 13, 245-249.
- Gomez, D. K., J. Sato, K. Mushiake, T. Isshiki, Y. Okinaka and T. Nakai (2004): PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *J. Fish Dis.*, 27, 603-608.
- Grotmol, S. and G. K. Totland (2000): Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Dis. Aquat. Org.*, 39, 89-96.
- Grotmol, S., E. Dahl-Paulsen and G. K. Totland (2003): Hatchability of eggs from Atlantic cod, turbot and Atlantic halibut after disinfection with ozonated seawater. *Aquaculture*, 221, 245-254.
- 魚類防疫への挑戦編集委員会(1993)：飼育施設等の消毒剤による殺菌・消毒の事例，「魚類防疫への挑戦 サケマス編」，魚類防疫への挑戦編集委員会編，p38-44.，緑書房，東京。
- Hall, L. W. Jr., D. T. Burton and L. B. Richardson (1981): Comparison of ozone and chlorine toxicity to the developmental stages of Striped Bass, *Morone saxatilis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38, 752-757.
- Hegde, A., C. L. Chen, Q. W. Qin, T. J. Lam and Y. M. Sin (2002): Characterization, pathogenicity and neutralization studies of a nervous necrosis virus isolated from grouper, *Epinephelus tauvina*, in Singapore. *Aquaculture*, 213, 55-72.
- Hegde, A., H. C. Teh, T. J. Lam and Y. M. Sin (2003) Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata*-comparative characterization and pathogenicity studies. *Arch. Virol.*, 148, 575-586.
- Hirazawa, N., T. Hara, T. Mitsuboshi, J. Okazaki and K. Hata (1999): Idophore Disinfection of Eggs of Spotted Halibut *Verasper variegates* and Red Sea Bream *Pagrus major*. *Fish. Sci.*, 65, 333-338.
- 本藤 靖・村上直人・虫明敬一・津崎龍雄(2006)：ヒラメ天然魚を用いた配合飼料給餌による親魚養成と採卵. 日水誌, 72, 873-879.
- 磯野良介・伊藤康男・木下秀明・城戸勝利(1993)：シロギス卵・稚魚の生残に及ぼす海水オゾン処理の影響. 日水誌, 59, 1527-1533.
- 伊藤慎吾・吉水守・呉 明柱・日向進一・渡辺研一・早川 豊・絵面良男(1996)：海水のオゾン処理による飼育水の殺菌効果とヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) およびマツカワ (*Verasper moseri*) の生存率に及ぼす影響. 水産増殖, 44, 457-463.
- Iwamoto, T., K. Mori, M. Arimoto and T. Nakai (1999): High permissivity of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Org.*, 39, 37-47.
- Iwamoto, T., T. Nakai, K. Mori, M. Arimoto and I. Furusawa (2000): Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Org.*, 43, 81-89.
- Johansen, R., S. Grove, A.K. Svendsen, I. Modahl and B. Dannevig (2004): A sequential study of pathological findings in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), throughout one year after an acute outbreak of viral encephalopathy and retinopathy. *J. Fish Dis.*, 27, 327-341.

- Kaesberg, P. (1989): Organization of bipartite insect virus genomes: The genome of Black Beetle Virus. In "The Molecular Biology of Positive Strand RNA Viruses", Academic press, London, p207-218.
- 神谷 晃・尾家重治(1992): 消毒剤選択のための基礎知識, 各種消毒剤の特徴, 「消毒剤の選び方と使用上の留意点」p15-49., 薬業時報社, 東京.
- Lai, Y. S., S. Murali, H. C. Chiu, H. Y. Ju, Y. S. Lin, S. C. Chen, I. C. Guo, K. Fang & C. Y. Chang (2001): Propagation of yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) in a new nodavirus-susceptible cell line from yellow grouper, (Temminck & Schlegel), brain tissue. *J. Fish Dis.*, 24, 299-309.
- LeBreton, A., L. Grisez, J. Sweetman and F. Ollevier (1997): Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Fish Dis.*, 20, 145-151.
- Lin, L., J. G. He, K. Mori, T. Nishioka, J. L. Wu, S. P. Weng, K. Mushiake, M. Arimoto & T. Nakai (2001): Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatchery-reared groupers in the People's Republic of China. *Fish Pathol.*, 36, 186-188.
- Longworth, J. F. (1978): Small isometric viruses of invertebrates. *Adv. Virus Res.*, 23, 103-157.
- Maeno, Y., L. D. de la Pena and E. R. Cruz-Lacierda (2002) Nodavirus infection in hatchery-reared orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*: First record of viral nervous necrosis in the Philippines. *Fish Pathol.*, 37, 87-89.
- 松田浩一・山川 卓・辻ヶ堂 諦・竹内俊博(1988): ヒラメ卵のポピドンヨード剤に対する耐性試験. 昭和62年度三重県水産技術センター事業報告書, 50-51.
- 三村 元・長瀬俊成・片山泰人・長光貴子・難波憲二(1998): オゾン処理海水のヒラメ, *Paralichthys olivaceus* 卵に対する影響. 水産増殖, 46, 101-110.
- Mori K., T. Nakai, M. Nagahara, K. Muroga, T. Mekuchi and T. Kanno (1991): A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Fish Pathol.*, 26, 209-210.
- Mori, K., T. Nakai, K. Muroga, M. Arimoto, K. Mushiake and I. Furusawa (1992): Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, 187, 368-371.
- Mori, K., K. Mushiake and M. Arimoto (1998): Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. *Fish Pathol.*, 33, 443-444.
- Mori K., T. Mangyoku, T. Iwamoto, M. Arimoto, S. Tanaka and T. Nakai (2003): Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, 57, 19-26.
- 森 広一郎・西岡豊弘・菅谷琢磨・有元 操(2004): 天然キジハタからのベータノダウイルスの検出. 栽培漁業センター技報, 63-66.
- 中野平二・開 鉄生(1992): ヨード剤によるヒラメ卵の消毒. 平成3年度魚類防疫技術基盤確立事業海産魚の防疫事例集, 社団法人日本水産資源保護協会, 東京, 24-27.
- 村田(2005): ヒラメ, 「水産増養殖システム1 海産魚」, 熊井秀水編, p83-109, 恒星社厚生閣, 東京.
- Munday, B.L., J. Kwang and N. Moody (2002): Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, 25, 127-142.
- 室賀清邦(1995): 海産魚介類の仔稚におけるウイルス性および細菌性疾病. 魚病研究, 30, 71-85.
- Mushiake, K., M. Arimoto, T. Furusawa, I. Furusawa, T. Nakai and K. Muroga (1992): Detection of antibodies against striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) from brood stocks of striped jack. *Fisheries Sci.*, 58, 2351-2356.
- 虫明敬一・中井敏博・室賀清邦・関谷幸生・古澤 巖(1993): シマアジのウイルス性神経壊死症: 仔魚の発病に対する親魚の抗体価および産卵飼育法の影響. 水産増殖, 41, 327-332.
- Mushiake, K., T. Nishizawa, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga (1994): Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.*, 29, 177-182.
- 虫明敬一・有元 操(2000): 総説 シマアジのウイルス性神経壊死症(VNN)に関する防除対策. 栽培技研, 28, 47-55.
- 虫明敬一(2000): シマアジ親魚の産卵に伴って増殖するウイルス性神経壊死症(VNN)原因ウイルス(SJNNV)とその抑制対策. 水産増殖, 48, 109-115.
- 虫明敬一, 本藤 靖, 崎山一孝, 浜田和久, 堀田卓朗, 吉田一範(2003): 総説 日本栽培漁業協会における親魚養成技術開発の現状と今後の課題. 栽培技研, 30, 79-100.
- 平成3年度魚類防疫技術基盤確立事業海産魚の防疫事例集. 社団法人日本水産資源保護協会, 24-27.
- Nakai, T., H. D. Nguyen, T. Nishizawa, K. Muroga, M. Arimoto and K. Ootsuki (1994): Occurrence of viral nervous necrosis in Kelp grouper and Tiger puffer. *Fish Pathol.*, 29, 211-212.
- Nguyen, D. N., T. Mekuchi, K. Imura, T. Nakai, T. Nishizawa and K. Muroga (1994): Occurrence of

- viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.*, **60**, 551-554.
- Nishizawa, T., K. Mori, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga (1994): Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Org.*, **18**, 103-107.
- Nishizawa, T., K. I. Mori, M. Furuhashi, T. Nakai, I. Furusawa & K. Muroga (1995): Comparison of the coat protein genes of 5 fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *J. Gen. Virol.* **76**, 1563-1569.
- Nishizawa, T., M. Furuhashi, T. Nagai, T. Nakai and K. Muroga (1997): Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1633-1636.
- 農林水産省大臣官房統計部(2007): 農林水産統計「平成17年漁業・養殖業生産統計(概数)」.
- 野村哲一・笠井久会(2003): さけ・ます増殖事業における防疫対策. 魚と卵, 169, 1-12.
- Oh, M. J., S. J. Jung, S. R. Kim, K. V. Rajendran, Y. J. Kim, T. J. Choi, H. R. Kim and J. D. Kim (2002): A fish nodavirus associated with mass mortality in hatchery-reared red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, **211**, 1-7.
- 大橋 裕・長瀬俊成・馬場俊典(1994): オゾンによる海水浄化に関する研究. 山口県内海水産試験場報告, **23**, 24-28.
- OIE (2006): Viral encephalopathy and retinopathy, in "Manual of Diagnostic Tests for Aquatic animals 2006", CHAP. 2.1.7., Online Publications (www.oie.int), The World Organisation for Animal Health, Paris,
- ポビドンヨード. 第十四改正日本薬局方一条文と注釈—(日本薬局方解説書編集委員会編), 東京, 2000; 2005-2006.
- Renault, T., Ph. Haffner, F. Baudin Laurencin, G. Breuil and J. R. Bonami (1991): Mass mortalities in hatchery-reared sea bass (*Lates calcarifer*) larvae associated with the presence in the brain and retina of virus-like particles. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **11**, 68-73.
- Samuelsen, O. B., A. H. Nerland, T. Jorgensen, M. B. Schroder, T. Swasand and O. Bergh (2006): Viral and bacterial diseases of Atlantic cod *Gadus morhua*, their prophylaxis and treatment: a review. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 239-254.
- 佐藤 修・村上啓士・水呉 浩・木村 淳・米司 隆・伏見 徹(1994): ポビドンヨード剤によるヒラメ卵の耐性. 平成5年度広島県栽培漁業協会事業報告, 83-87.
- Schneemann, A., L. A. Ball, C. Delsert, J. E. Johnson and T. Nishizawa (2005): Family Nodaviridae. In: Fauquet, C.M., M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. Ball. (eds), "Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses." Academic Press, New York, 865-872.
- 青海忠久(1986): ヒラメ, 各論編「浅海養殖」(社資源協会編, p246-265, 大成出版, 東京).
- 青海忠久(1990): ヒラメ白化個体の出現機構と防除. 水産増殖, **38**, 394-395.
- 青海忠久(1995): カレイ目魚類の体色異常と変態. 月刊海洋, **27**, 727-731.
- ヒラメ白化個体の出現機構と防除. 水産増殖, **38**, 394-395.
- Skliris, G. P., J. V. Krondiris, D. C. Sideris, A. P. Shinn, W. G. Starkey and R. H. Richards (2001): Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia. *Virus Res.*, **75**, 59-67.
- Sohn, S. G. & M. A. Park (1998): Viral diseases of cultured marine fish and shrimp in Korea. *Fish Pathol.*, **33**, 189-192.
- Starkey, W., J. Ireland, K. Muir, A. Shinn, R. Richards and H. Ferguson (2000): Isolation of nodavirus from Scottish farmed halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J. Fish Dis.*, **23**, 419-422.
- Starkey, W. G., J. H. Ireland, K. F. Muir, M. E. Jenkins, W. J. Roy, R. H. Richards and H. W. Ferguson (2001): Nodavirus infection in Atlantic cod and Dover sole in the UK. *Veterinary Record* **149**, 179-181.
- 水産庁・独立行政法人水産総合研究センター(2004): 種苗生産実績(放流用)—魚類. 平成14年度栽培漁業種苗生産, 入手・放流実績(全国)資料編.
- 水産庁・独立行政法人水産総合研究センター・豊かな海づくり協会(2007): 平成17年度栽培漁業種苗生産, 入手・放流実績(全国).
- (社)マリノフォーラム21(1991): 海水殺菌装置評価基準. 220p.
- Tanaka, S., K. Mori, M. Arimoto, T. Iwamoto and T. Nakai (2001): Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *J. Fish Dis.*, **24**, 15-22.

- 土橋靖史・栗山 功・黒宮香美・柏木正章・吉岡 基  
(2002)：マハタ種苗生産におけるウイルス性神経  
壊死症(VNN)の防除対策の検討. 水産増殖, 50,  
355-361.
- Ucko, M., A. Colorni and A. Diamant (2004): Nodavirus  
infections in Israeli mariculture. *J. Fish Dis.*, 27,  
459-469.
- Watanabe, K., S. Suzuki, T. Nishizawa, K. Suzuki, M.  
Yoshimizu and Y. Ezura (1998): Control strategy  
for viral nervous necrosis of barfin flounder. *Fish  
Pathol.* 33, 445-446.
- Watanabe, K., T. Nishizawa and M. Yoshimizu  
(2000): Selection of broodstock candidates of  
barfin flounder using an ELISA system with  
recombinant protein of barfin flounder nervous  
necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 41, 219-223.
- 渡辺研一(2000)：マツカワに発生したウイルス性神経壊  
死症の防除対策に関する研究. 特別研究報告15号,  
p1-72, 日本栽培漁業協会.
- Yamashita, H., Y. Fujita, H. Kawakami and T. Nakai  
(2005): The efficacy of inactivated virus vaccine  
against viral nervous necrosis (VNN). *Fish Pathol.*  
40, 15-21.
- 山田徹生・藤波祐一郎・熊谷厚志(2004)：オゾン処理海  
水がヒラメ稚魚の白化出現に及ぼす影響. 栽培漁業  
センター技報, 1, 35-37.
- Yoshikoshi K and K. Inoue (1990): Viral nervous  
necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles  
of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus*  
(Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.* 13, 69-77.
- Yoshinaga, T., I. Segawa, T. Kamaishi and M. Sorimachi  
(2000): Effects of temperature, salinity and  
chlorine treatment on egg hatching of the  
Monogenean *Neoheterobothrium hirame* infecting  
Japanese flounder. *Fish Pathol.*, 35, 85-88.
- Yuasa, K., I. Koesharyani, D. Roza, K. Mori, M.  
Katata and T. Nakai (2002): Immune response  
of humpback grouper, *Cromileptes altivelis*  
(Valenciennes) injected with the recombinant  
coat protein of betanodavirus. *J. Fish. Dis.*, 25,  
53-56.
- Zafran, T. Harada, I. Koesharyani, K. Yuasa and K.  
Hatai (1998): Indonesian hatchery reared seabass  
larvae (*Lates calcarifer*) associated with viral  
nervous necrosis (VNN). *Indonesian Fisheries  
Research Journal* IV, 19-22.
- Zafran, I. Koesharyani, F. Johnny, K. Yuasa, T. Harada  
and K. Hatai (2000): Viral nervous necrosis in  
humpback grouper *Cromileptes altivelis* larvae  
and juveniles in Indonesia. *Fish Pathol.*, 35, 95-96.

## VI 添付マニュアル

### 1. VNNのPCR診断における留意点

VNNの診断手法は、Nishizawa *et al.* (1994) の報告に基づいたPCR法（平成7年度、栽培漁業技術開発推進事業ブロック協議会資料、「ウイルス性神経壊死症防除技術開発のこれまでの成果」を参照）で実施されてきたが、ここでは、改良されたRNAの抽出方法とnested PCRによる新たな診断法について述べる。

#### 1) 市販の試薬を使用するRNAの抽出方法

AGPC法（Acid guanidinium Phenol Chloroform法）に基づく市販のRNA抽出試薬であるISOGEN（ニッポンジーン）は、酸性下でフェノール処理するとDNAはフェノール層に、RNAは水相に分配される性質を利用し、RNAを抽出する方法である。本試薬はフェノールおよびチオシアン酸グアニジンを主成分としており、使用の際には保護具（手袋、眼鏡等）を着用する必要がある。

抽出は、以下の様に行う（詳細は試薬に添付されているマニュアルを参照）。

- ① マイクロチューブに0.1g以下のサンプルを入れISOGEN 1 mlを加える。
- ② マイクロチューブ用の棒で磨砕する。
- ③ 0.2mlのクロロホルムを加えて、激しく懸濁する。
- ④ 12,000g, 4℃で15分間遠心し、上清を新しいチューブに移す。
- ⑤ 0.5mLのイソプロパノールを加え、12,000g, 4℃で15分間遠心する。
- ⑥ 上清を捨て、1 mlの75%エタノールを加え、5分間遠心する。
- ⑦ ジエチルピリカーボネイト処理した超純水に溶かす。

#### 2) nested PCRによる特異性の確認（ウイルス遺伝型の判別）

PCRによる特異性の向上およびウイルスの遺伝子型の判別のため、1st PCRプライマー（現行のF2およびR3表1）で増幅されるT4領域の内部に4つの遺伝子型に特異的な配列を持つnested PCR用のプライマーである（表1）。反応試薬の組成および反応条件は、表2および3の通りである。このnested PCRは、増幅産物の特異性の確認と原因ウイルスの遺伝子型の特定に使用する。ただしキャリアオーバーによる擬陽性が認められることから、実施にあたっては電気泳動室とPCR試薬調製室を完全に隔離するなど、増幅DNAのPCR試薬への混入を防ぐ対策を講じる必要がある。

表1 VNN診断用プライマー（RT-PCR用；F2およびR3）

プライマー名	配列	濃度
VNN-F2	5'-CGTGTTCAGTCATGTGTCGCT-3'	20pmol/ $\mu$ l
VNN-R3	5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'	20pmol/ $\mu$ l

ストック液の原液は100pmol/ $\mu$ lに調製

表2 RT反応用試薬の調製（その1）

SM1（ストック用緩衝液）	(30検体分)
5× First strand buffer	60 $\mu$ l
0.1M DTT	30 $\mu$ l
2.5M dNTP mixture	120 $\mu$ l
DDW（DEPC処理水）	36 $\mu$ l
合計	246 $\mu$ l

表3 RT反応用試薬の調製（その2）

RT反応液	(1検体分)
SM1（上記）	8.2 $\mu$ l
Reverse primer（VNN-R3, 20pmol/ $\mu$ l）	0.5 $\mu$ l
RNase 阻害剤（HPRI）	0.1 $\mu$ l
逆転写酵素（Super Script II）	0.2 $\mu$ l
サンプル抽出核酸（熱変性済み）	1 $\mu$ l
合計	10 $\mu$ l

表4 PCR反応用試薬の調製（その1）

EM2（ストック用緩衝液）	(30検体分)
10× EX Taq buffer	150 $\mu$ l
DDW（DEPC処理水）	1020 $\mu$ l
合計	1170 $\mu$ l

表5 PCR反応用試薬の調製（その2）

PCR反応液	(1検体分)
EM2（上記）	39.0 $\mu$ l
Forward primer（VNN-F2, 20pmol/ $\mu$ l）	0.5 $\mu$ l
Taq DNA合成酵素（EX Taq）	0.5 $\mu$ l
RT反応液	10 $\mu$ l
合計	50 $\mu$ l

表6 RT-PCRの反応条件

反応段階	反応条件	繰り返し回数
初回熱変性	95℃, 5分間	1
熱変性	95℃, 40秒間	25
アニーリング	55℃, 40秒間	
伸長	72℃, 40秒間	
最終伸長	72℃, 5分間	1

表7 nested PCR用のプライマーの塩基配列

プライマーの方向性	対応する遺伝子型	プライマーの配列
上流プライマー	SJ type	5'-acctgaggacaccaccgctc-3'
	BF type	5'-acctgaagatacattcgctc-3'
	TP type	5'-acctgaggaacattcgctc-3'
	RG type	5'-acctgaggagactaccgctc-3'
下流プライマー	SJ type	5'-cagtcaaagtaccagcagg-3'
	BF type	5'-cagtgaaccaccccgagg-3'
	TP type	5'-caAtccaagaagcctgcagg-3'
	RG type	5'-cagcgaaccagcctgcagg-3'

表8 nested PCR 反応用試薬の組成 (終濃度)

1 × PCR 緩衝液 (酵素添付)
0.2 mM dNTP
0.2 μM 上流・下流各プライマー
Taq DNA 合成酵素 1.25units/反応液25 μl
1st PCR 産物 1 μl / 反応液25 μl

表9 nested PCRの反応条件

反応段階	反応条件	繰り返し回数
初回熱変性	95℃, 5分間	1
熱変性	95℃, 30秒間	25
アニーリング	65℃, 30秒間	
伸長	72℃, 30秒間	
最終伸長	72℃, 5分間	1

Nishizawa, T., K. Mori, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga (1994): Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 18, 103-107.

村松正實(1996):「ラボマニュアル遺伝子工学」, 第3版, 丸善株式会社, 16章, 83-86.

Sambrook, J and D. W. Russell (2001): "Molecular cloning: a laboratory manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. p7.9-7.12.

森 広一郎・西岡豊弘・有元 操・中井敏博(2001): 魚類ノダウイルスのPCR検出系の再検討。平成13年度日本魚病学会春季大会

## 2. 種苗生産現場での新たな疾病に関する情報

### 1) ヒラメのネオヘテロボツリウム症

1996年以降, 我が国沿岸で漁獲されたヒラメで, 極度の貧血を主徴とする疾病が発生し大きな問題となった。当初, ウイルスの関与を示唆する報告もなされたが, 主たる原因は吸血性単生類の *Neoheterobothrium hirame* の寄生によることが明らかになった。本疾病は天然魚のみならず, 養殖魚や種苗生産で用いる養成親魚でも発生し, 養殖業や栽培漁業の事業運営上の大きな問題となっている。種苗生産場内での本病の蔓延, 種苗を介しての天然海域への病原体の拡散を防止するため, 親魚および種苗の本虫寄生状況に留意し, 寄生が認められた場合には以下の駆虫対策を講ずるのが望ましい。

#### ① ヒラメ親魚および種苗での駆虫対策

親魚における *N. hirame* の駆虫対策として, 照明下でピンセットを用い口腔内の成虫を駆除する方法, あるいはこれに食塩3%添加海水に30分間浸漬する未成熟虫を駆除する方法を組み合わせた対策を1ヶ月間隔で数回行うことにより, 駆虫が可能である。また食塩8%添加海水に, 5分間浸漬し成熟虫と未成熟虫を同時に駆除する方法も有効である。一方, 種苗では, 食塩7%添加海水に, 5分間浸漬し成熟虫と未成熟虫を駆除できる。何れの駆虫方法においても, ヒラメの活力, 処理時の水温, 通気状態等の条件によっては, 駆虫作業によりヒラメが死亡する可能性もあることから, これを考慮し慎重に駆虫作業を実施する必要がある。

三輪 理・井上 潔(1999): 日本沿岸で発生している貧血を特徴とするヒラメの疾病の病理組織学的研究。魚病研究, 34, 113-119.

Ogawa, K. (1999): *Neoheterobothrium hirame* sp. nov.

(Monogenea: Diclidophoridae) from the buccal cavity wall of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol.*, 34, 195-201.

Yoshinaga, T., T. Kamaishi, I. Segawa, K. Yamano, H. Ikeda and M. Sorimachi (2001): Anemia caused by challenges with the monogenean *Neoheterobothrium hirame* in the Japanese flounder. *Fish Pathol.*, 36, 13-20.

虫明敬一・森 広一郎・有元 操(2001):天然ヒラメにおける貧血症の発生状況. 魚病研究, 36, 125-132.

良永知義・釜石 隆・瀬川 勲・熊谷 明・中易千早・山野恵祐・竹内照文・反町 稔(2000):貧血ヒラメの血液性状, 病理組織および単性類 *Neoheterobothrium hirame* の寄生状況. 魚病研究, 35, 131-136.

道根 淳(1999):養殖および養成親魚ヒラメで発見された寄生虫 *Neoheterobothrium* sp. について. 島根県栽培漁業センター調査報告, 第2号, 15-23.

Yoshinaga, T., I. Segawa, T. Kamaishi and M. Sorimachi (2000a): Effects of temperature, salinity and chlorine treatment on egg hatching of the Monogenean *Neoheterobothrium hirame* infecting Japanese flounder. *Fish Pathol.*, 35, 85-88.

森 広一郎・本藤 靖・虫明敬一・津崎龍雄・有元 操・堤 信幸・小川和夫(2000):ヒラメ養成親魚における貧血症(仮)の発

生とネオヘテロボツリウムの駆虫効果. 平成12年度日本魚病学会春季大会

Isshiki, T., M. Tochino, and T. Nagano (2003) Treatments of *Neoheterobothrium infection* in Japanese flounder by 8% NaCl-supplemented seawater bathing. *Suisanzoushoku*, 51, 363-364.

西岡豊弘(2004):ヒラメ稚魚における7%食塩添加海水浴によるネオヘテロボツリウム成虫の駆除効果. 栽培漁業センター技法, 2: 96-99.

### 3. 病理組織標本固定液の調製方法

(平成4年度魚類防疫技術基盤確立事業「基本マニュアル」(社)日本水産資源保護協会より抜粋)

#### 1) 10%ホルマリン

市販のホルマリン(特級試薬ホルムアルデヒド37%含有)1容に蒸留水9容を加えて調製する。室温下もしくは冷蔵庫内で1~数日固定する。固定後は, 70%エタノールに入れる。

#### 2) 10%中性緩衝ホルマリン液

ホルマリン100ml, 蒸留水900ml, 第1リン酸ナトリウム( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 4g, 第2リン酸ナトリウム( $\text{NaHPO}_4$ ) 6.5gを入れ混合する(pH7.0)。固定液の使用法と固定後の処理は, 10%ホルマリンの場合に準じる。

#### 3) ブアン(Bouin)液

使用直前にピクリン酸飽和水溶液75ml,ホルマリン25ml, 氷酢酸5mlの割合で混合して調製する。固定は室温下もしくは冷蔵庫内で数時間から一晩行う。固定後は, 70%エタノールに入れる。

#### 4) 2%パラホルムアルデヒド(PHA)

##### -2.5%グルタルアルデヒド(GA)液

固定液はリン酸もしくはカコジル酸緩衝液(pH7.2~7.4, 最終濃度は0.1Mを用いることが多い)を用いて調製する。130mlの蒸留水に5.6gのPFAを加え湯煎により60~70℃に加温し, これに1N水酸化ナトリウムを2, 3滴加えて溶解させる。PFAを室温まで冷却し, GA(70%電子顕微鏡用試薬)のアンブルを割って, アンブルごと投入し, さらに0.2M緩衝液(リン酸もしくはカコジル酸緩衝液, pH7.2~7.4)を140ml加えてよく混合する。固定は, 室温下もしくは冷却して行う。固定時間は, 1~数時間行う。固定液の寿命は比較的短く, 冷蔵庫に保存した場合でも1週間以内に使用する。固定後は, 固定液の調製に使用した同種の緩衝液(5%ショ糖を含む)に入れる。

#### 5) Davidson液

水産総合研究センター養殖研究所の魚病診断・研修センターでは, 仔稚魚の固定液として, 本固定液が推奨されています(詳細は, 養殖研究所ホームページを参照; <http://nria.fra.affrc.go.jp/sindan/osirase.htm>)

エタノール(99.5%)330mlにホルマリン220ml, 氷酢酸115ml, 蒸留水:335mlを加えて調製する。固定液は1ヶ月程度保存できる。固定は室温下もしくは冷蔵庫内で一晩行う。固定後は, 70%エタノールに入れる。



栽培漁業技術シリーズ No. 13

ヒラメ VNN 防除に関するこれまでの取り組み

平成 20 年 3 月 31 日発行

発行 独立行政法人 水産総合研究センター  
〒220-6115  
神奈川県横浜市西区みなとみらい 2-2-3  
クイーンズタワー B 棟 15 階  
電話 (045) 227-2715

印刷所 日昇印刷株式会社  
〒104-0043 東京都中央区湊 1-14-14  
電話 (03) 3553-3161 (代)