

クルマエビのホワイトスポット病 WSD (white spot disease) の防除対策に関する研究^{*1}

佐藤 純^{*2}

Studies on prevention measure of white spot disease of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*

Jun SATOH

Abstract : WSD (white spot disease), the equivalent of penaeid acute viremia (PAV), has become one of the most serious problems not only in the shrimp farming industry but also in hatchery production in Southeast Asian countries and the Americas. The major infection route of the causative virus (WSSV: white spot syndrome virus= PRDV) is considered to be vertical transmission from spawners to larvae/juveniles via eggs in the seed production process of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). Therefore, in order to inhibit vertical transmission, eggs are selected based on PCR (polymerase chain reaction) detection of WSSV from the receptaculum seminis after spawning. In addition, the fertilized eggs are disinfected with povidone iodine (5 mg/l for 5 min). In order to prevent horizontal transmission, larval and juvenile rearing seawater is treated with UV irradiation. Stable production of specific-pathogen-free shrimp was accomplished by these countermeasures for the prevention of WSSV transmission. However, in kuruma shrimp farms, horizontal transmission by cannibalism and waterborne routes is also very important among reared shrimp and cohabiting crustaceans in those environments. Thus, it is still difficult to prevent horizontal infection by WSSV at shrimp farms. Recently, a “quasi-immune response” was founded in kuruma shrimp, wherein naturally survived from WSD were protected against a re-challenge with WSSV. Moreover, we developed oral vaccine with WSSV recombinant proteins, rVP26 and rVP28, meaning that shrimp protection against WSSV-infection was inducible by the oral vaccine with rVPs.

Chapter 1. - In 1996, a hatchery of Japan Sea-Farming Association obtained kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) eggs for seedling culture from wild broodstocks, among which some were found to be white spot syndrome virus (WSSV) infected by PCR test. Eggs were washed once with filtrated seawater and reared in the hatchery. During the culture, those post-larval groups in which WSSV were detected were excluded. Although no WSSV was found in the seedlings prior to the transportation to the nursery by PCR test, WSD occurred among them during the culture in the nursery facilities. In 1997, the hatchery again obtained prawn eggs from wild broodstocks. However, in this year, PCR-check was applied to select non-WSSV infected spawners. Furthermore, eggs were disinfected with iodine before being served for rearing. No WSD infection occurred throughout the culture in the hatchery and the nursery facility in this year. These results strongly suggest that the infec-

2011年5月18日受理 (Received on May18,2011)

^{*1} 北海道大学審査学位論文 (掲載するに際し投稿規定に沿って一部修正した)

^{*2} 増養殖研究所上浦庁舎 〒879-2602 大分県佐伯市上浦大字津井浦 (Kamiura Station, National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, Kamiura, Saiki,Oita 879-2602, Japan)

tion source of WSD occurred in 1996 originated from spawners.

Chapter 2. - Conditions suitable for disinfection of fertilized eggs of *Marsupenaeus japonicus* using povidone-iodine were investigated. Eggs 10 h after fertilization were exposed to 0, 2.5, 5.0 and 10.0 mg/L of active iodine for 5, 10, 15 and 20 min. Hatching rate showed no significant difference between control and test groups in concentration of 2.5 mg/L of active iodine for 5 to 20 min and 5.0 mg/L for 5 to 15 min. Viable bacterial counts in these conditions decreased by more than 90% when compared with those of control groups. There was no significant difference in the hatching rates of eggs with eight different developmental stages between control and tested groups exposed to 5.0 mg/L of active iodine for 5 min.

Chapter 3. - We compared WSSV infection induction in kuruma shrimp by oral, immersion, and intramuscular injection (IM) exposure methods and evaluated the oral vaccine prepared from the recombinant WSSV proteins rVP26 and rVP28. The 50% lethal doses (LD_{50}) of WSSV by oral, immersion, and IM challenges were $10^{-0.4}$, $10^{-4.4}$, and $10^{-7.7}$ g shrimp⁻¹, respectively, indicating that WSSV infection efficiency by oral challenge was significantly less than the other 2 challenge routes. However, in shrimp farms it is believed that WSSV infection is easily and commonly established by the oral route as a result of cannibalization of WSSV-infected shrimp. Kuruma shrimp vaccinated orally with WSSV rVP26 or rVP28 were challenged with WSSV by oral, immersion, and IM routes to compare protection efficacy. The relative percent survival values were 100% for oral challenge, 70 to 71% for immersion, and 34 to 61% for IM. Thus, the protection against WSSV-infection that was induced in kuruma shrimp by oral vaccination with rVP26 or rVP28 seemed equivalent to that obtained through IM vaccination.

Chapter 4. - The phylaxis against WSSV was also inducible by oral vaccination with recombinant WSSV proteins, rVP26 and rVP28. In the present study, kuruma shrimp orally vaccinated with rVPs were sequentially challenged with WSSV to evaluate onset and duration of phylactic response and booster effect. The phylactic response of shrimp against WSSV-challenge peaked at day 45 after the vaccination with rVP26 (RPS: 100%) and at day 55 with rVP28 (RPS: 93%), and decreased within 10-20 days. The phylaxis against WSSV-challenge was boosted by the secondary vaccination with homologous rVPs, but not by those with heterologous rVPs. Phylactic responses by the secondary vaccination appeared more rapid than those by the primary vaccination. These results demonstrated that the duration of phylaxis induced by oral vaccination with rVPs was relatively short, but could be extended by booster vaccination with homologous rVPs.

Key words: WSD, PAV, kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*, vaccine

目 次	
序 論	第 4 章 WSSV の rVP26 および rVP28 を経口投与したクルマエビの感染防御効果の持続期間、免疫記憶および特異性
第 1 章 種苗生産過程における WSD の発生状況	総合考察
第 2 章 ポビドンヨード剤を用いた受精卵消毒の安全性と効果	謝 辞
第 3 章 WSSV の rVP26 および rVP28 を経口投与したクルマエビの WSSV 攻撃に対する感染防御効果	文 献

序 論

1. クルマエビ漁業

(1) 漁獲量, 生産額および種苗放流

クルマエビ科に属するクルマエビ属28種のうちの1種であるクルマエビ *Marsupenaeus japonicus* は, 沿岸から大陸棚にかけての泥底, 砂泥底に棲息し, インド・西太平洋に広く分布する体長30cmに達する大型のエビ類である。日本沿岸では本州北部以南に分布し(三宅, 1982), 沿岸漁業の重要な対象種となっている。漁業・養殖業生産統計年報(農林水産省統計部)によると, 日本国内におけるクルマエビ漁業の漁獲量は, 1970年の1,263トン記録した以降徐々に増加し, 1985年にはこれまでの最高となる3,741トンまで達した(Fig. 1)。しかし, 近年では1,000トン程度にまで落ち込み, 1970年頃の水準にまで減少している。また, イセエビ (*Panilurus* spp.) とクルマエビを除いたエビ類の集計でも漁獲量は1985年以降全国的に減少傾向にあり(浜崎, 北田, 2005), クルマエビを含めたクルマエビ類における現在の漁獲量は, 過去最低レベルにある。この漁獲量の減少原因は, 漁獲努力量との関係から見てもクルマエビ資源の再生産過程に問題があると考えるのが妥当であり, 漁獲量の安定している瀬

戸内海西部海域の現状を解析することで, クルマエビ資源の変遷が解明されると考えられる(浜崎, 北田, 2005)。

一方, エビ類の人工的な増養殖は, 1930年代後半に故藤永元作博士によって完成された(Hudinaga, 1942)。クルマエビの完全養殖技術(の完成)は, 日本のみならず, アジア諸国を中心に世界的な発展を見るエビ類の増養殖生産の基礎をなした。また, クルマエビの種苗生産技術の完成は, 放流と漁業管理による資源管理漁業への転換期においても, いち早く技術開発に取りかかることを可能にした(橘高ら, 1996)。2006年度の国内における放流用エビ類の種苗生産は, クルマエビ, クマエビ (*Penaeus semisulcatus*), ヨシエビ (*Metapenaeus ensis*) およびホッカイエビ (*Pandalus kessleri*) の4種で行われ, 総生産尾数は2.1億尾, そのうちクルマエビは1.5億尾(74%)を占めた(水産庁・(独)水産総合研究センター・(社)全国豊かな海づくり推進協会, 2008)。また, 養殖用としても, クルマエビは6千万尾が生産され, クルマエビ種苗の国内生産数はホタテガイに次いで2番目であり, 栽培漁業ならびに養殖漁業対象種として重要である。国内のクルマエビの種苗放流尾数は, 1987年に3億3千万尾と過去最高を記録した。旧日本栽培

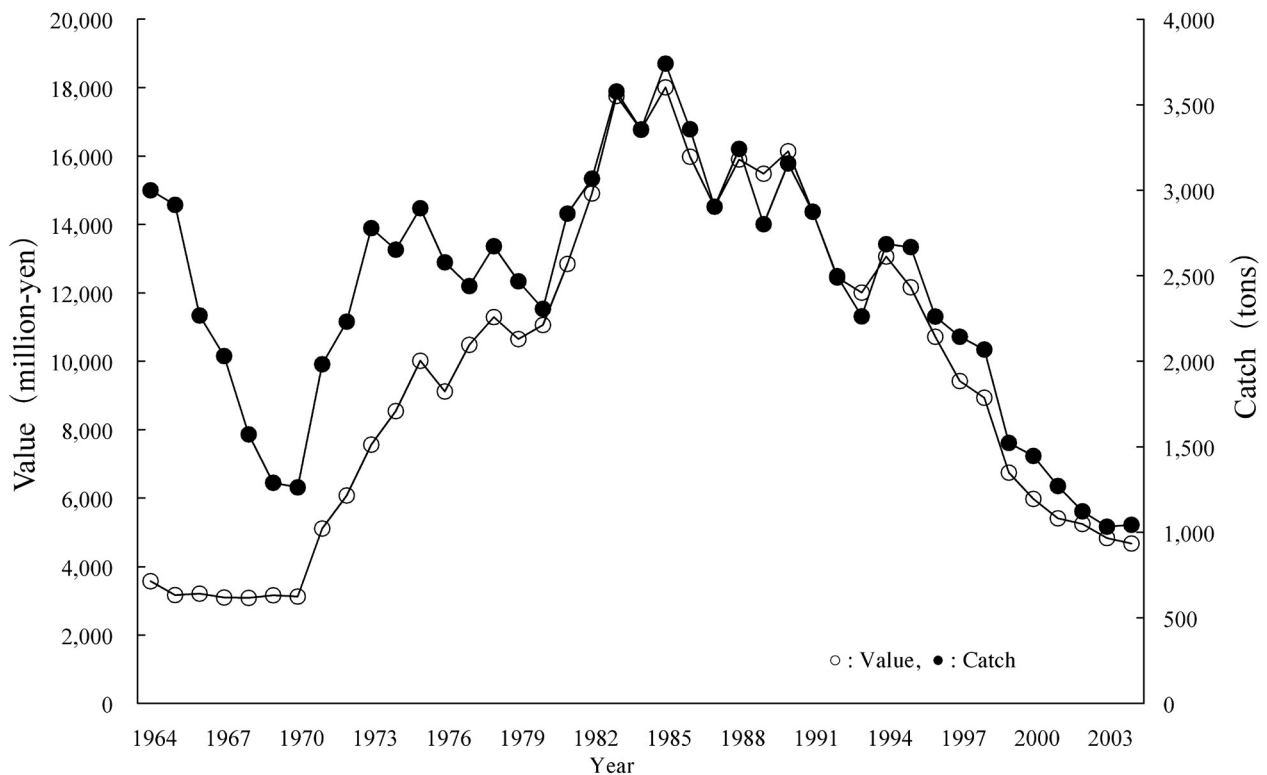


Fig. 1. Fishery production of kuruma prawn in Japan. Data from Ministry of Agriculture Forestry Fisheries (1964-2004).

漁業協会志布志事業場（現増養殖研究所志布志庁舎、以下：志布志庁舎と記す）では、1967年から本種の種苗生産に取り組み、その後関係府県が行うクルマエビ放流事業の支援を目的に2000年まで33年間にわたり、稚エビあるいは種苗の供給を行ってきた。1970年代には、1年間に1億尾前後の種苗を生産できるようになったが、1971年に民間の養殖場のクルマエビ種苗生産過程でバキュロウイルス性中腸腺壊死症 (baculoviral mid-gut gland necrosis: BMN) (桃山, 1981; Sano *et al.*, 1981) が発生して以降、クルマエビ種苗の計画的な生産に多大な支障を来した。また、1996年には、志布志庁舎で種苗放流を目的とした中間育成中のクルマエビに急性ウイルス血症 (penaeid acute viremia: PAV) が発生し (Inouye *et al.*, 1996)、種苗放流事業の大きな障害となった。1995年以降、種苗期の疾病の流行による放流用種苗数の減少や、放流種苗の平均体長の大型化に伴う尾数減少により、種苗の放流数が急激に減少している (Fig. 2)。種苗放流の効果については、放流効果が高いと考えられる大型種苗を放流するようになったものの、漁獲量は減少しており、クルマエビ資源の変遷は種苗放流と無関係に動いていると考えられている (浜崎, 北田, 2005)。しかし、種苗放流とクルマエビ資源量の増加が直接的に結びつく、高い回収率が得られた事例もあり、地域的な規模ではク

ルマエビの栽培漁業が成立する可能性もある (浜崎, 北田, 2005)。

(2) 養殖生産

養殖生産に目を移すと、国内の生産量は1988年にこれまでの最高値となる3,020トンの生産量を記録した (Fig. 3)。この時の経営体数は159で施設面積は6,035,000m²であった (使用施設当たりの生産量: 5.00トン/ha)。平成17年(2005年)の生産量は1,824トンで、経営体数は120、施設面積は4,570,000m²にまで減少している (4.00トン/ha)。1993年の国内におけるPAVの発生以来、単位面積当たりの生産量がピーク時の80%程度にまで減少していることを示しており、PAVあるいはピブリオ病の予防対策の一環として2期作から1期作への転換や放養密度の低下 (桃山, 室賀, 2005) などの、セーブした飼育養成を行っている状況が窺える。しかし2000年以降、養殖生産量は漁業生産量を安定して上回っており、国内の重要なクルマエビ供給産業である。なお、以下の記述において、PAVをホワイトスポット病 (white spot disease, WSD) と、またPAVの原因ウイルス penaid rod-shaped DNA virus (PRDV) (Inouye *et al.*, 1996) を white spot syndrome virus (WSSV) と記す。

クルマエビ類には、大型の食用種が多く含まれ、ホワイトレグシュリンプ (*Litopenaeus vannamei*),

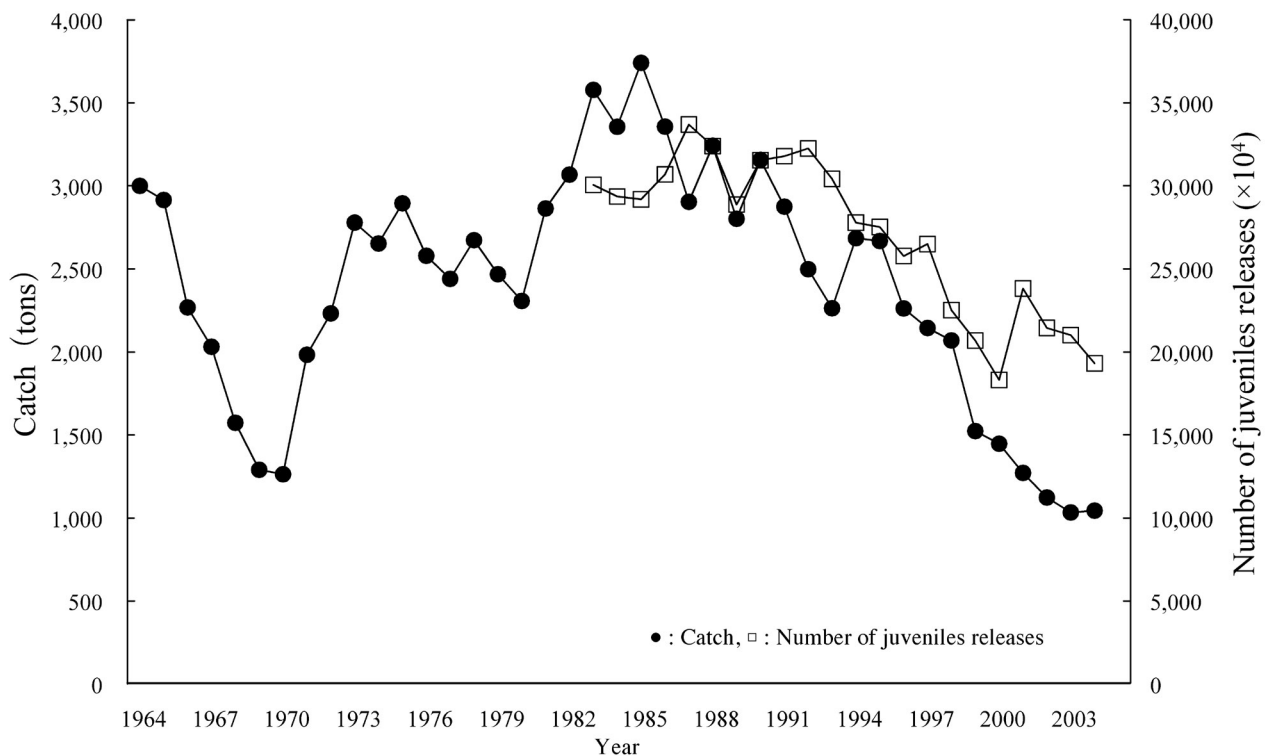


Fig. 2. Fishery production and release project of kuruma prawn in Japan. Data from Ministry of Agriculture Forestry Fisheries (1964-2004).

ウシエビ (*P. monodon*), コウライエビ, Banana prawn (*Melicertus merginatus*), インドエビ (*Fenneropenaeus indicus*), クルマエビ, blue shrimp (*L. stylirostris*) を中心とした7種が東南アジア地域で盛んに養殖されている (Fig. 4)。FAO の漁獲統計によ

ると (FAO Fish stat 1970-2006), 1980年以降東南アジアでの養殖生産量が増加するにつれて, 右肩上がり生産量が増加し続け, 2006年における世界のクルマエビ類養殖生産量は, 3,175,856トンに達している (Fig. 4)。中国においては, 2001年以降それまでの対象種で

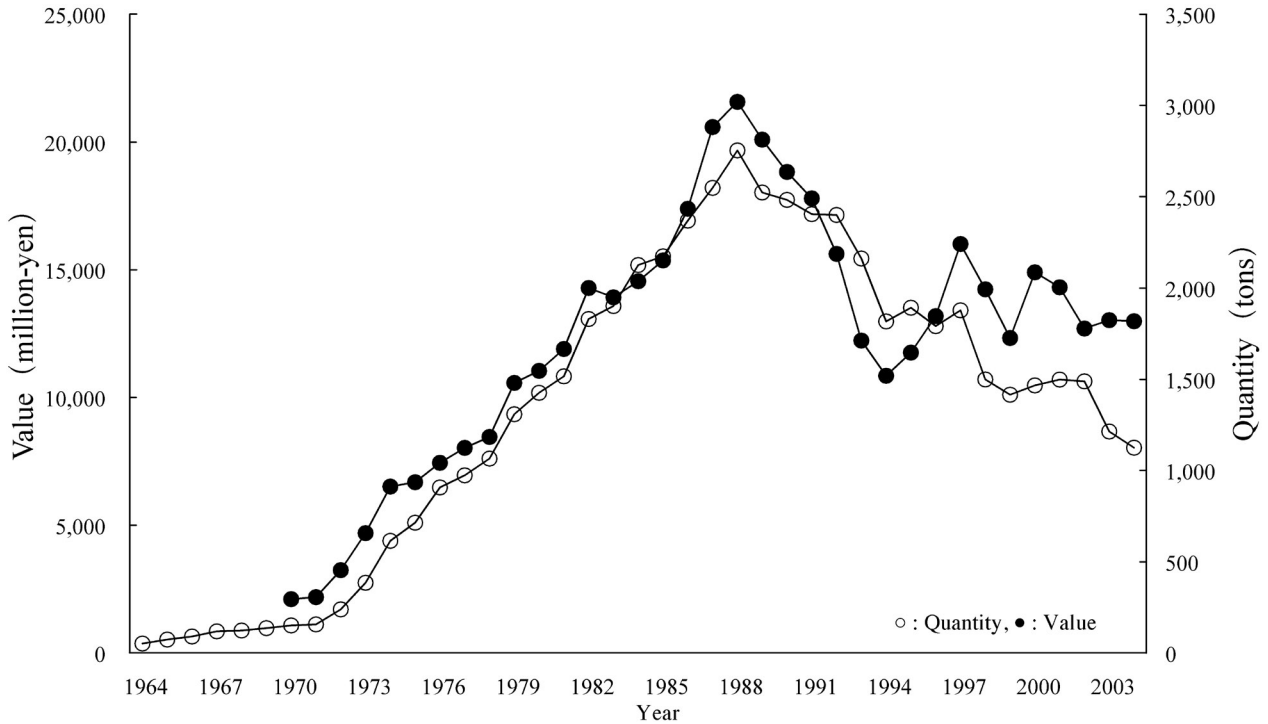


Fig. 3. Aquaculture of kuruma prawn in Japan. Data from Ministry of Agriculture Forestry Fisheries (1964-2004).

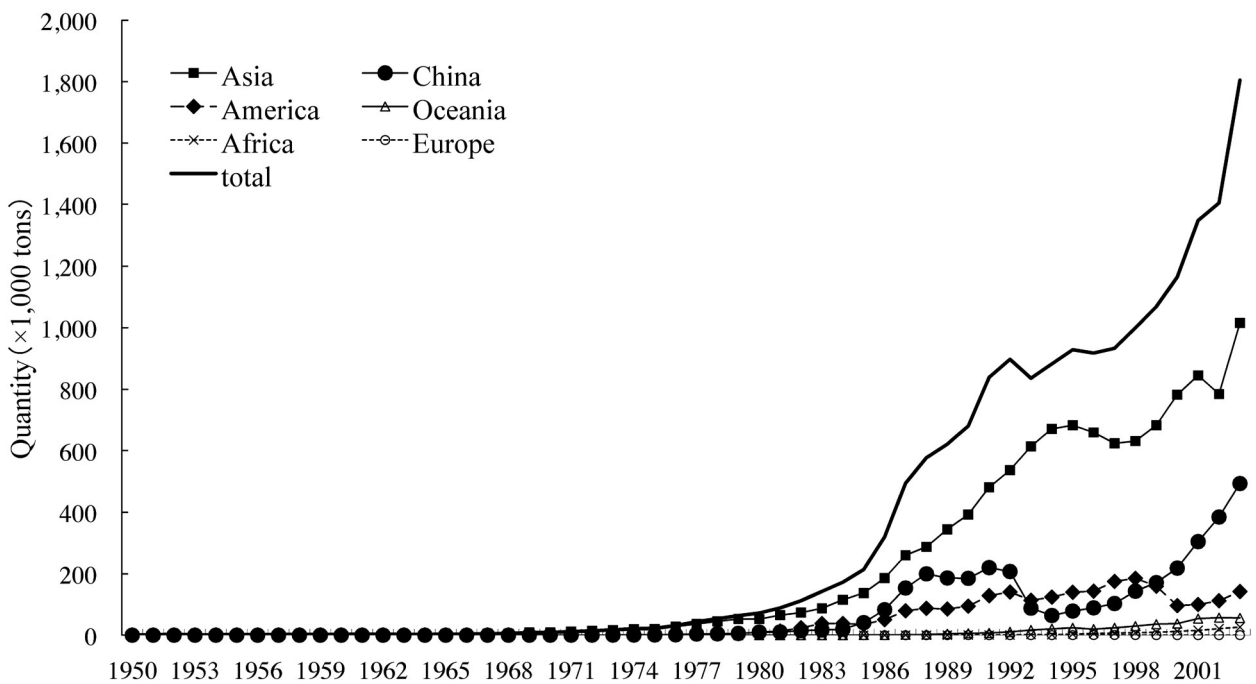


Fig. 4. Production volume of penaeid shrimp aquaculture in region of the world (FAO).

あったコウライエビに加えて、ホワイトレグシュリンプ (*L. vannamei*) の生産を開始し、2003年以降は、クルマエビ、ウシエビも加わり中国国内の生産量が、2006年は1,242,385トンと2001年の4倍以上に達し、中国一国で総生産量の39%を占めるまで急速に増加した。特にホワイトレグシュリンプは、その生産量2,136,048トン（総生産量の67.3%）の47%を中国一国で生産しており、世界で最も多い生産量を誇る (Fig. 4, 5)。一方、クルマエビの生産量は2006年に53,098トン記録し、総生産量に占めるクルマエビの生産量が1.7%にまで急激に増加した。なお、2006年のクルマエビの生産量である53,098トンの95.5%は中国で生産された。2003年と2006年の総生産量に占める種類別の生産漁を比較するとホワイトレグシュリンプの生産量が約3倍となり、総生産量の67%を占めるまでとなった。ホワイトレグシュリンプは、病害に強く、ウシエビ

に対して約2倍の収容密度で飼育することができ効率的な生産が可能であることから、主要生産国での対象種がウシエビからホワイトレグシュリンプへと切り替えられたことが生産量増大の背景にある。また、先進国を中心に健康食品としての水産物が注目され、消費されるようになり、世界的に需要の拡大が見られているのと同時に、経済発展めざましい中国での消費拡大による需要の増加が増産の背景にある。

2. クルマエビ類の増養殖における感染症による病害

(1) 国内における病害問題

日本の養殖クルマエビにおける病害問題は、桃山、室賀 (2005) によって、また、種苗生産過程の海産魚介類の疾病発生状況 (1994~1999) は、鴨志田ら (2005) によって詳しくレビューされている。それによると細菌性疾病は、1970年頃のクルマエビ

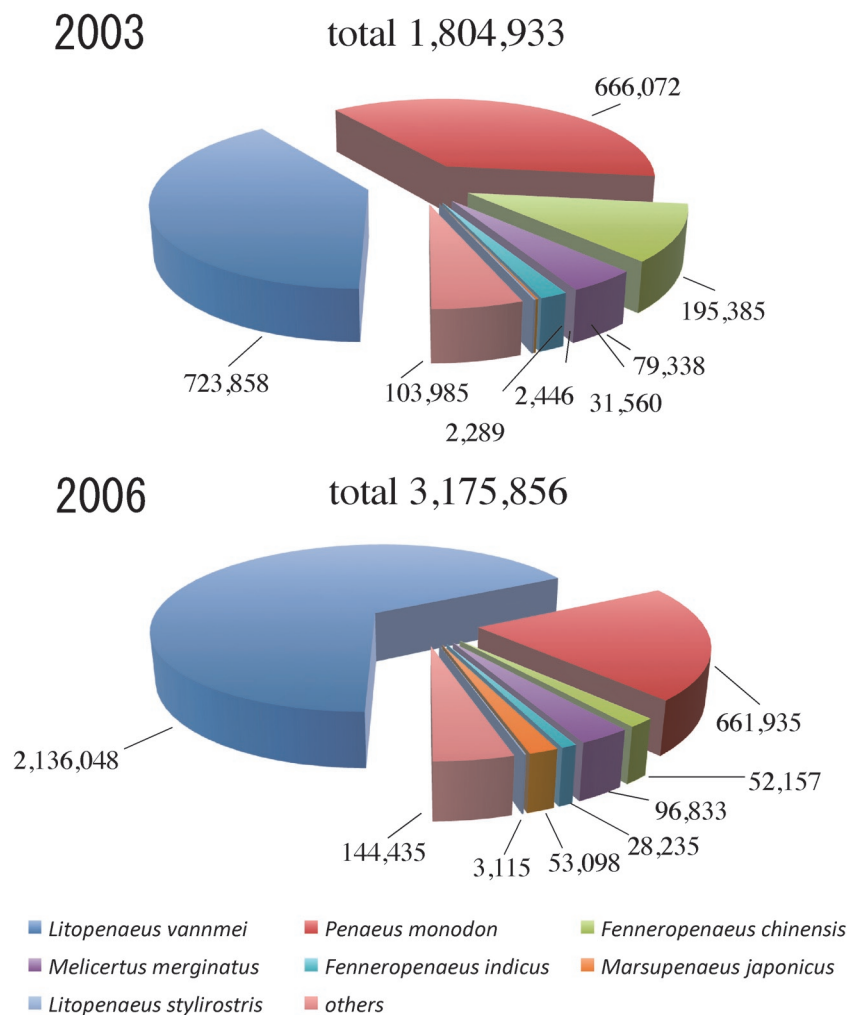


Fig. 5. Production volume of penaeid shrimp aquaculture in the world (FAO).

養殖場において、死亡個体からビブリオ属細菌が分離され、現在においても継続的に発生が確認されている感染症である (Fig. 6, 水産資源保護協会データ) (桃山, 室賀, 2005)。 *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* は、しばしばクルマエビ類養殖生産において分離される細菌であり、種苗生産過程においても *V. harveyi*, *V. splendidus* の分離が報告されている (Lightner, 1996)。1980年代以降、日本のクルマエビ養殖場での被害が問題となったビブリオ病 (高橋ら, 1985; Takahashi *et al.*, 1998) の原因細菌は、 *V. penaeicida* とされ (Ishimaru *et al.*, 1995), クルマエビに対して強い病原性を示すことが確認されており (高橋ら, 1985; de la Peña *et al.*, 1993, 1995; 江草ら, 1988), 日本のクルマエビ養殖場に常在する典型的な条件性病原体となっている (魚介類の感染症・寄生虫病, 2004)。2005年には、鹿児島県内のクルマエビ養殖場において高温下 (27℃) で大量死をもたらした新種の原因菌である *V. nigripulchritudo* によるビブリオ病が報告されている (Sakai *et al.*, 2007)。Fig. 6には、各年の全疾病被害額に占める疾病別の被害率を示した。1992年のビブリオ病の被害率は、63.8%と当時の最も深刻な病害であった。1993年に西日本で WSD が

発生して以降、ビブリオ病 (17.1%) の被害率が減少し、WSD (80.2%) に置き換わった様に見えるが、2004年には WSD (9.3%) の被害は減少しビブリオ病 (68.2%) の被害率が再び増加した。2005年はビブリオ病が49.0%, WSD が35.8%で、それらの被害額は同程度となり、クルマエビ病害ではこれら2疾病が常に問題になっている。種苗生産過程においても、1999年に体長20~25mmの個体でビブリオ病の発生事例があり、その発生率 (疾病発生時例数 / 飼育事例数) および死亡率の高さが問題となったことが報告されている (鴨志田ら, 2005)。

真菌病としては、フサリウム症の被害が WSD およびビブリオ病に次いで多く報告されている (Fig. 6)。フサリウム症は、クルマエビの鰓が黒色になるのが特徴で、鰓における呼吸障害と中枢神経や腹行動脈機能障害が起きることによって死亡すると考えられている (桃山, 室賀, 2005)。病原菌は *Fusarium solani* (畑井ら, 1978; 畑井, 江草, 1978) である。有効な治療法が知られていないことから、予防的にエビの収穫後の砂床中の *F. solani* を殺菌することが推奨されている (畑井ら, 1978)。一方、種苗生産過程においては、1994年から1999年まで毎年本症の発生が報告され、甲殻類の種苗生産を行う上で大きな問題となっている (鴨志

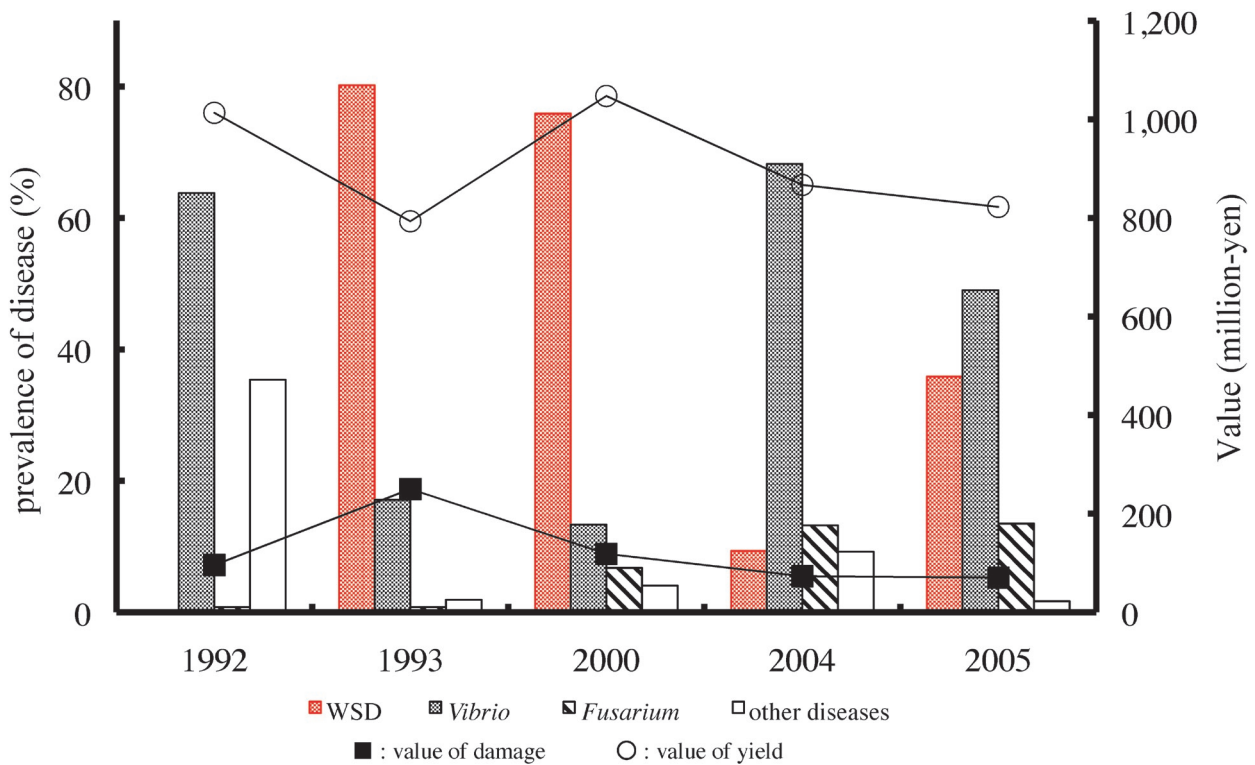


Fig. 6. Occurrence of infectious disease in aquaculture of kuruma shrimp in Japan. Source : Japan Fisheries Resource Conservation Association

田ら, 2005)。フサリウム症の発病時期は、クルマエビ類ではノープリウスからポストラーバ10日齢期にかけて発生し、死亡率は非常に高く、発病すると全滅するケースが多い(鴨志田ら, 2005)。

一方、ウイルス病であるバキュロウイルス性中腸腺壊死症(Baculoviral mid-gut gland necrosis virus: BMN)は、クルマエビのポストラーバ期10日齢前後に発生する。急性で致死性の高いウイルス感染症である。病原体は、Baculoviral mid-gut gland necrosis virus (BMNV)で、エンベロープを有する大型の桿状DNAウイルスである(Sano *et al.*, 1981)。本病は、中腸腺と腸管の一部の白濁を特徴とし、症状は過急性に経過することが多く、感染後数日間で死亡する。本病の対策として、種苗生産過程における受精卵の回収時に親エビの糞などを清浄な海水で洗浄することで垂直感染の防除が可能とされる(Sano and Momoyama, 1992)。ただ現在では、本疾病による病害の報告はほとんどなく(水産資源保護協会データ)、種苗生産過程においても1991年以降の発生報告はない(鴨志田ら, 2005)。

(2) WSDによる病害問題

1993年、日本国内のクルマエビの増養殖はWSDにより甚大な被害を受けた。2000年以降、被害のピークは過ぎたものの、2004年には86.7億円の生産額に対して7.3億円の被害が報告され、WSDは現在もなお深刻な問題である(Nakano *et al.*, 1994; Momoyama and Muroga, 2005) (Fig. 6)。WSDは、中国から輸入されたクルマエビ種苗を発生源とし、西日本各地のクルマエビ養殖場へ瞬く間に伝播したと考えられている(中野ら, 1994)。本病は、十脚目のエビ・カニ類が感染するウイルス性疾病で、アジアおよび中近東のクルマエビ類養殖でも甚大な被害をもたらしている(Lightner, 1996; Wang *et al.*, 1998; Jory and Dixon, 1999)。WSDはこれまでに東南アジア諸国の養殖クルマエビ、ウシエビ、アカオエビ(*F. penicillatus*)、およびコウライエビなどで発生が報告されている(Table 1)。この他のクルマエビ科に属するクルマエビ(*P. semisulcatus*)、インドエビ(*F. indicus*)、Banana shrimp(*F. merguensis*)、フトミゾエビ(*Melicertus latisulcatus*)、White leg shrimp、White shrimp(*L. setiferus*)、Blue shrimp(*L. stylirostris*)、Northern brown shrimp(*Farfantepenaeus aztecus*)、Northern pink shrimp(*Fa. duorarum*)、ヨシエビ、Ginger prawn(*M. monoceros*)、Kadal shrimp(*M. dobsoni*)、Fine shrimp(*M. elegans*)、トラエビ(*M. acclivis*)、アカエビ(*M. barbata*)、キシエビ(*M. dalei*)、サルエビ(*Trachypenaeus cuivirostris*)、

Kiddi shrimp(*Parapenaeopsis styliifera*)の9属22種に感染が確認された(Table 1)。WSSVは、ワタリガニ科およびイセエビ科の数種で、また餌料生物に用いられるアルテミア(*Artemia* sp.)やワムシ(*Brachionus urceus*)でも感染が確認され、さらに昆虫類からもWSSVが検出された事例があり、現在までに12目21科2亜科51属の生物で感染が確認される宿主範囲の広いウイルスである。

WSDは、我が国で報告されたPAVと同一の疾病と考えられている(Takahashi *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000)。前述の如く、PAVの原因ウイルスはPRDVと命名された(Inouye *et al.*, 1996)。本病および原因ウイルスは、国際的にはWSDVあるいはWSSVと呼ばれるが、WSDたる病名の由来となっている罹病個体の外骨格の白点もしくは白斑の症状が、必ずしも本病に特有の症状ではないことから、日本では現在もPAVの病名が一般的に使われている。ICTV(International Committee on Taxonomy of Viruses)第8版(Fauquet *et al.*, 2005)では、本疾病の病原ウイルスはwhite spot syndrome virus(WSSV)で、ニマウイルス科(*Nimavirida*)ウィスポウイルス属(*Whispovirus*)に分類される(Fauquet *et al.*, 2005)。WSSV粒子は、エンベロープで覆われた卵形あるいは長楕円の桿状で、大きさは幅が120-150 nm、長さが270-290 nmで、粒子の一端に鞭毛様の構造物が付属している(Wongteerasupaya *et al.*, 1995)。ビリオンは、最も外側に脂質の3層からなるエンベロープタンパク質があり、その内側に存在するテグメントタンパク質によって桿状のヌクレオカプシッドが包含されている。WSSVは、約300 kbpの2本鎖DNAをゲノムとし、エンベロープタンパク質由来のVP19およびVP28、テグメントタンパク質由来のVP24およびVP26、ヌクレオカプシッドタンパク質由来のVP15、VP64の計6種類の主要構造タンパク質から構成される(van Hulten *et al.*, 2000 a, b; van Hulten *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002a)。クルマエビのWSD罹病個体は、外骨格の白斑あるいは白点の形成に加え、体色が赤変もしくは褪色化し(Fig. 7)、感染末期にはウイルス血症となる(Momoyama *et al.*, 1995)。病理組織学的には、感染エビの胃の上皮細胞層、結合組織、リンパ様器官、造血組織の中胚葉・外胚葉起源細胞の核の肥大と無構造化が観察される(桃山ら, 1994; 井上ら, 1994)。また最近の研究で、実験感染エビの心臓心筋組織に顕著な壊死が観察され、これがWSD罹病クルマエビの致死病変であるとする報告がある(Miyazaki *et al.*, 2008)。

Table 1. List of WSSV confirmed naturally and/or experimentally infected host species

	Scientific Name	Common Name	Type of Infection*	Reference
Marinewater				
Dendrobranchiata				
Penaeidae				
	<i>Marsuenaenus Marsuenaenus japonicus</i>	Kuruma prawn	N, E	Inouye <i>et al.</i> , 1994; Takahashi <i>et al.</i> , 1994; Lo <i>et al.</i> , 1996; Wang <i>et al.</i> , 1998
	<i>Penaeus Penaeus monodon</i>	Giant tiger prawn	N, E	Wongteerasupaya <i>et al.</i> , 1995; Chou <i>et al.</i> , 1995; Lo <i>et al.</i> , 1996; Karunasagar <i>et al.</i> , 1997; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
	<i>P. semisulcatus</i>	Green tiger prawn	N, E	Maeda <i>et al.</i> , 1998; Momoyama <i>et al.</i> , 1999; Lo <i>et al.</i> , 1996; Wang <i>et al.</i> , 1998; Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>Fenneropenaeus Fenneropenaeus chinensis</i>	Chinese or fleshy prawn	N	Huang <i>et al.</i> , 1995; Flegel, 1997
	<i>F. penicillatus</i>	Red-tailed prawn	N	Lo <i>et al.</i> , 1996a; Chou <i>et al.</i> , 1995; Wang <i>et al.</i> , 1998
	<i>F. indicus</i>	Indian white prawn	N, E	Wongteerasupaya <i>et al.</i> , 1996; Flegel, 1997; Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>F. merguensis</i>	Banana prawn	N	Wongteerasupaya <i>et al.</i> , 1996; Flegel, 1997
	<i>Melicertus Melicertus latisulcatus</i>	Wester king shrimp	E	Momoyama <i>et al.</i> , 1999
	<i>Litopenaeus Litopenaeus vannamei</i>	Whiteleg shrimp	N, E	Lightner <i>et al.</i> , 1998; Soto and Lotz, 2001; Rodriguez <i>et al.</i> , 2003
	<i>L. setiferus</i>	White shrimp	E	Lightner <i>et al.</i> , 1998
	<i>L. stylirostris</i>	Blue shrimp	E	Tapay <i>et al.</i> , 1997a; Lightner, 1996
	<i>Farfantepenaeus Farfantepenaeus aztecus</i>	Northern brown shrimp	E	Lightner <i>et al.</i> , 1998
	<i>Fa. duorarum</i>	Northern pink shrimp	E	Lightner <i>et al.</i> , 1998
	<i>Metapenaeus Metapenaeus ensis</i>	Greasy back shrimp	N, E	Momoyama <i>et al.</i> , 1997; C. S. Wang <i>et al.</i> , 1997; Lan, Lu and Xu, 2002; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
	<i>M. monoceros</i>		E	Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>M. dobsoni</i>	Kadal shrimp	N, E	Rajendran <i>et al.</i> , 1999; Lan, Lu and Xu, 2002; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
	<i>M. elegans</i>		N	Lan, Lu and Xu, 2002; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
	<i>M. acclivis</i>	Tora velvet shrimp	N	Momoyama, 2003
	<i>M. barbata</i>	Whiskered velvet shrimp	N	Momoyama, 2003
	<i>M. dalei</i>	Kishi velvet shrimp	N	Momoyama, 2003
	<i>Trachypenaeus Trachypenaeus curvirostris</i>	Southern rough shrimp	E	Chang <i>et al.</i> , 1998a; Y. C. Wang <i>et al.</i> , 1998; Momoyama, 2003
	<i>Parapenaeopsis Parapenaeopsis styliifera</i>	Kiddi shrimp	N	Hossain <i>et al.</i> , 2001; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
	Aristeidae			
	<i>Aristeus Aristeus sp.</i>		N	Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
	Solenoceridae			
	<i>Solenocera Solenocera crassicornis</i>	Corstal mud shrimp	N	Hossain <i>et al.</i> , 2001
	Sergestidae			
	<i>Acetes Acetes sp.</i>	Krill	E	Supamattaya <i>et al.</i> , 1998
Pleocyemata				
	Alpheoidea			
	<i>Alpheus Alpheus brevicristatus</i>	Snapping shrimp	N	Takahashi <i>et al.</i> , 2003
	<i>A. lobidens</i>	Apping shrimp	N	Takahashi <i>et al.</i> , 2003
	Palaemonidae			
	<i>Palaemon Palaemon adspersus</i>	Baltic prawn	E	Corbel <i>et al.</i> , 2001
	<i>Pa. styliiferus</i>	Grass shrimp	N	Lo <i>et al.</i> , 1996; Flegel, 1997
Freshwater				
Pleocyemata				
	Palaemonidae			
	<i>Macrobrachium Macrobrachium rosenbergii</i>	Ginat river prawn	N, E	Pramod <i>et al.</i> , 2002; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002; Lo <i>et al.</i> , 1996; Flegel, 1997; Chang <i>et al.</i> , 1998; Wang <i>et al.</i> , 1997; Rajendran <i>et al.</i> , 1999; Hossain <i>et al.</i> , 2001
	<i>Ma. idella</i>	Sunset prawn	E	Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>Exopalaemon Exopalaemon orientis</i>	Oriental prawn	N, E	Lo <i>et al.</i> , 1996a; Flegel <i>et al.</i> , 1997; Chang <i>et al.</i> , 1998; Wang <i>et al.</i> , 1998
	Astacidae			
	<i>Pacifastacus Pacifastacus leniusculus</i>	Signal crayfish	E	Jiravanichpaisal <i>et al.</i> , 2001
	<i>Astacus Astacus leptodactylus</i>	Turkish crayfish	E	Corbel <i>et al.</i> , 2001
	Cambaridae			
	<i>Procambarus Procambarus clarkii</i>	Red swamp crayfish	E	Wang <i>et al.</i> , 1998; Chang <i>et al.</i> , 1998
	<i>Orconectes Orconectes limosus</i>	Spinycheek crayfish	E	Corbel <i>et al.</i> , 2001
	Parastacidae			
	<i>Cherax Cherax destructor albidus</i>	Yabby	E	Edgerton, 2004
	<i>C. quadricarinatus</i>	Australian redclaw	E	Shi <i>et al.</i> , 2000
	Pandalidae			
	<i>Heterocarpus Heterocarpus sp.</i>		N	Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
Stomatopoda				
	Squillidae			
	<i>Squilla Squilla sp.</i>		N, E	Chakraborty <i>et al.</i> , 2002; Hossain <i>et al.</i> , 2001
Crab				
Pleocyemata				
	Brachyura			
	Calappidae			
	<i>Calappa Calappa philagius</i>	Boxer crab	E	Lo <i>et al.</i> , 1997a; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002; Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>Ca. lophos</i>	Box crab	N, E	Flegel, 1997; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
	Portunidae			
	<i>Charybdis Charybdis feriata</i>	Coral crab	N, E	Lo <i>et al.</i> , 1997a; Y. C. Wang <i>et al.</i> , 1998; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002; Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>Cha. natator</i>	Hairyback crab	N	Lo <i>et al.</i> , 1997a; Flegel, 1997
	<i>Cha. annulata</i>	Swimming crab	N	Hossain <i>et al.</i> , 2001; Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>Cha. cruciata</i>	Red sea crab	N	Hossain <i>et al.</i> , 2001; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
	<i>Portunus Portunus pelagicus</i>	Blue swimming crab	N, E	Lo <i>et al.</i> , 1996, 1997a; Supamattaya <i>et al.</i> , 1998; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002; Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>Po. sanguinolentus</i>	Threespot swimming crab	N, E	Lo <i>et al.</i> , 1997a; Chang <i>et al.</i> , 1998; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002; Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>Po. trituberculatus</i>	Swimming crab	N	Maeda <i>et al.</i> , 1998; Momoyama <i>et al.</i> , 1999

	<i>Scylla Scylla serrata</i>	Mangrove or mud crab	N, E	Lo <i>et al.</i> , 1996a; Kanchanaphum <i>et al.</i> , 1998; Supamattaya <i>et al.</i> , 1998; Rajendran <i>et al.</i> , 1999; Cheng <i>et al.</i> , 2000; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002; Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>S. tranquebarica</i>	Mangrove or mud crab	E	Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>Podophthalmus Podophthalmus vigil</i>	Long-eye swimming crab	E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>Thalamita Thalamita danae</i>	Swimming crab	N, E	Flegel, 1997; Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>Liocarcinus Liocarcinus depurator</i>	Harbour crab	E	Corbel <i>et al.</i> , 2001
	<i>L. puder</i>	Velvet swimming crab	E	Corbel <i>et al.</i> , 2001
Grapsidae				
	<i>Helice Helice tridens</i>	Shore crab	N	Lo <i>et al.</i> , 1996a; Maeda <i>et al.</i> , 1998
	<i>Metapograpsus Metapograpsus messor</i>	Purple climber crab	N, E	Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>Sesarma Sesarma sp.</i>	Marsh crab	N, E	Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>Grapsus Grapsus albolineatus</i>	Rock crab	E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
Varurinae				
	<i>Pseudograpsus Pseudograpsus intermedus</i>	Mosaic crab	N	Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
Majidae				
	<i>Doclea Doclea hybrida</i>		E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
Xantidae				
	<i>Halimede Halimede ochtodes</i>	Hairy crab	E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>Liagore Liagore rubromaculata</i>		E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
Matutidae				
	<i>Matuta Matuta miersii</i>	Moon crab	E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
Dorippidae				
	<i>Paradorippe Paradorippe granulata</i>		E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
Parthenopidae				
	<i>Parthenope Parthenope prensor</i>	Elbow crab	E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
Leucosiidae				
	<i>Philyra Philyra syndactyla</i>	Purse crab	E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
Cancridae				
	<i>Cancer Cancer pagurus</i>	Edible or rock crab	E	Corbel <i>et al.</i> , 2001
Ocypodoidea				
Ocypodidae				
	<i>Macrophthalmus Macrophthalmus sulcatus</i>	Ghost/fiddler crab	N	Hossain <i>et al.</i> , 2001
	<i>Uca Uca pugilator</i>	Calico fiddler crab	E	Kanchanaphum <i>et al.</i> , 1998
	<i>Gelasimus marionis nitidus</i> (synonym of <i>Uca vomeris</i>)		N	Hossain <i>et al.</i> , 2001
Gecarcinucoidea				
Parathelphusidae				
	<i>Somanniathelphusa Somanniathelphusa sp.</i>	Black rise crab	E	Flegel, 1997
Anomura				
Paguroidea				
Lithodidae				
	<i>Lithodes Lithodes maja</i>	Deep sea king crab	E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
Lobster				
Palinura				
Palinuroidea				
Palinuridae				
	<i>Panilurus Panilurus ornatus</i>	Tropical rock spiny lobster	E	Flegel, 1997; Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>Pan. versicolor</i>	Painted spiny lobster	E	Chang <i>et al.</i> , 1998a
	<i>Pan. longipes</i>	Longlegged spiny lobster	E	Flegel, 1997
	<i>Pan. penicillatus</i>	Transpacific spiny lobster	E	Chang <i>et al.</i> , 1998a
	<i>Pan. homarus</i>	Scalloped spiny lobster	E	Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>Pan. polyphagus</i>	Mud spiny lobster	E	Rajendran <i>et al.</i> , 1999
Scyllaridae				
Scyllarinae				
	<i>Scyllarus Scyllarus arctus</i>	Small European locust lobster	E	Corbel <i>et al.</i> , 2001
Anostraca				
Artemiidae				
	<i>Artemia Artemia sp.</i>		E	Li <i>et al.</i> , 2003
Other organisms				
Copepoda		copepod	N	Lo <i>et al.</i> , 1996a
Ploima				
Brachionidae				
	<i>Brachionus Brachionus urceus</i>	Rotifer	N, E	Yan <i>et al.</i> , 2004; Zhang <i>et al.</i> , 2006; Yan <i>et al.</i> , 2007
Insect				
Coleoptera				
Chrysomelidae				
	<i>Mantura Mantura sp.</i>		N	Flegel, 1997
Diptera				
Muscomorpha				
	<i>Ephydriidae Ephydriidae sp.</i>	Shore fly	N	Lo <i>et al.</i> , 1996b

12orders 21families 2subfamilies 51genuses

Type of infection*: N: natural infection; E: experimentally infected



Fig. 7. WSSV infected kuruma shrimp. upper ; health, lower ; infected

クルマエビの種苗生産施設では、1995年に初めてWSDの発生が報告され、1999年までほぼ毎年報告されている（鴨志田ら、2005）。本疾病の発生は、ヨシエビにおいても報告があり、近年でもクルマエビおよびヨシエビの種苗生産機関の10%程度でWSSVの検出あるいはWSDの発生が認められ、計画的な種苗放流事業の妨げとなっている。クルマエビの種苗生産過程におけるWSSVの主たる感染経路は、垂直伝播であることから（Mushiake *et al.*, 1998; Satoh *et al.*, 1999）、その防除対策としてWSSVフリー親エビの選別、ヨード剤を用いた受精卵の消毒および飼育水の殺菌が重要である（Mushiake *et al.*, 1998, 1999; Satoh *et al.*, 1999, 2001; 佐藤ら2003）。これらの対策により、陸上施設等を用いた種苗生産過程でのWSSV防除対策はほぼ確立されたが、中間育成場や養殖施設においては、飼育環境中に生息する甲殻類からの、あるいは飼育海水を介したWSSVの水平伝播が起こる危険性があり、未だ解決されていない。事実、Maeda *et al.* (1998), Momoyama *et al.*, (2003) は養殖場に生息する甲殻類からWSSVが検出されることを、またWu *et al.* (2001) は共食いによる水平感染がWSSVの重要な伝播経路であることを報告しており、養殖場や放流用種苗の中間育成場における水平感染対策も重要な課題である。

(3) WSDの診断あるいはWSSVの検出方法

WSD罹病エビの血リンパを用いた診断法は、暗視野顕微鏡下で観察すると約0.5 μm の多数の微粒子が認められることや、胃上皮層の感染細胞の核が10~15 μm の円形あるいは楕円形の輪郭明瞭で無構造の白色物体として観察されることから簡便な方法として報告されている（Momoyama *et al.*, 1995）（Table

2）。原因ウイルスの検出には、特異的プライマーを用いてWSSVの遺伝子を検出するPCR法（Takahashi *et al.*, 1996; 木村ら, 1996; Lo *et al.*, 1996b）が開発され、病エビの診断をはじめ、キャリアーや親エビからのウイルス遺伝子の検出法として用いられている。その他、外国では *in situ* hybridization (Durand *et al.*, 1996, Wongteerasupaya *et al.*, 1996)、蛍光抗体法 (Lo *et al.*, 1997; Zhan *et al.*, 1999; Poulos *et al.*, 2001)、dot blot hybridization (Chang *et al.*, 1998)、dot immunoblot assay (Poulos *et al.*, 2001; You *et al.*, 2002)、ウェスタンブロット法 (Poulos *et al.*, 2001)、ELISA法 (Chen *et al.*, 2002b)、初代培養細胞を用いたウイルス分離法も報告されている (Tapay *et al.*, 1997)。従来のPCR法 (木村ら, 1996) では、nested PCR反応が終了するまでに約5時間を要し、この間に産卵水槽毎に管理している卵の発生が進み、種苗生産水槽に収容するまでの間にふ化への悪影響が懸念された。そのため、虫明ら (1999学会発表)^{*4}は、木村ら (1996) の開発したPCR法を若干改良し、PCR法の熱変性、アニーリング及び伸長の3つのステップの反応のうち、アニーリングのステップを省略する2ステップPCR法 (シャトルPCR法) により反応時間の短縮を図った。その結果、従来法 (木村ら, 1996) と2ステップPCR法を用いてWSSVの検出感度を比較しても、全く遜色のない結果が得られるとともに、nested PCRまでの反応時間を半分の約2.5時間に短縮することに成功した。現在も多くのクルマエビ種苗生産機関では、WSSV陽性親エビを選別するためにPCR法による検査が行われているが、PCR法による検出系が報告 (木村ら, 1996) されてから既に10年以上が経過し、最近では簡便で高効率、高精製の核

Table 2. Diagnostic methods for WSD Diagnostic methods Reference

Diagnostic methods	Reference
Dark-field microscopic observation	Momoyama <i>et al.</i> , 1995
PCR	Takahashi <i>et al.</i> , 1996、Kimura <i>et al.</i> , 1996、Lo <i>et al.</i> , 1996b
In situ hybridization	Durand <i>et al.</i> , 1996、Wongteerasupaya <i>et al.</i> , 1996
Immunofluorescence assays	Lo <i>et al.</i> , 1997、Zhan <i>et al.</i> , 1999、Poulos <i>et al.</i> , 2001
Dot blot hybridization	Chang <i>et al.</i> , 1998
Dot immunoblot assay	Poulos <i>et al.</i> , 2001、You <i>et al.</i> , 2002
Western blot techniques	Poulos <i>et al.</i> , 2001
ELISA	Chen <i>et al.</i> , 2002b
Primary cell culture	Tapay <i>et al.</i> , 1997b

酸抽出キットや高速 PCR 機器あるいは高温耐性に優れた DNA 合成酵素などが市販されている。最新の情報を踏まえつつ適材適所に改良された検査手法の導入を図る必要がある。また、高感度な検出法であることから、感染性がないウイルスを検出することも考えられることからその判定は慎重に行わなければならないし、確定診断を行う場合は病理組織学的検査も必要であろう。

3. クルマエビ類の生体防御能を利用した WSSV 防除

クルマエビの種苗生産過程においては WSSV フリー産卵親魚の選別、ポビドンヨードによる受精卵消毒、ならびに殺菌海水での飼育により中間育成に至るまでの WSSV の垂直伝播による感染防除対策が構築され (Mushiake *et al.*, 1999 ; Satoh *et al.*, 2001 ; 佐藤ら, 2003), 主に放流を目的とする種苗生産機関において継続的に実施されている (Fig. 8)。中間育成および養殖過程では、WSSV の重要な感染経路とされる環境生物の捕食、共食いあるいは水系感染による水平感染 (Maeda *et al.*, 1998 ; Wu *et al.*, 2001 ; Momoyama *et al.*, 2003) の防止対策がない。ウイルスフリーの放流種苗に対して、水平伝播対策を施すことは主にコストの面から、現実的でないため対策が行われていない

が、逆に養殖生産においては、WSSV 検査に多大な労力とコストを要するウイルスフリーの種苗の生産には力点を置かず、養殖過程に実施可能な効果的で効率的な水平伝播対策の構築が望まれている。

甲殻類の生体防御機構については、産業上重要なエビ類の増養殖生産過程で病害が多発することから、その解明・研究が注目され始めている。高橋ら (1995) の総説では、無脊椎動物に病原微生物の死菌あるいは生菌を投与することで誘導される生体防御は、病原体特異抗体の産生を行わないので、免疫賦活効果として考えることが適当とし、抗体を持たない無脊椎動物のワクチンに関する開発・研究はほとんど行われなかったとしている。しかし、高橋ら (1995) の総説から10年以上が経過した現在、クルマエビ類をはじめ多くの甲殻類の生体防御機構に関する新たな研究が次々と報告されている。その一つに、WSSV 感染耐過エビ類は再感染に対し抵抗性を獲得すること (Venegas *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2002), またクルマエビにおいて実験的に誘導された WSSV に対する感染防御効果はジブリオ感染に対して無効であったこと、さらに WSSV 感染耐過クルマエビの血リンパ液には、WSSV を特異的に中和する活性が認められることが明らかになり (Wu, 2003), エビ類の感染防御機構にも一種の免疫様現象が存在する可能性が示唆された。さら

*4 虫明敬一, 清水 健, 森広一郎, 有元 操, 佐藤 純, 1999. 親エビ受精囊の PRDV の存在量と PAV 発生との関係. 平成11年度日本魚病学会春季大会講演要旨集, 40.

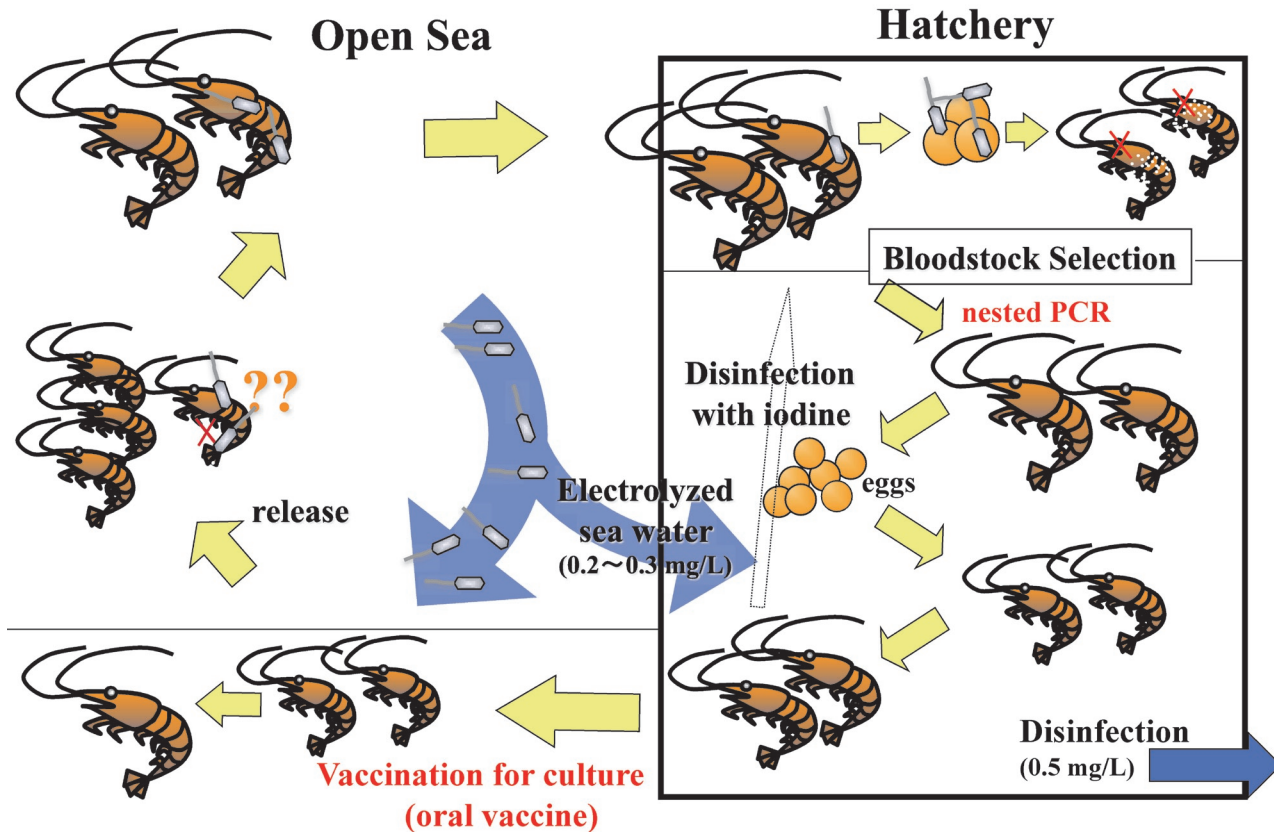


Fig. 8. Disease control in shrimp hatchery.

に、組換え大腸菌で発現した WSSV 構造タンパク質 (recombinant viral protein, rVP) をクルマエビ、ウシエビ, White leg shrimp *L. vannamei*, アメリカザリガニに筋肉接種あるいは経口投与することで、自然感染耐過エビと同様に WSSV に対する防御効果が誘導されることが確認されている (Namikoshi *et al.*, 2004; Witteveldt *et al.*, 2004a, b 2006; Vaseenharan *et al.*, 2006; Jha *et al.*, 2006, 2007)。ワクチン様効果とも言うべき現象の防除技術へ応用が期待されている。

本研究では、クルマエビにおける WSSV の防除対策を確立することを目的に、第 1 章において種苗生産過程における WSD の発生状況について報告した。第 2 章においては、クルマエビ受精卵のポビドンヨード剤による消毒の安全性と効果について調査を行った。第 3 章では、WSSV の攻撃量の把握と発現タンパク質の経口投与による WSSV 防御効果に関する試験を行った。第 4 章では、WSSV 発現タンパク質の経口投与によって誘導される WSSV に対する防御効果の発現時期、持続期間および追加投与効果に関する試験を行った。

第 1 章 種苗生産過程における WSD の発生状況

1. 目的

国内の種苗生産機関 (主として中間育成期) での WSD の発生は、クルマエビ以外では、これまでヨシエビでの発生事例 (Momoyama *et al.*, 1997) が報告されているに過ぎない。本章では、1996 年および 1997 年の志布志庁舎におけるクルマエビ種苗生産過程 (中間育成も含む) での WSSV の検出および WSD の発生状況について述べる。なお、クルマエビの幼生期の名称は、我が国では伝統的にノープリウス、ゾエア、ミススおよびポストラバという通称が使われているが、これらの通称は十脚甲殻類の国際的な名称とは必ずしも一致しない (倉田, 1986; 本尾, 1988)。国際的な名称に従えば、各ステージの呼称は、ノープリウス (1~6 令) = ノープリウス, ゾエア (7~9 令) = プロトゾエアあるいはゾエア, ミスス (10~13 令) = ミススあるいはゾエア, ポストラバ (13~14 令) = メガロパ, (15 令以降) = 稚エビとのように修正される。しかし、我が国の種苗生産現場では、いまだにこれらの通称が慣用されている現状から、本研究にお

いてはこれらの名称を用いることとした。その際、ポストラーバ期の記載方法は Hudinaga (1942) の報告した記載とは異なり、通例ポストラーバ期に達した段階からの日齢で表記する方法が使用されているため、それに準じた。

2. 材料および方法

(1) 親クルマエビの購入と採卵

1996年および1997年の志布志庁舎における種苗生産用天然親クルマエビ（以下 親エビ）の購入から採卵までの概要を Table 3に示した。1996年の種苗生産では5月24日から9月17日にかけて、九州および四国の各沿岸海域で漁獲された親エビを6,639尾購入した。また、1997年は、4月11日から8月7日にかけて、九州沿岸海域で漁獲された親エビ2,748尾を購入した。いずれも、購入地において目視による透視観察により卵巣が発達した親エビを選別した。

1996年の種苗生産では、砂濾過海水の入った水槽（容量 1.6 kL）に300～600尾の親エビを収容し、志布志庁舎まで輸送したが、1997年は、輸送中の親エビ間の接触の機会を少なくする目的で、紫外線殺菌処理（日本フォトサイエンス製 NPL-10, 22）海水を入れた発泡スチロール製容器（10 L）に、1～7尾ずつ収容し輸送した。輸送時間は、購入地と志布志庁舎の距離の関係で、1996年は3.5～10時間を1997年は3.5～6時間を要した。1996年の輸送中の水温は、20～25℃を保つ

たが、1997年は、輸送中の産卵を抑制するため15℃前後とした。

まず、1996年は、志布志庁舎に到着した後、購入したすべての親エビを角型コンクリート製産卵水槽（25 kL）に収容し、飼育水温24～29℃で種苗生産に必要な卵数に応じて1～3日間産卵させた。親エビ検査については、産卵後の一部の個体の胃上皮（約50 μg）を個体別に採取し、後述するPCRによるWSSV検査用試料とした。

翌1997年は、生検法（宮島・松本, 1996）による成熟個体の判別を行うため、ディスプレイザブル・シリンジ（容量 3 mL：注射針 18 G）で親エビ卵巣の一部を採取して検鏡し、卵巣卵の表面に表層胞が形成された個体（前成熟期および成熟期）を選別した。なお、採取した卵巣の一部（約100 μg）は、個体別にPCRによるWSSV検査に供した。選別された成熟個体は、ウイルス検査結果が判明するまで、エアレーションを施した小型水槽（10 L）に個別に収容し、白色ランプ（東芝ライフテック製 D400）3基を全水槽を照らすように配置し、光照射と飼育水温の冷却（15℃）により小型水槽内での産卵を抑制した。卵巣検査でWSSV陰性と判定された個体5～12尾を1グループとして産卵水槽（0.5 kL）に収容した。その際、産卵水槽には紫外線殺菌処理海水（30,000 μW・sec / cm² 照射）を給水し、水温を24～28℃として1～3日間産卵させた。

Table 3. Outline of wild broodstocks of kuruma prawn employed for seed production and countermeasures for WSD at Shibushi Station of JASFA in 1996 and 1997

Year	1996	1997
<i>Broodstocks</i>		
Captured area	Coastal waters of Kyushu and Shikoku	Coast of Kyushu
Captured date	May 24th ~ September 17th	Apr. 11 ~ Aug. 7
Mean body weight (range) (g)	91.6 (64.4-125.6)	70.6(61.0~93.0)*
<i>Transportation of spawners</i>		
Tank volume (l)	1600	10
Number of tank	1	20~108
No. of spawners per tank	300~600	1~7
time required (h)	3.5~10.0	3.5~6.0
<i>Selection of spawners</i>	Not done	Done*1
<i>Disinfection of eggs</i>	Not done	Done*2
<i>Rearing sea water</i>	Filtrated sea water	UV-treated sea water

*1 Selection of spawners was based on the detection of WSSV from ovary by 2 step PCR.

*2 Eggs were dipped into iodophor (5 mg/l) for 5 min.

水槽内に産出された卵の採集は、ネット（目合 100 μm ）でろ過する方式を採用した。採集した卵は、1996年は清浄な濾過海水を用いて卵洗浄を行った。1997年は紫外線処理海水で洗浄した後にヨード剤による消毒（有効濃度 5 mg / L, 5 分間）（Mushiake *et al.*, 1999）を行った。

(2) 種苗生産

採卵後、洗浄あるいは消毒した卵は、屋外コンクリート製飼育水槽（150～2,500 kL）に収容し、水温24～28℃でふ化させた。ふ化時のノープリウスの収容密度は、0.4～10.8 万尾 / kL であった。飼育餌料には、テトラセルミス *Tetraselmis tetrathele*、アルテミアノープリウス *Artemia salina* および市販の人工配合飼料を用いた。飼育水の換水はミシス期以降に開始し、換水率は種苗の成長に応じて増加させ、最終的には1日200%とした。なお、1996年の飼育用水には砂濾過海水を、また1997年には紫外線処理海水を用いた。飼育期間中の水温は加温により23℃を維持したが、夏期は25℃以上に上昇するため、自然水温とした。

種苗の検査は、1996年は卵（whole 50 μg を1検体とし、5検体：以下 whole 50 μg \times 5と記す）、ノープリウス（whole 50 μg \times 5）、ゾエア（whole 50 μg \times 5）、ミシス（whole 50 μg \times 5）、ポストラバ1日齢期（P1, ふ化後11日目；whole 5尾を1検体とし10検体：以下 whole 5尾 \times 10）、P5（P4）（ふ化後15日目、whole 5尾 \times 10）および配付直前の P20（P9）（ふ化後30日目、whole 1尾 \times 30）を検査した。なお、括弧内に、幼生の形態観察により Hudinaga (1942) の分類に基づく幼生の名称を併記した。1997年の種苗生産では、P5まで前年と同様に行い、以後 P30（P11）（ふ化後40日目）までは5日間隔で検査（whole 1尾 \times 30）し、最終的には中間育成場へ輸送する各ロットについて輸送2日前（P25～P30；P10～P11）にそれぞれ検査（1尾の頭胸部を1検体とし30検体：以下 頭胸部1尾 \times 30）を行った。なお、中間育成場に輸送する際、種苗の一部は中間育成が終了するまで事業場で引き続き飼育し、その間5日毎にPCRによるウイルス検査（頭胸部1尾 \times 30）を行った。

(3) 中間育成

飼育水槽で生産された種苗は、関係各機関に配付し、中間育成に供した。中間育成過程の飼育施設は、コンクリート水槽、キャンバス水槽、築堤式あるいは囲い網式で、飼育水温は何れも25.7～28.2℃であった。

(4) PCR による WSSV 遺伝子の検出

親エビおよび種苗からの鋳型 DNA の抽出は、水産庁が提示したマニュアル（1996）に準じて行った。抽出した核酸は、TE（10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM

EDTA）100 μL に溶解した。WSSV の検出は、親エビおよび飼育種苗から抽出した DNA（1 μL ）を鋳型とし、木村ら（1996）の方法を一部改変した2 step PCR（nested PCR）により行った。すなわち、PCR 反応液の全量を25 μL とし、DNA ポリメラーゼ Takara Ex Taq（タカラバイオ）を用い、PCR プライマーとして1st-step PCR では P1（5'-ATC ATG GCT GCT TCA CAG AC-3'）および P2（5'-GGC TGG AGA GGA CAA GAC AT-3'）を、2nd-step PCR では、P3（5'-TCT TCA TCA GAT GCT ACT GC-3'）および P4（5'-TAA CGC TAT CCA GTA TCA CG-3'）を用い、DNA サマールサイクラー（9600, パーキンエルマー）で標的遺伝子を増幅した。増幅反応の条件は、72℃・10分間および95℃・6分間の反応後、95℃・1分間、57℃・1分30秒間、72℃・1分間を1サイクルとし25あるいは30サイクルの後、72℃・5分間の反応を行った。増幅サイクル数は親エビ検査では30サイクルとし、種苗の検査では水産庁のマニュアル（1996）に準じて25サイクルとした。

3. 結果

(1) WSD の発生状況

1996年の種苗生産においては、計9回の飼育事例中4例（飼育事例 No. 6～9）で、中間育成配付前の種苗から WSSV が検出され、飼育を中止した（Table 4）。これらの飼育過程で、WSSV が最初に検出された種苗のステージは、卵から P10 の発育段階で、その時の飼育水温は 22.1～29.4℃であった。一方、種苗生産事例 No. 1～5 では、P20 まではいずれの発育段階でも WSSV 陰性で、WSD の発生も認められなかった。しかし、事例 No. 1～5 の種苗を中間育成場に輸送した後、一部のエビを志布志庁舎で継続飼育していたところ、事例 No. 3 および 5 の P51 および P29 の一部が PCR により WSSV 陽性と判定された。これと符合するように、事例 No. 3 および 5 の種苗を用いた中間育成8事例全てで WSD が発生した（Table 4）。中間育成場においては、種苗を輸送した1日後から18日後の発育ステージ（P27～P55）で WSD が発生し、大量死に至った。瀕死の個体には、体色の赤変、褪色および甲皮に白点が認められ、約10日間での累積死亡率は50～100%に達した。種苗生産事例 No. 5 の種苗を用いた中間育成場での死亡個体では、70%の個体が1 step PCR でも WSSV 陽性と判定された。

種苗生産に用いた親エビについて、産卵終了後、一部の個体の胃上皮を WSSV 検査に供した結果、7月下旬以降に購入した親エビから WSSV が検出された（Table 4）。これらの親エビを用いた種苗生産（No. 5

Table 4. Detection of WSSV from spawners and juveniles in seed production at Shibushi Station of JASFA and occurrence of WSD in nursery culture in 1996

Trial No.	Spawners		Detection of WSSV in seed production* ² (eggs to P20)	Occurrence of WSD	
	Captured date	PCR test* ¹		in seed production	in nursery culture
1	May 24, 25	-	-	-	- (0/4)* ³
2	Jun. 25	-	-	-	- (0/1)
3	Jul. 12	-	-* ⁴ (P51)* ⁴	-	+ (3/3)
4	Jul. 16, 17	-	-	-	- (0/3)
5	Jul. 24	+	-* ⁴ (P29)* ⁴	-	+ (5/5)
6	Sep. 3	+	+	+	(Abandoned) Not done
7	Sep. 4	+	+	+	(Abandoned) Not done
8	Sep. 12	+	+	+	(P10) (Abandoned) Not done
9	Sep. 17	-	+	+	(P5) (Abandoned) Not done

*1 Detection of WSSV from stomach cuticular epidermis of spawners after spawning by 2 step PCR.

*2 Detection of WSSV from larvae and postlarvae sampled during the seed production. The stage of prawn in parenthesis represents the developmental stage when WSSV was first detected by 2 step PCR.

*3 (Number of cases WSD recorded/conducted).

*4 PRDV was detected later from juveniles which were reared in the hatchery after their siblings were transferred to nursery grounds.

Table 5. Detection of WSSV from spawners and juveniles in seed production at Shibushi Station of JASFA and occurrence of WSD in nursery culture in 1997

Trial No.	Spawners		Detection of WSSV from postlarvae* ¹	Occurrence of WSD	
	Captured date	PCR test		in seed production	in nursery culture
1	Apr. 11	-	-	-	- (0/1)* ²
2	May 12, 13	-	-	-	- (0/1)
3	May 16	-	-	-	- (0/4)
4	May 17	-	-	-	- (0/1)
5	May 21-23	-	-	-	- (0/2)
6	Jun. 11, 12	-	-	-	- (0/3)
7	Jul. 17	-	-	-	- (0/3)
8	Jul. 19	-	-	-	- (0/1)
9	Jul. 22	-	-	-	- (0/1)

*1 Detection of WSSV from postlarvae just before transportation to nursery culture ground.

*2 (Number of cases WSD recorded/conducted).

～8) では、結果的にはいずれの種苗からも WSSV が検出され、親エビにおける WSSV の存在と種苗からの WSSV の検出結果とがよく一致した。ただし、種苗生産事例 No. 9 に用いた親エビの胃上皮からは WSSV は検出されなかったにもかかわらず、その後の種苗生産過程で、種苗 (P5) から WSSV が検出された。

一方、1997年には4月および5月に搬入した親エ

ビの卵巣から WSSV が検出されたものの、これらの PCR 陽性個体を排除した陰性個体のみから得た卵を種苗生産に用いた結果、9回の種苗生産事例および17回の間育成事例のいずれにおいても WSSV は検出されず、WSD の発生も認められなかった (Table 5)。なお、旧日裁協上浦事業場 (現水産総合研究センター増養殖研究所上浦庁舎、以下上浦庁舎と記す) で1997年7月と8月に搬入した PCR 陽性個体を含む親エビ

から採卵して得たノープリウスを飼育試験に供したところ、2回の事例とも種苗（P8, P22）から WSSV が検出され、その後 P35 および P55 において WSD が発生し、大量死が認められた。

(2) 採卵時期と種苗からの WSSV の検出

親エビの選別および卵の消毒を行わなかった1996年の志布志庁舎（Table 4）における親エビからの採卵時期と種苗からの WSSV 検出時期との関係を Table 6 にまとめた。5月および6月に搬入した親エビからの卵を用いて種苗生産を開始した事例では、種苗のいずれの発育ステージにおいても WSSV は検出されなかった。しかし、7月に購入した親エビから得た卵で種苗生産を行った事例では、6事例中2事例の種苗（P29 および P51）が WSSV 陽性となった。また、8月および9月に開始した場合には、すべての事例で WSSV 陽性となった。特に、9月開始の事例では P20 以前に WSSV 陽性となり、親エビからの採卵時期が遅くなるほど種苗からの WSSV の検出率が高くなるとともに、WSSV が検出される種苗の発育ステージが早まる傾向がみられた。

4. 考 察

WSSV の防除対策として、採卵に使用する親エビの選別とヨード剤による卵消毒を行わなかった1996年は、5～7月採卵分の種苗において、中間育成場に配付する前の P20 までは WSD による死亡はみられなかったものの、配付後の中間育成段階において、一部（No. 3, 5）の種苗で WSD が発生した。9月以降に得られた卵を用いた事例では、配付前の種苗から WSSV が検出されたため生産を中止した。また、採卵後に調べた親エビの胃上皮からは、7月下旬以降

になると WSSV が検出される傾向を示した。一方、1997年においては、天然親エビの調査結果（虫明ら、1998）から親エビの WSSV 陽性率が比較的低いと考えられる4月から種苗生産を開始し、親エビ選別と卵消毒による防除対策を講じた結果、種苗生産および中間育成のいずれの段階においても WSD は発生しなかった。また、上浦庁舎で行った飼育試験で、WSSV 陽性個体が混入した親エビから得られた種苗において WSSV が検出され、WSD が発生した（Mushiake *et al.*, 1999）。これらの結果から、クルマエビ種苗生産過程における WSSV の主たる感染経路は、親エビからの垂直伝播であると考えられた。

1996年の種苗生産事例において、産卵後の一部の親エビ胃上皮を検査した結果 WSSV 陰性と判定されたにもかかわらず、それらの親エビから得た種苗から WSSV が検出された事例が2事例（飼育事例 No. 3 と 9）あった。これは、親エビの検査部位と検査尾数に問題があったためと考えられる。この点について、その後の研究により雌親エビの場合には卵巣（虫明ら、1998）もしくは受精囊（交尾により雄から獲得した精子を貯蔵しておく小囊）（Mushiake *et al.*, 1999）から効率的に WSSV が検出されることが判明した。したがって、胃上皮のみの PCR 検査結果に基づく親エビの選別法は、WSSV キャリアーの排除には不十分であることが明らかになった。検査尾数に関しては、大型水槽を用いて種苗を量産する場合、まとまった量の卵を確保するために300～600尾の親エビを使用していることから、産卵に供した親エビの一部を検査するだけでは、親エビ全体の WSSV の保有状況を把握できるとは考え難い。以上のことから、種苗生産に用いるすべての親エビの卵巣および受精囊について、PCR

Table 6. Season of egg collection and first appearance of WSSV at each developmental stage of kuruma prawn in seed production at Shibushi and Tamano Stations of JASFA in 1996

Collection of eggs	Seed production			First appearance of WSSV		
	Number of trials		Detection rate (%)	before P20	P21 ~ P40	after P41
	Conducted	PCR positive*1				
May	1	0	0	0*2	0	0
June	2	0	0	0	0	0
July	6	2	33.3	0	1	1
August	2	2	100	0	2	0
September	4	4	100	3	1	0

*1 Number of trials where WSSV was detected by 2-step PCR in postlarvae during seed production process.

*2 Number of trials where WSSV was detected at each developmental stage.

Table 7. Detection of WSSV from juveniles of kuruma prawn in seed production at Shibushi station of JASFA and occurrence of WSD in nursery culture in 1996 and 1997

Year	Selection of spawners* ¹	Disinfection treatment of eggs by iodophor	Presence of WSSV in juveniles	Outbreak of WSD in nursery culture
1996	Not done	Not done	6/9* ²	8/16* ³
1997	Done	Done	0/9	0/17

*1 Selection based on the detection of WSSV from ovary by 2 step PCR.

*2 Number of cases in WSSV positive in juveniles of prawn/conducted.

*3 Number of cases in occurrence of WSD/conducted.

法による WSSV 検査を実施する必要があることが示された。

中間育成場での WSD の発生率は、7 月以降に採卵し飼育された種苗において高い傾向にあった。これは、虫明ら (1998) が明らかにしたように、天然親エビでは夏期に漁獲される親エビほど WSSV 陽性率が高いことに起因すると考えられる。したがって、表 6 の結果から推察しても、親エビの WSSV 陽性率が比較的低いと考えられる 4 月から 6 月の間に得た卵を種苗生産に利用することも、WSSV の防除には有効な方法であることが示された。以上の結果を基に防除対策を実施した 1997 年の種苗生産では、幼生からの WSSV の検出および中間育成場での WSD の発生は一切認められず (Table 7)、本法による親エビ選別が、WSSV 防除対策に極めて有効であることが確認された。

第 2 章 ポビドンヨード剤を用いた受精卵消毒の安全性と効果

1. 目的

種苗生産過程における本疾病の防除対策の一つとして、親エビからの垂直感染を防止するためにヨード剤による受精卵消毒が栽培漁業センターなどで広く実施されている (Mushiake *et al.*, 1999; 佐藤ら, 2003)。また、ウシエビにおいては、WSSV が卵巣卵内に存在すると卵の発育が阻害され、垂直伝播が起らないとされているが、卵およびふ化幼生については洗浄または消毒を実施することが有効な垂直伝播の防除になる (Lo *et al.*, 1997)。WSSV は、有効ヨウ素濃度 2.5 mg/L 海水で 10 分間 (中野ら, 1998)、2.5 mg/L 以上で 0.2 分以内、1.0 mg/L で 2 分以内 (桃山, 谷村, 2004) に不活化されるとの報告がある。受精卵の消毒による垂直感染防除効果を得るために、病原体の消毒剤に対する感受性の検討に加え、受精卵の消毒処理

に対する耐性を明らかにすることが必要である。さらに、種苗生産施設において卵消毒を行う場合には、ふ化率に大きな影響を及ぼさない範囲で消毒する必要がある。ポビドンヨード剤が海産魚介類の受精卵消毒剤としては未承認であるため、水産総合研究センターでは、その効能拡大を最終的な目的とし受精卵の消毒条件の把握に関する実験を実施している。本報告では、ポビドンヨードがクルマエビ受精卵に影響を及ぼす濃度と処理時間を卵発生段階毎に検討するとともに、受精卵の一般生菌数の変化からヨード剤の殺菌効果についても検討した。

2. 材料と方法

(1) 有効ヨウ素濃度と消毒時間が安全性と消毒効果に与える影響

ポビドンヨード剤として水産用イソジン液 (明治製菓) を用い、上浦庁舎および旧日裁協五島栽培漁業センター (現西海区水産研究所五島庁舎、以下五島庁舎と記す) の濾過海水で所定濃度に希釈して消毒液 (以下、ヨード液) を作製した。

有効ヨウ素濃度と消毒時間が受精卵のふ化に与える影響と消毒効果を把握するための指標として用いられている生菌数の減少効果 (笠井ら, 2001) について試験を行った。なお、種苗生産における卵消毒実施時期を考慮して、水温 22°C で受精後 6 ~ 9 時間経過し、胚に環状帯が形成された以降のステージの受精卵を用いた。

1) 採卵親エビ

採卵には捕獲直後の天然クルマエビ (以下、親エビ) を用い、異なる 3 個体の親エビから得られた受精卵を供試した。それぞれの親エビの全長、体重および産出卵の受精率は、個体 A : 24.9 cm, 104.0 g で 95.7%、個体 B : 21.2 cm, 113.4 g では 98.2%、個体 C : 24.5 cm, 107.2 g では 97.5% であった。親エビは、個体毎

に500 L ポリエチレン水槽に収容し、微通気、無注水で産卵させた。水温は、加温装置を用い22℃に維持した。産卵の確認された水槽から卵を集め、75 Lのプラスチック容器（三甲）に0.02 g/L (2,000個/L) となるように収容した。

2) ヨード剤の濃度と消毒時間

ヨード液は、有効ヨウ素濃度2.5, 5.0および10.0 mg/Lの3濃度とし、それぞれの濃度で5, 10, 15および20分間消毒した。消毒は、目的のステージに達した各受精卵0.6 gを所定濃度に希釈したヨード液1.8 Lに浸漬して行った。所定時間に達した段階で、直径6 cm、深さ2 cm、目合い200 μmのネット（ニッタル7xx-200）で取りあげた。生菌数の測定に供試するため0.1 gの受精卵を取り、1 mLの2%ペプトン水でヨードの反応を止めた。また、受精卵2 mgをろ過海水の流水中（600 mL/min）に置いたネットに収容して3分間洗浄し、新しいシャーレ（直径9 cm、深さ1.5 cm、水量13 mL）に移して22℃の室内でふ化させた。対照区は、ろ過海水に所定時間浸漬した（Fig. 9）。

3) ふ化幼生の観察

ふ化を確認後、ノープリウス2期（藤永 1935）に

到達した段階でルゴール液により固定し、未ふ化生残卵（発生は正常に進んでいるがふ化していない受精卵）、死卵、正常ノープリウス、死亡ノープリウスおよび異常ノープリウスを実体顕微鏡下で計数し、ふ化率（正常ノープリウス数/総数×100）を算出した。

4) 生菌数の測定

生菌数は、滅菌ペプトン水で洗浄した受精卵に9倍量の滅菌人工海水を加えて磨砕し、10倍希釈液列を作製し、海水平板培地（ポリペプトン5 g、肉エキス1 g、プロテオースペプトン1 g、寒天15 g、酵母エキス1 g、Herbst's 人工海水750 mL、蒸留水250 mL、pH 7.8）に塗抹後、25℃で5日間培養し、コロニー数を測定した。

(2) 受精卵の発育段階と消毒の安全性

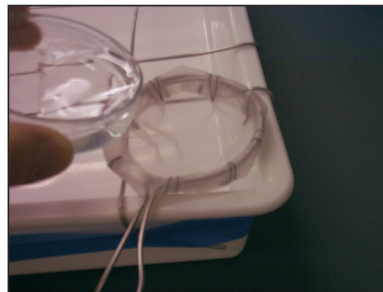
卵発育段階ごとの受精卵のヨード剤に対する感受性試験を、前記試験と同様に捕獲直後の親エビから自然産卵によって得た受精卵を用いて実施した。

1) 採卵親エビ

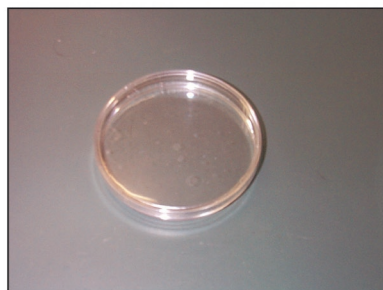
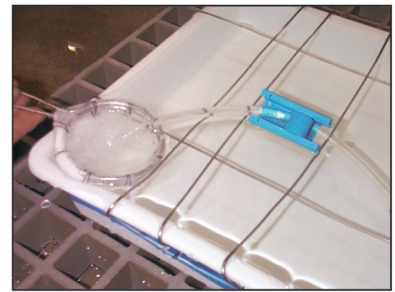
供試した3個体の親エビの全長、体重および産出卵の受精率は、個体D：22.2 cm、90.0 gが92.3%、個体E：20.2 cm、88.0 gが92.0%および個体F：20.8 cm、77.0 gでは90.8%であった。



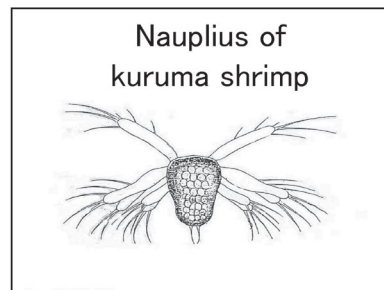
Disinfection



Rinse with fresh sea water (600mL/min.)



Incubation for hatching



Nauplius of kuruma shrimp
Observation of hatching

$$\text{Normal hatching rate(\%)} = \frac{\text{number of normal nauplius}}{\text{number of tested eggs}} \times 100$$

Fig. 9. Procedure of povidone-iodine treatment in experiment of disinfection eggs of kuruma shrimp.

2) 採卵の各ステージでの消毒試験

産卵方法は、前述と同様に行った。産卵が確認された水槽から直ちに卵を採取し、卵管理水槽として用いた75 Lのプラスチック容器に0.03 g/Lとなるよう収容し、死卵などの異常卵の取り除きは行わなかった。消毒試験には、卵管理水槽から90%以上が所定のステージに達したことを確認した受精卵の2 mgを直径6 cm、深さ2 cm、目合い200 μ mのネット（ニッタル7xx-200）に取り、有効ヨウ素濃度5 mg/Lのヨード液6 mLの入ったシャーレ（直径9 cm、深さ1.5 cm）に収容し、5分間の処理を行った。対照区として、ろ過海水を用いて同じ処理を行う区および未処理区を設けた。5分後、受精卵を流水のろ過海水中（600 mL/分）に置いたネットに収容して3分間洗浄し、新しいシャーレ（前出）に移して22°Cの室内でふ化させた。受精卵の発育段階は、2細胞期、128細胞期、胚に環状帯出現期、第1触角の始痕の形成期、附属肢の分叉肢の形成期、外肢および内肢の形成期、卵内ノープリウス初期および卵内ノープリウス後期の8期とした（藤永

1935）。なお、試験水温は、加温装置を用いて21.8～22.4°Cに保った。

3. 結果および考察

(1) 有効ヨウ素濃度と消毒時間が卵消毒と受精卵の発育に及ぼす影響

有効ヨウ素濃度2.5 mg/Lで5～20分間消毒した場合および5.0 mg/Lで5、10および15分間消毒した場合のふ化率は、対照区との間に有意差は認められなかった（ $p < 0.05$; Fisher's PLSDによる多重比較検定, Fig. 10）。種苗生産を成功させるためには経験的に50%以上のふ化率の受精卵を供試することが望まれることから、いずれの濃度においても5分間以内に消毒を終える必要があると考えられた。有効ヨウ素濃度5.0 mg/Lで20分および10.0 mg/Lで5～20分間消毒した場合は、ふ化率が対照区と比較して有意（ $p < 0.01$ または $p < 0.05$ ）に低下した（Fig. 10）。このときすべての実験区の生菌数は約1桁減少し、対照に比較して有意に減少した（ $p < 0.01$; Fisher's PLSDによる多

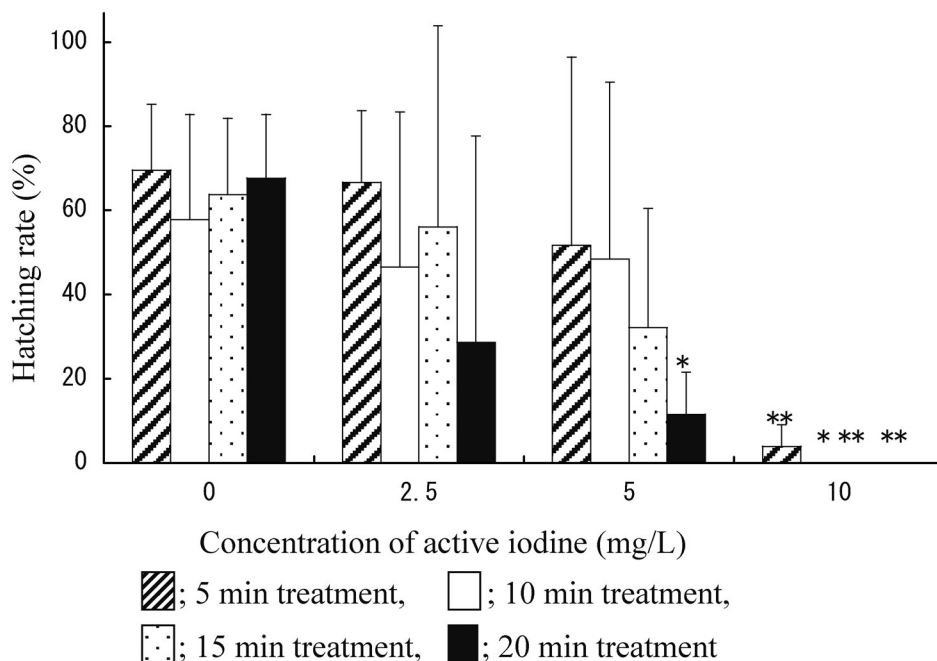


Fig. 10. Sensitiveness of kuruma prawn eggs (1st antenna is formed above the 2nd appendage stage) on treatment of povidon-iodine. Experiments in triplicate were conducted for 5, 10, 15 and 20 min. Values are means and standard deviations. Significant differences from the control values are indicated by * ($p < 0.05$) or ** ($p < 0.01$).

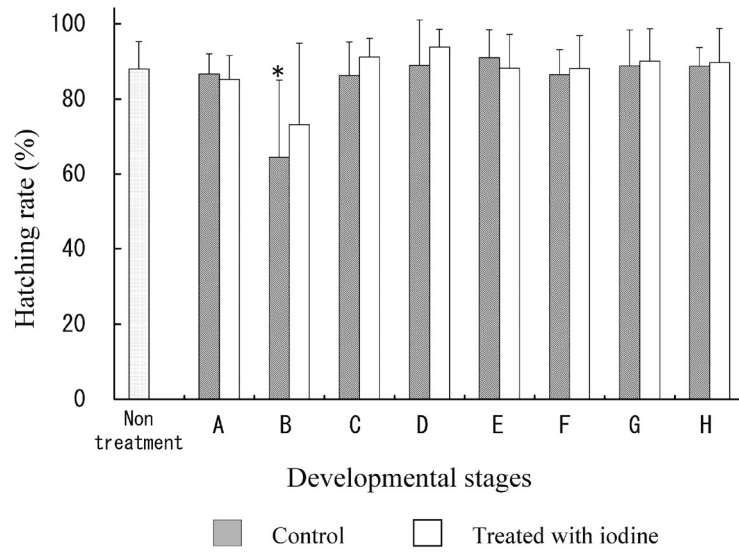


Fig. 11. Viable bacterial counts of iodine treated eggs (means and standard deviations). Significant differences from the control values are indicated by**($p < 0.01$).

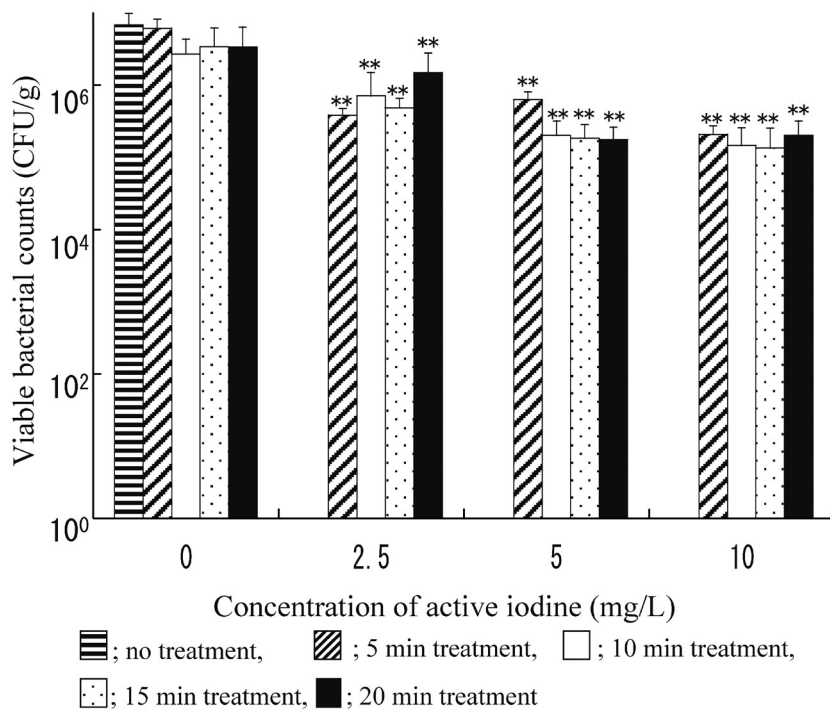


Fig. 12. Influence of povidon-iodine treatment on hatching rate at different developmental stages in kuruma prawn. Eggs were treated with 5 mg/L active iodine for 5 min. Eggs in the control of each developmental stage were incubated in sea water for 5 min. Experiments were done three times and each bar represents the mean value and standard deviations. Developmental stages are categorized as : A ; 2 or 4 cell stage, B ; 128 cell stage, C ; embryo with a ring-shaped middle part, D ; embryo with 1st antenna formed above 2nd appendage, E ; embryo with biramous 2nd and 3rd appendages, F ; embryo with appendages with exopodite and endopodite, G ; egg containing nauplius at an early developmental stage, H ; egg containing nauplius at a later developmental stage. Significant difference from the non-treatment group is indicated by*($p < 0.05$). Non-treatment group represent eggs maintained in the original tank throughout the experiment period.

重比較検定) (Fig. 11)。

次いで2.5 mg/Lのヨード液を作製し、作製直後と20分経過後に有効ヨウ素濃度を測定した。また、受精卵を今回の試験条件である0.33 g/L濃度となるように2.5 mg/Lのヨード液に収容し、20分間消毒処理を行った後、ヨウ素濃度を測定した(日本工業規格(JIS k 0102工場排水試験方法33.3 残留塩素)(日本規格協会編2005)を改変)。その結果、作製直後のヨード液のヨウ素濃度に対し、受精卵を入れない場合の減衰率は $11.5\% \pm 1.65$ 、受精卵を入れた場合の減衰率は $19.7\% \pm 2.69$ となった。Student's *t*検定の結果、有意差は認められなかったことから($p > 0.05$)、今回の試験条件では受精卵の有無によるヨウ素濃度の減衰はなかったものと考えられた。

(2) 受精卵の発育段階と消毒の安全性

128細胞期以外のふ化率は、すべて80%以上の値を示したが、128細胞期におけるふ化率は、対照区およびヨード区でそれぞれ $63.5\% \pm 21.4$ および $71.6\% \pm 23.3$ となった。128細胞期の対照区のふ化率は、未処理区と比較し、有意($p < 0.05$, Dunnett法による多重比較検定)に低下した。ヨード区のふ化率は未処理区と比較し有意差は認められなかった(Fig. 12)。これらのことから、この8ステージに対しヨード剤による影響はないと考えられた。しかしながら、128細胞期におけるハンドリングの影響は、他の7ステージより大きいことが明らかになった。128細胞期は、水温22°Cで産卵2時間後に到達するが、一般的な種苗生産現場では夜間産卵するクルマエビの採卵は朝行われるため、消毒時にはすでにこの時期は経過して、実際には問題ないと考えられる。しかし、ハンドリングの影響を受け易いこの時期での消毒の実施は避けるべきであると考えられた。

ヨード剤は有効ヨウ素濃度5 mg/Lで10分まではクルマエビ受精卵に毒性がないとする報告(桃山, 1990)の他、有効ヨウ素濃度5 mg/Lで5分間の卵消毒で安全性を確認した報告(Mushiake *et al.*, 1999)などがあり、これらと本実験結果は大きく変わらないことが確認された。受精卵に対する安全性が確認された有効ヨウ素濃度2.5および5.0 mg/Lで5分間の消毒処理により、本報における生菌数の減少率は、90%以上であり、殺菌効果が認められた。一方、WSSVは、有効ヨウ素濃度2.5 mg/Lで10分間(中野ら, 1998)や2.5 mg/L以上で0.2分以内、1.0 mg/Lでは2分以内(桃山, 谷村, 2004)で不活化されると報告されており、今回のヨード剤による安全な卵消毒条件はウイルスの不活化も期待できると考えられる。

これらの結果からヨウ素の減衰が起らないことが

確認された卵密度(0.33 g/L)で、かつウイルスの不活化が確認されている有効ヨウ素濃度2.5~5.0 mg/Lの海水に、クルマエビ受精卵を5分間浸漬することは、安全かつ効果の期待できる卵消毒方法であると考えられる。

第3章 WSSVのrVP26およびrVP28を経口投与したクルマエビのWSSV攻撃に対する感染防御効果

1. 目的

クルマエビの種苗生産過程におけるWSSV防除対策として、PCRによるWSSVフリー産卵親魚の選別、ポピドンヨードによる受精卵消毒、ならびにWSSVフリー飼育水での育生が有効であり(Mushiake *et al.*, 1999; Satoh *et al.*, 2001; 佐藤ら, 2003)、これらの対策によりWSSVフリーのクルマエビ種苗の産生が可能になった。しかしながら、中間育成および養殖過程では、飼育環境中に生息する他の甲殻類からもWSSVが検出されること(Maeda *et al.*, 1998, Momoyama *et al.*, 2003)、またWSSVの重要な感染経路とされる共食いや水系感染による水平感染(Wu *et al.*, 2001)の防止対策が確立されていないことから、WSDはクルマエビ養殖産業において未だ深刻な問題である。

Venegas *et al.* (2000)は、WSD生残クルマエビがWSSVの再感染に対し抵抗性を示すこと、また本現象が実験的にも再現されることから、無脊椎動物であるエビ類に“quasi-immune response”(免疫様現象)が存在することを報告した。また、感染耐過クルマエビに認められたWSSVに対する抵抗性は、感染後3週間から認められ始め、約2か月間持続すること(Wu *et al.*, 2002)、本抵抗性にはある程度の特異性が認められることが報告された(Venegas *et al.* 2000)。さらに、ホルマリン不活化WSSVおよび大腸菌で発現したWSSVの主要構造タンパク質であるrVP26およびrVP28を筋肉内接種することで、同様の抵抗性が誘導されることも明らかにされた(Namikoshi *et al.*, 2003)。現在までに、クルマエビ科のwhite leg shrimpおよびウシエビにも同様の“quasi-immune response”が存在ことが明らかにされ、WSSVに対するワクチン効果の検討が成されている(Witteveldt *et al.*, 2004a, Witteveldt *et al.*, 2004b, Witteveldt *et al.*, 2006, Vaseeharan *et al.*, 2006)。先にも述べた如く、養殖エビにおけるWSSVの感染経路としては、共食いによる水平感染が重要であることが既に示されていることから(Wu *et al.*, 2001)、経口ワクチンの可能

性が強く示唆される。そこで本研究では、まず大腸菌発現 WSSV rVP26および rVP28を用いた経口ワクチンを作成し、その効果について筋肉内注射法、浸漬法および経口法による感染実験を行い、比較検討した。

2. 材料と方法

(1) 供試クルマエビと WSSV 源の調製

供試したクルマエビは、上浦庁舎で WSSV フリーとして種苗生産されたものを、また WSD の罹病歴のない宮崎県の養殖場の種苗生産施設で生産された平均体重4.0~7.0gの個体を用い、事前に nested PCR (木村ら, 1996; 野中ら, 1998) にて WSSV 陰性であることを確認した。クルマエビは、二重底に施した砂敷きの水槽に収容し、電気分解による殺菌海水をかけ流して飼育し (24±1.8°C)、市販の配合飼料を1日当たり平均体重の3%量で給餌した。

攻撃用に用いた WSSV 磨砕液の作製は、野中ら (1998) に準じて行った。すなわち、WSD による瀕死個体の筋肉細胞を4倍量の PBS (リン酸緩衝液; Invitrogen) を加えて磨砕し、4°C、3,000×g 10分間の遠心分離後の上清を回収したものを WSSV 源とし、使用まで-85°Cで保管した。

(2) クルマエビに対する WSSV の病原性試験

供試エビは150L水槽に47-63尾/m² (底面積) の密度で収容し、筋肉注射、浸漬および経口による WSSV の攻撃試験を行った。WSSV の接種後、供試エビを14日間飼育し、累積死亡数を観察した。半数致死量 (LD₅₀) は、Behrenes-Kärber 法により産出した。

筋肉注射攻撃に用いる WSSV 源は PBS で10³倍から 10⁷倍まで段階希釈した。筋肉注射による接種に供試するエビ (MBW 6.8 g, n = 15) は、15°Cに冷却した海水に1分間に浸漬し麻酔状態にした後、所定の濃度に PBS で希釈した WSSV を100 μL/shrimp で筋肉注射した (陰性対照: PBS)。浸漬接種試験では、供試エビ (平均体重 4.4 g, n=20) は、WSSV を海水で10³、10⁴ および 10⁵倍となるよう希釈した3Lのウイルス液に1時間浸漬した。陰性対照は、健康エビの磨砕液を10³に希釈した海水に同様に浸漬した。浸漬攻撃が終了後、供試エビはネットに取り出し、清浄な海水により3分間の流水洗浄を行い、飼育水槽に再度収容した。経口接種試験では、供試エビ (平均体重 3.1 g, n=15) に対して、WSD 死亡個体の筋肉を0.25 g, 0.4 g, 0.65 g および 1.02 g/shrimp で投与した。供試エビの平均体重の15%を上限として、1日当たりの投与量を決定し (≦0.47 g/shrimp)、0.65 g および 1.02 g 投与グループは2または3日間に分けて投与を行った。対照として、健康なクルマエビの筋肉を1.02

g 同様の方法で投与するグループを設けた。経口接種試験に用いた WSD 死亡個体の筋肉は、注射および浸漬接種に用いた WSSV 磨砕液の作成源と同じものを用いた。

(3) VP26および VP28遺伝子のクローニングと発現 1) ウイルス DNA 試料の調製

野中ら (1998) の RNase-PEG 沈法により、WSSV に感染したクルマエビ組織から WSSV の DNA 抽出液を調製した。すなわち、WSD 病エビ組織約0.2 g を300 μL のプロテイナーゼ K (0.1 mg/mL) と SDS (10 mg/mL) の混合液とともに磨砕した後、37°Cで15分間静置した。これに等量の TE 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)- 飽和フェノールを加え約1分間激しく攪拌した後、遠心分離 (12,000×g, 5分間) を行って水層を回収した。再度フェノール抽出を行った後、等量のクロロホルム・イソアミルアルコール (24:1) 混液を加えて約1分間激しく攪拌した。次いで、遠心分離 (12,000×g, 1min) を行って水層を回収し、1/10量の5M 酢酸アンモニア溶液および2.5倍量の100%エタノールを加えて混合した後、遠心分離 (12,000×g, 15分間) により沈殿を得た。得られた沈殿物を200 μl の RNase A 溶液 (20 μg/μL, TE 溶液) に溶解し、37°Cで20分間処理した。その後、半量の20%ポリエチレングリコール (PEG-6,000) -2.5M NaCl 溶液を加えて攪拌し、遠心分離 (12,000×g, 5 min) を行い、上澄み液を完全に除去した。さらに、1.5mL の70%エタノールを加えて数秒間攪拌した後、遠心分離 (12,000×g, 2 min) を行い、上澄み液を完全に除去し、1.5mL の100%エタノールを加えた。これを、遠心分離 (12,000×g, 2 min) して上澄みを除去し、得られた沈殿を室温で約10分間乾燥させ、20 μL の TE に懸濁して DNA 抽出液とした。なお、遠心分離は全て室温で行った。

2) 外被タンパク質遺伝子クローニング用 PCR プライマー

GenBank に登録されている WSSV VP26および VP28タンパク質遺伝子の塩基配列 (GenBank 登録番号: AF173992および AF173993) に基づき、VP26F (5'-GTA AAG GAA GAA CTT CCA TC-3'), VP26R (5'-TAT ATT TGT ACA ATT CCC ACT TTA-3') および VP28F (5'-CAA GCA ACG TTC GAT AAA GA-3'), VP28R (5'-GAA GGT TAA GTA GGT CAA TAA-3') を作製した。

上記プライマーセット VP26F-VP26R は、WSSV VP26遺伝子のオープンリーディングフレーム (ORF, nt 35-649) を含む670塩基を増幅標的とし、VF28F-VP28R は VP28遺伝子の ORF (nt 33-647) を

含む754塩基を標的とするものである。なお、増幅反応の反応条件は、72℃ -10分間および95℃ -9分間の反応後、95℃ -1分間、55℃ -1分間、72℃ -1分間を1サイクルとし計30サイクル行った後、72℃ -5分間とした。

3) VP26およびVP28遺伝子のクローニング

VP26F-VP26R および VP28F-VP28R を用い、WSSV DNA 試料から VP26 および VP28 遺伝子の増幅産物を、付属のプロトコールに従いプラスミドベクター pCR-Script SK (+) (Stratagene) の *Srf*I 部位へ挿入した後、大腸菌 DH5 α コンピテント細胞を形質転換した。得られた形質転換菌はアンピシリンを含む LB 寒天培地上で培養し、同培地上で青色コロニーを選択することで DNA 断片を有する組換え菌を選択した。

クローニングした遺伝子の塩基配列は、ダイナミネーターサイクルシーケンシングキット (Dye primer thermal cycle sequence kit) (ABI 社) および T3/T7ダイプライマー (T3/T7 dye primer) (ABI

社) を用い、定法に従い行い、自動シーケンサー (373A DNA シークエンサー, ABI社) により解析した。解析結果より、VP26 および VP28 遺伝子がクローニングされていることが確認された (Fig. 13, 14)。

4) rVP26およびrVP28発現系の構築

VP26 遺伝子の発現用プライマーとして VP26F の5' 端側に *Nde* I および *Eco* RI の認識配列を含む11塩基のリンカー配列 (5' -aaagaattcat-3') を付加した計31塩基長の VP26expF プライマー (5' -aaagaattcat-ATG GAA TTT GGC AAC CTA AC-3') および VP26R の5' 端側に *Sal* I の認識配列を含む9塩基のリンカー配列 (5' -gctgtcgac-3') を付加した計31塩基長の VP26expR プライマー (5' -gctgtcgac-TTA CTT CTT CTT GAT TTC GTC C-3') を作製した。また、VP28 遺伝子発現用プライマーとして、VP28F の5' 端側に *Nde* I および *Eco* RI の認識配列を含む11塩基のリンカー配列 (5' -aaagaattcat-3') を付加した計34塩基長の VP28expF プライマー (5' - aaagaattcat-ATG GAT CTT TCT TTC ACT CTT TC - 3') および

Nucleotide sequence of structural protein (VP26) gene of WSDV

GGATCCAACCAACACGTAAAGGAAGAACTTCCATCTAAAACAAAGAAAAATGGAATTTGGCA
 ACCTAACAAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTTGTCCATTGCAATCATTGCTCTAATCGTT
 ATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTGTTGGAAGAAGCGTCGTCGCTAATTATGATCA
 GATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATTCGTGGAGAGAGGTCCTA
 CAATACTCCTCTTGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCCGATAAGGACATGAAGGATGT
 TTCTGCTGATCTTGTTCATCTTACCGTCACAGCCCCAAGGACTGATCCCGCTGGCACTGGGGCC
 GAGA ACTCTAACATGACTTTGAAGATCCTCAACAACACTGGCGTCGATCTCTTGATCAACGAC
 ATTACTGTTCCGGCCA ACTGTTATTGCAGGAAACATTAAGGGAAATACTATGTCGAACACTTACT
 TCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCTTCAAAAATTACCTCATTGACGTGTGCAGCAAATT
 TGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCTACAATGAACATTGGATTACCTCCAAGAATGTGATCGA
 TATCAAGGACGAAATCAAGAAGAAGTAAAGTGGGAATTGTACAAATATAAAGGTTTTGTTGA
 ATAAAAA

ATG : initial codon

TAA : stop codon

Amino acid sequence of structural protein (VP26) of WSDV

MEFGNLTNLDVAIIAILSIAILIVIMVIMIVFNTRVGRSVVANYDQMMRVPIQRRAKVMSIRGERS
 YNTPLGKIVAMKNGLSKDKMDKDV SADLVISTVTAPRTDPAGTGAENSNMTLKILNNTGVDLLIND
 ITVRPTVIAGNIKNTMSNTYFSSKDIKSSSSKITLIDVCSKFEDGA AFEATMNI GFTSKNVIDIKDEI
 KKK

Fig. 13. Nucleotide sequence and amino acid sequence of structural protein (VP26) of WSDV. Primer sequences underlined (—), Green coloring indicate the nucleotide sequence of VP26 coded gene.

Nucleotide sequence of structural protein (VP28) gene of WSDV

TCTTAATAACCAAGCAACGTTGATAAAGAAAAAAACTCGTCATGGATCTTTCTTTCACTCTTT
 CGGTTCGTGTCGGCCATCCTCGCCATCACTGCTGTGATTGCTGTATTTATTGTGATTTTTAGGTATC
 ACAACACTGTGACCAAGACCATCGAAACCCACACAGACAATATCGAGACAAACATGGATGAA
 AACCTCCGCAATTCCTGTGACTGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAGATGACTGATGTGTCCT
 TTGACAGCGACACCTTGGGCAAATCAAGATCCGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAG
 GAAGAAGATGCGGATCTTGTTCATCACTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTGGG
 GCAGAATCTCACCTTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATCAACAT
 CACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCCTTTGTTCGGTAGCTCCAACAC
 CTCCTCCTTACCCCCGTCTCTATTGATGAGGATGAAGTTGGCACCTTTGTGTGTGGTACCACC
 TTTGGCGCACCAATTGCAGCTACCGCCGGTGGAAATCTTTTCGACATGTACGTGCACGTCACCT
 ACTCTGGCACTGAGACCGAGTAAATAAATCGTGCTTTTTTATATAGATAGGGAATTTTAATATTA
 CAACAATAAGAAAATAAAACAATTGAGGAAATTTATACCATATTTTATTGACCTACTTAACCTTC
 TTGCTATACAATGAAT

TCA : initial codon

TAA : stop codon

Amino acid sequence of structural protein (VP28) of WSDV

MDLSFTLSVVSAILAITAVIAVFVIFRYHNTVTKTIETHDNIETNMDENLRIPVTAEVGSGYFKMT
 DVSFSDTLGKIKIRNGKSDAQMKEDADLVITPVEGRALEVTVGQNLTFEGTFKVWNNTSRKINI
 TGMQMPKINPSKAFVGSNTSSFTPVSIDEDEVGTFVCGTTFGAPIAATAGGNLFDMYVHVITYS
 GTETE

Fig. 14. Nucleotide sequence and amino acid sequence of structural protein (VP28) of WSDV. Primer sequences underlined (—), Green coloring indicate the nucleotide sequence of VP28 coded gene.

VP28R の5' 端側に Sal I の認識配列を含む9塩基のリンカー配列 (5'-gctgtcgac-3') を付加した計27塩基長の VP28expR プライマー (5'-gctgtcgac-TTACTCGGTCTCAGTGCC-3') を作製した。

VP26expF-VP26expR および VP28expF-VP28expR を用い、WSSV VP26 および VP28 遺伝子を PCR 増幅 (72°C -10 min, 95°C -9 min, 30 cycles of 95°C -1 min, 55°C -1 分間, 72°C -1 min, and 72°C -5 min) した後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により増幅産物を濃縮した。増幅産物は1% 低融点アガロースゲル電気泳動に供した後、GeneClean kit を用いて目的の DNA 断片を回収し、Nde I および Sal I で処理した後、発現ベクター pET-25b (+) (Novagen) の Nde I-Sal I 部位にライゲーションキット (タカラバイオ社) を用いて組み込み、大腸菌 BL21 のコンピテント細胞の形質転換に用いた。得られた rVP26 および rVP28 遺伝子を発現する大腸菌株を各々 pET VP26 および pET VP28 株と呼ぶ。

5) rVP26 および rVP28 発現系を用いた rVP26 および rVP28 の発現

大腸菌 pET VP26 および pET VP28 を LB-amp 液体培地 (1% bact-trypton, 0.5% bact-yeast extract, 1% NaCl, pH7.4, 50 μg/mL ampicillin) を用い、菌体濁度 (OD₆₆₀) が0.5程度になるまで (約6時間), 37°C で振とう培養した。培養液に終濃度が1mM となるよう IPTG (isopropyl - β - D (-) - thiogalactopyranoside) を添加し、さらに37°C で3時間培養することで標的遺伝子を発現させた。培養液を4°C で一晚静置し、遠心分離 (930 × g, 20min, 4°C) した後細胞を TE 緩衝液に懸濁し、Triton X-100 およびリゾチームを終濃度が0.1% および100 μg/mL となるよう添加し、30°C で15分間処理した。菌体懸濁液を超音波破碎処理した後、遠心分離 (12,000 × g, 15 min, 4°C) に供し、遠心分離後の沈殿物を rVP26 および rVP28 の発現タンパク質ワクチンとして15mL の PBS に懸濁した。

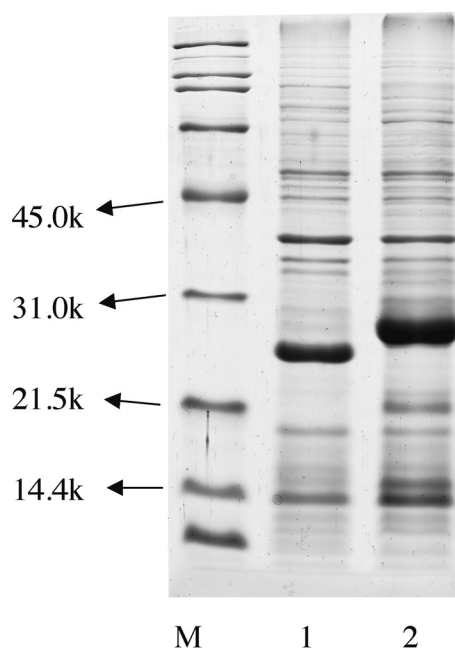


Fig. 15. SDS-PAGE analysis of expressed proteins, rVP26 and rVP28 of WSSV. The proteins in the 12% gel were stained with Coomassie brilliant blue. lanes M : molecular marker, lanes 1 : rVP26, lanes 2 : rVP28.

rVP26およびrVP28懸濁液は、SDS-PAGE電気泳動(Laemmli, 1970)に供した後、クマーシーブリアントブルー(CBB)で染色を施した。その結果、rVP26およびrVP28の分子量は、各々25.5 kDaおよび27.8 kDaで、WSSV VP26およびVP28の分子量と一致した。さらに、rVP26およびrVP28のSDS-PAGE電気泳動像を画像解析ソフト(Image J: NIH: National Institutes of Health, 米国国立衛生研究所)により解析した結果、rVP26とrVP28の純度は、各々20.3%および30.8%であった(Fig. 15)。

6) rVP26およびrVP28の経口投与とWSSVによる攻撃試験

rVP26あるいはrVP28を配合飼料の5%量PBSに懸濁し、市販配合飼料に添加し(Maruha Co., Ltd), 混合攪拌後、配合飼料の0.5%量の展着剤(SD Tenchaku 1 Gou, Schering - Plough Animal Health k.k.)を添加し乾燥させ、クルマエビの経口ワクチンとして使用した。rVP26およびrVP28懸濁液の配合飼料添加量は、5%(W/W)とした。

供試クルマエビ(平均体重6.8g)を4試験区に分け(n=150), rVP26あるいはrVP28添加飼料を35 μ g/g shrimp/日(rVP濃度: 10 μ g/g shrimp/日)ずつ、またE. coli タンパク質添加飼料を25 μ g/g shrimp/

日、およびPBS配合飼料を各々15日間投与した。経口ワクチン投与25日後、各供試エビをさらに4区(n=12~15)に分け、筋肉注射摂取、浸漬摂取および経口摂取によるWSSVの攻撃試験に供した(rVP26およびrVP28投与区はduplicate)。筋肉注射では、第1と第2腹節の間から、PBSで 10^{-4} に希釈したWSSVを100 μ L/shrimpずつ接種した。浸漬攻撃では、WSSVを 10^{-4} に希釈した海水に1時間浸漬し、経口攻撃ではWSD死亡個体の筋肉を0.6 g/shrimp/3日間で投与した。これらのWSSV攻撃量は、Table 8, Fig. 16に示した半数致死量から、ワクチン非投与区の累積死亡率が70%となる量である。

感染実験中、死亡個体は1日に2度回収し、これらがWSSVの感染による死亡であることを確認すると、後にPCRに供するまで -30°C で保管した。

7) 有意差検定および相対生残率

各試験区の累積死亡率は、 χ^2 検定による有意差検定を行った(5%水準)。期待度数が5以下となる場合は、Fisherの直接確率計算法で検定を行った。

相対生残率(relative percent survival RPS)は、計算式 1- ワクチン投与区の累積死亡率 / 非投与対照区の累積死亡率 \times 100 (Amend, 1981)により算出した。

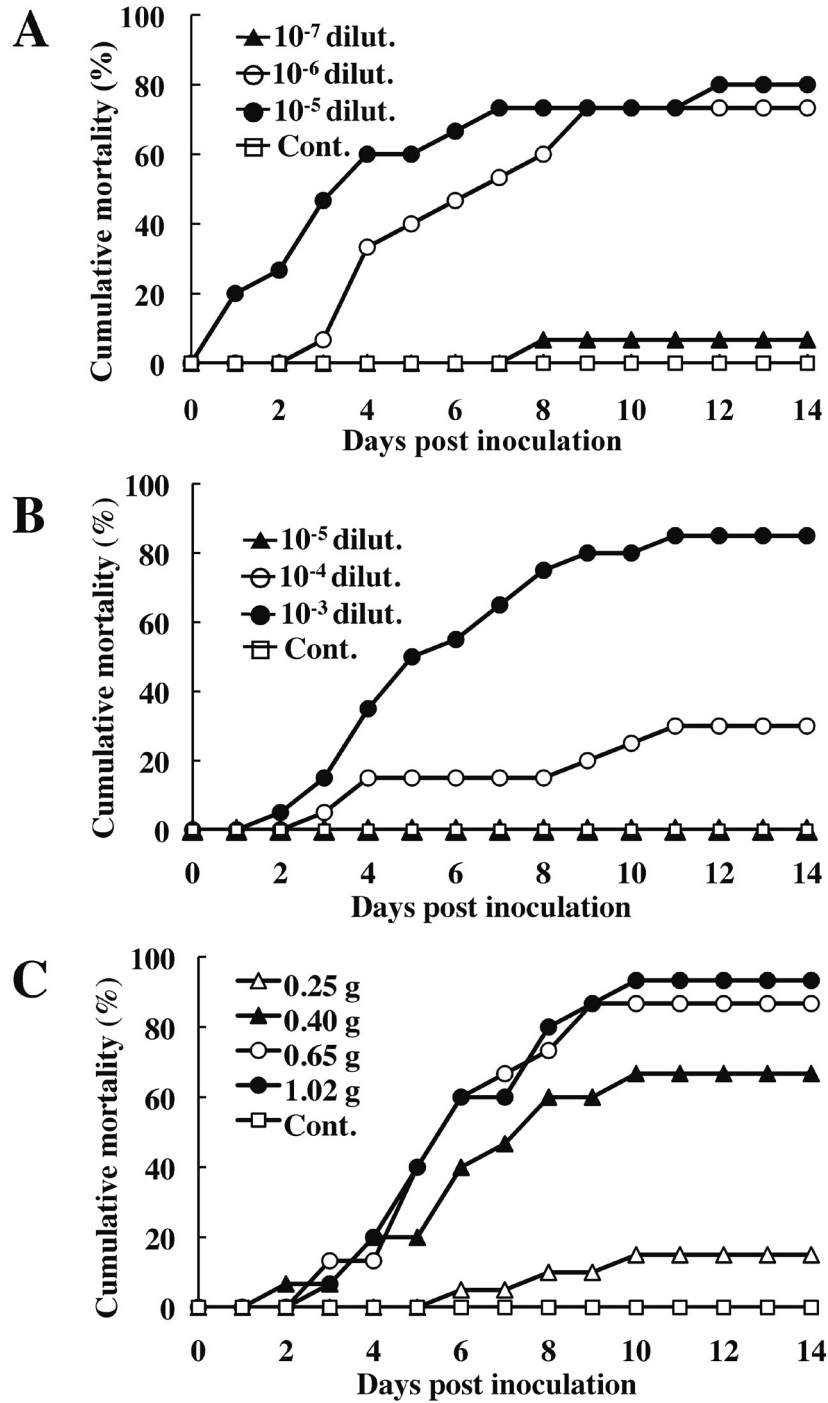


Fig. 16. Cumulative mortality of kuruma shrimp after experimental WSSV challenge by three routes. (A) IM challenge with 0.1 ml of diluted WSSV solution, (B) Immersion challenge with diluted WSSV solution, and (C) Oral challenge with WSD shrimp muscle.

3. 結果

(1) クルマエビに対する WSSV の病原性

WSD 罹病エビ筋肉およびその磨砕液の希釈液を用い、筋肉内注射、浸漬および経口的に WSSV 攻撃を行い、各攻撃法における WSSV の病原性について検討した結果を図16に示した。まず、WSSV 原液の $10^{5.0}$ 倍希釈液を筋肉内接種した区では、ウイルス攻撃の翌日から死亡が認められ始め、飼育2週間後までに累積死亡率は80%に達した。 $10^{6.0}$ 倍希釈液を筋肉内接種した区では、攻撃後3日目から死亡が認められ始め、累積死亡率は73%であった。これに対し、 $10^{7.0}$ 倍希釈液を筋肉内接種した区では、攻撃後8日目に1尾が死亡したが、その後の死亡は認められず、累積死亡率は6.7%であった (Fig. 16-A)。以上の結果より、供試 WSSV 磨砕液の半数致死量 (LD_{50}) は $10^{-7.0}$ mL/shrimp と算出された (Table 8)。同 WSSV 原液の $10^{3.0}$ 、 $10^{4.0}$ および $10^{5.0}$ 倍希釈液を用いた浸漬攻撃では、 $10^{3.0}$ および $10^{4.0}$ 倍希釈液攻撃区で、攻撃後2~3日目から死亡がはじまり、各々の累積死亡率は85%および30%であった。これに対し、 $10^{5.0}$ 倍希釈液攻撃区では死亡は認められなかった (Fig. 16-B)。したがって、供試 WSSV 磨砕液の浸漬攻撃における LD_{50} は $10^{-3.7}$ mL と算出された (Table 8)。上記実験に用いた WSSV 源と同じ WSD 罹病エビ筋肉を 0.25 g/尾、0.40 g/尾、0.65 g/尾および 1.02 g/尾ずつ経口投与した攻撃区での累積死亡率は、各々 15%、67%、87% および 93% で、本罹病エビ筋肉の LD_{50} は、0.37 g/shrimp と算出された (Fig. 16-C, Table 8)。なお、何れの攻撃法においても、対照区での死亡は認められなかった。

(2) rVP26および rVP28経口投与による WSSV に対する防御効果

WSSV rVP26および rVP28を経口投与したクルマエビに対し、対照区の累積死亡率が70%となるような WSSV 量で経口、浸漬および筋肉内接種攻撃した場合の死亡率の変化を Fig.17に示した。経口攻撃区では、rVP26および rVP28を投与したクルマエビに死亡は認められなかったが、大腸菌タンパク質を投与区ならびに対照区では攻撃3日後ないし7日後から死亡が始まり、累積死亡率は各々 31% および 67% であった (Fig. 17-A)。浸漬攻撃区では、攻撃後4日後から8日後に死亡が認められ始め、rVP26、rVP28、大腸菌タンパク質投与区および対照区の累積死亡率は、各々 21%、22%、57% および 73% であった (Fig. 17-B)。一方、筋肉内接種攻撃区では、攻撃後4日目から死亡がはじまり、rVP26、rVP28、大腸菌タンパク質投与区および対照区の累積死亡率は、各々 31%、52%、93% および 79% であった (Fig. 17-C)。なお、WSSV 非攻撃区における死亡は、認められなかった。

経口ワクチンを投与したクルマエビを、経口、浸漬、筋肉内注射により WSSV 攻撃し、死亡および生残した個体からの PCR による WSSV 検出結果を Table 9 に示した。非投与対照区 (PBS 区) における全ての死亡個体から 1step PCR で WSSV が検出され、生残個体でも 66.7% 以上から nested PCR で WSSV が検出された。rVP26および rVP28投与群の生残個体からは、33-60%が 1step PCR で、73.3-100%が nested PCR で WSSV 遺伝子が検出された。しかし、rVPs 投与個体の攻撃試験後の生残個体は、経口攻撃の生残個体の一部 ($\leq 10\%$ の陽性率) から nested PCR で WSSV 陽性となったものの、ほとんどの個体は WSSV 陰性で

Table 8. Virulence of WSSV in kuruma shrimp challenged by intramuscular, immersion and oral routes

Challenge route	50% of lethal dose (LD_{50})	
	Measured value ^a	Converted value (g shrimp ⁻¹)
Intramuscular	$10^{-7.0}$ ml shrimp ⁻¹	$10^{-7.7}$
Immersion	$10^{-3.7}$ ml ml ⁻¹	$10^{-4.4}$
Oral	0.37 g shrimp ⁻¹	$10^{-0.4}$

^a Measured values were calculated from the data shown in Fig. 2

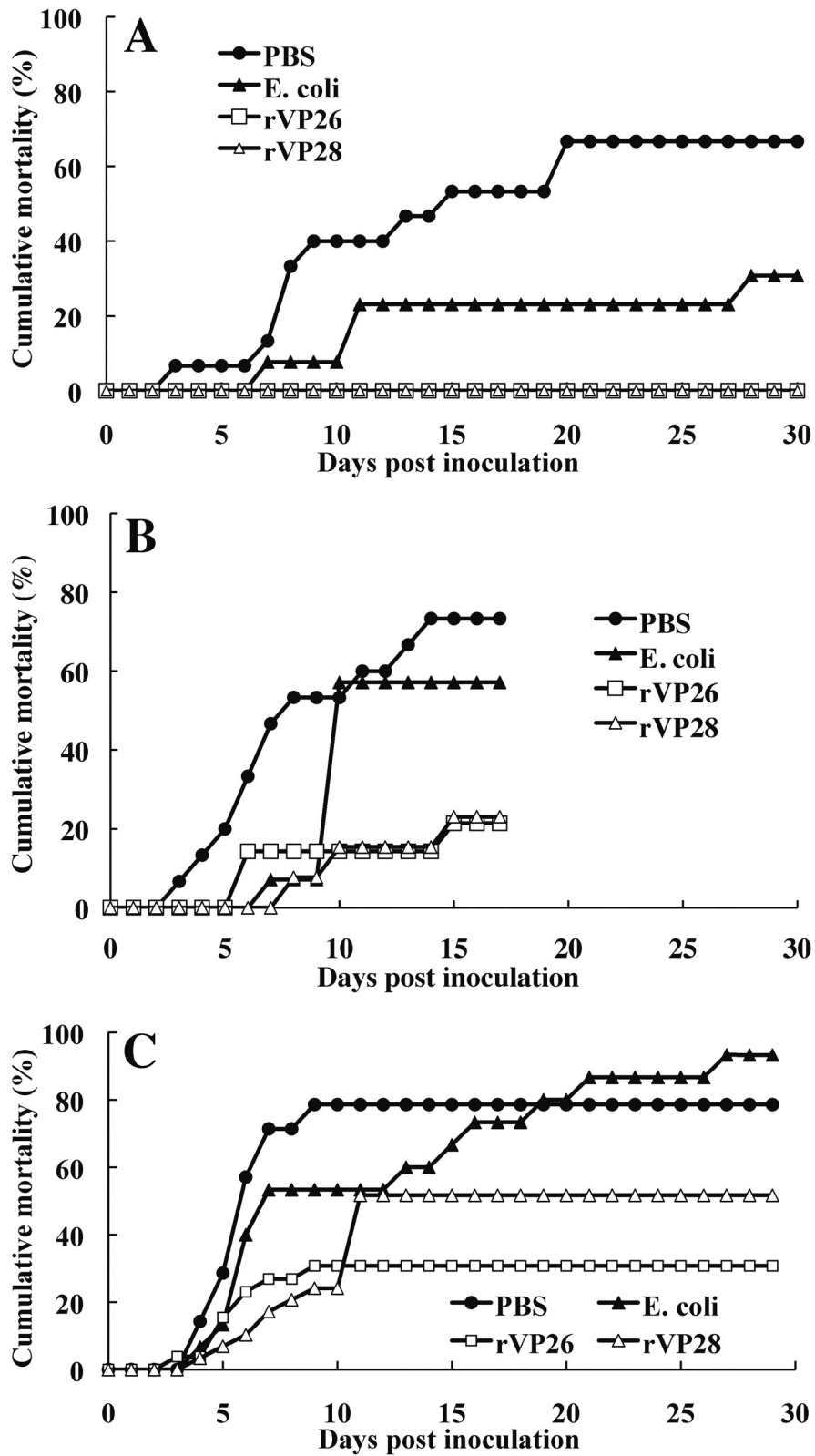


Fig. 17. Cumulative mortality of kuruma shrimp vaccinated orally with WSSV rVP26 or rVP28 and challenged with WSSV by. (A) Oral challenge, (B) Immersion challenge, and (C) IM challenge.

Table 9. PCR detection of WSSV in orally vaccinated shrimp after experimental challenge with WSSV by oral, immersion, and IM routes

Antigen	Detection rate of WSSV (Positive numbers/Examined numbers)													
	Oral challenge				Immersion challenge				IM challenge				Mock challenge	
	Dead		Survivors		Dead		Survivors		Dead		Survivors		Survivors	
PCR	Nested PCR	PCR	nested PCR	PCR	nested PCR	PCR	nested PCR	PCR	nested PCR	PCR	nested PCR	PCR	nested PCR	
rVP26	-	-	0%	6.7%	50.0%	83.3%	0%	9.1%	50.0%	100%	0%	38.9%	0%	0%
rVP28	-	-	0%	10%	33%	83.3%	0%	0%	60.0%	73.3%	0%	35.7%	0%	0%
<i>E. coli</i>	100%	100%	0%	0%	12.5%	50.0%	0%	0%	100%	100%	0%	0%		
PBS	100%	100%	40.0%	100%	100%	100%	25.0%	75.0%	100%	100%	0%	66.7%		
	(10/10)	(10/10)	(2/5)	(5/5)	(11/11)	(11/11)	(1/4)	(3/4)	(11/11)	(11/11)	(0/3)	(2/3)		

あった。すなわち、rVPs 投与個体群の生残エビにおける WSSV 陽性率は、非投与群に比べ有意に低いことが確認された。

以上の結果から、rVP26、rVP28および大腸菌タンパク質投与区の RPS を算出した結果、rVP26経口投与し、経口、浸漬および筋肉注射により攻撃した区の RPS は各々 100%、71% および 61%、一方 rVP28投与区では、100% (経口)、70% (浸漬) および 34% (筋肉注射) となった。rVPS の経口投与群の RPS 値は、rVP28投与区の筋肉注射攻撃 (34%) を除けば、全て 60% 以上であった。一方、大腸菌タンパク質投与区の RPS (%) は、経口攻撃区で 54% であったが、浸漬および筋肉注射攻撃では各々 22% および 0% と、累積死亡率でも rVP26 および rVP28 投与群とは有意に低いことが確認された (Table 9)。

4. 考察

本研究では、WSSV rVP26 および rVP28 を用いた経口ワクチンの開発を目的に、まず筋肉内接種、浸漬および経口投与攻撃による WSSV の病原性について検討した。各攻撃法での LD₅₀ は 10^{-7.0} mL/shrimp、10^{-3.7} mL/shrimp および 0.37 g/shrimp と算出された (Table 7)。各攻撃法に用いた WSSV 源は、何れも同一ロットの罹病エビ筋肉から調製したものであることから、各攻撃法の LD₅₀ を罹病エビ筋肉量に換算したところ、筋肉注射攻撃では 10^{-7.7} g 筋肉組織/shrimp、浸漬では 10^{-4.4} g 筋肉組織/shrimp、および経口攻撃法では 10^{-0.4} g 筋肉組織/shrimp となり、経口感染では浸漬攻撃の 10^{4.0} 倍量、筋肉注射感染の 10^{7.3} 倍量の WSSV が必要となり、経口感染による感染効率は、浸漬感染と筋肉注射に比較して大幅に低い

ことが明らかになった (Table 7)。Escobedo-Bonilla *et al.* (2005, 2006) は、WSSV の攻撃量の標準化を行い、経口法により筋肉注射法と同程度の累積死亡を誘導するためには、10 倍の WSSV が必要であることを報告している。しかし、本実験結果では、経口感染と筋肉注射感染の効率の差は、10^{7.3} 倍であり、Escobedo-Bonilla *et al.* (2005, 2006) の結果と大きく異なっていた。半数致死に必要な WSSV 量は、実験供試種あるいはウイルス株により異なる可能性があるが、何れにせよ経口法による感染効率が他の攻撃法に比べ明らかに低いことが改めて確認された。Wu *et al.* (2001) および Momoyama and Muroga (2005) は、クルマエビの飼育密度の軽減、あるいは共食いの阻止により WSD による累積死亡率が大幅に軽減することを明らかにし、さらに WSSV の感染経路として共食いが重要な要因であることを指摘した。すなわち、経口感染における WSSV の感染効率は極めて低いが、罹病エビ筋肉を摂餌することで大量の WSSV が体内に取り込まれ、結果的に累積死亡率に大きく影響するのではないかと考えられる。本実験においても、共食いが頻発していたことを確認しており、共食いが累積死亡率に影響した可能性が高い。共食いによる経口感染の影響を排除するためには、Wu *et al.* (2001) が行った個別飼育実験法が不可欠である。しかし、本研究の目的は、WSSV rVPs を経口投与したエビの防御効果の検討であり、エビ養殖場では共食いが頻発することを考え合わせると、養殖現場に近い飼育環境下で効果判定を行う必要があると考え、本研究ではあえて集約的飼育法により感染実験を行うこととした。

ところで Namikoshi *et al.* (2004) は、WSSV rVP26、rVP28 およびホルマリン不活化 WSSV をク

クルマエビに筋肉内接種することで、また Wittevedt *et al.* (2004b, 2006) は、rVP28をウシエビおよび White leg shrimp に経口投与することで、WSSV に対する感染防御効果が誘導されることを報告している。しかし、Namikoshi *et al.* (2004) ではワクチンを筋肉内接種し、筋肉内注射による攻撃を行っており、Wittevedt *et al.* (2004b, 2006) は、ワクチンを経口投与して、浸漬攻撃による効果をみたものであり、ワクチンを経口投与したエビの経口攻撃による効果判定を行った報告はみあたらない。

先に示した如く、共食いは WSSV の感染経路として重要であることから、経口ワクチンエビの経口攻撃による検証が必要であると考え、本研究では rVP26, rVP28 および大腸菌タンパク質を経口投与し、経口攻撃に加え、浸漬および筋肉内接種で攻撃し、各攻撃法における経口ワクチンの効果を比較検討した。まず、各攻撃法実験対照区におけるクルマエビの累積死亡率が各々 67~79% であったことから、各攻撃法における WSSV 量が適切であったと考えられた (Table 10)。一方、このような攻撃強度でも rVP26 あるいは rVP28 を経口投与したクルマエビの経口攻撃での RPS は何れも 100% で、同エビを浸漬攻撃した場合においても、RPS はいずれも 70% 以上となり、十分な防御効果が認められた。さらに、経口ワクチン区と非投与区の WSSV 陽性率の明らかな違いが確認された (Table 9)。したがって、rVP26 および rVP28 の経口投与は、WSSV の経口感染に対しても十分な防御効果を誘導できることが確認できた。特に、rVP26 あるいは rVP28 を経口投与したクルマエビに対し、注射攻撃をした時の RPS は、各々 61% および 34% であり、その感染防御効果は経口あるいは浸漬攻撃法で認められた効果に比べ低かった (Table 9)。Namikoshi *et al.* (2004) は、rVP26, rVP28 を筋肉内接種することで

WSSV に対する感染防御効果が誘導されることを報告している。本実験結果では、rVP26 あるいは rVP28 を経口投与したクルマエビが、浸漬感染あるいは筋肉注射感染よりはるかに多量 (Table 8) の WSSV が接種された経口攻撃に対してもまた十分な防御効果を示し、さらに経口攻撃試験における RPS 値が浸漬攻撃あるいは筋肉注射攻撃での RPS を上回っていた。この結果は、Wu *et al.* (2001) および Momoyama and Muroga (2005) が指摘した「共食いによる WSSV の経口感染」の重要性を強く支持するものであり、さらに rVP26 および rVP28 の経口投与によりクルマエビ養殖場で危惧される「共食いによる WSSV の水平的伝播」を阻止できる可能性を示唆するものと考えられる。本実験では、Fig. 15 に示すように rVPs に *E. coli* タンパク質が含有したため、*E. coli* 投与区を対照群の一つとして準備したところ、その RPS は経口攻撃で 54%、浸漬攻撃で 22% と、低いレベルではあるものの WSSV に対する防御効果が認められた (Table 9)。Itami *et al.* (1998), Cheng *et al.* (2005) および Stritunyalucksana *et al.* (1999) は、*E. coli* 由来タンパク質を投与することで、エビの生体防御能が賦活化され、WSSV に対しても抵抗性を示す、いわゆる免疫賦活効果を報告している。本実験結果で認められた *E. coli* 由来タンパク質を投与区の WSSV に対する防御能は、Itami *et al.* (1998), Cheng *et al.* (2005) および Stritunyalucksana *et al.* (1999) の示した免疫賦活効果に起因したのもであると推察している。

ところで、Wu *et al.* (2002) は、WSSV 感染体過エビの WSSV に対する抵抗性は、感染後 3 週間後から誘導され、その後、約 2 か月間持続することを報告しているが、Namikoshi *et al.* (2004) は、ホルマリン不活化 WSSV を筋肉内接種により誘導された防御効果が自然感染による防御効果ほど長期間持続しないこと

Table 10. Protection against WSSV challenge by oral, immersion, and IM routes in kuruma shrimp vaccinated orally with rVP26 and rVP28.

Antigen	Oral challenge			Immersion challenge			IM challenge			Mock challenge	
	n	Mortality (%)	RPS (%)	n	Mortality (%)	RPS (%)	n	Mortality (%)	RPS (%)	n	Mortality (%)
rVP26	30	0*	100	28	21*	71	26	31*	61	12	0
rVP28	30	0*	100	27	22*	70	29	52	34	12	0
<i>E. coli</i>	13	31	54	14	57	22	14	93	0		
PBS	15	67		15	73		14	79			

*Significantly different (1% level) from the non-vaccinated groups by χ^2 test.

を報告している。本研究で、rVP26およびrVP28を経口投与することで、十分な感染防御効果が誘導可能であることが明らかになったが、本感染防御効果の誘導開始時期ならびに持続期間については、重要な課題であり、第4章にて別途検討した。

第4章 WSSV rVP26およびrVP28を経口投与した クルマエビのWSSVに対する感染防御能の 持続期間と特異性

1. 目的

WSSVに自然感染し生き残ったクルマエビがWSSVに対する再感染に抵抗性を示すこと、その抵抗性が感染後3週間から認められ始め約2か月間持続することから、無脊椎動物であるクルマエビの免疫様現象の存在が明らかにされた (Venegas *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2002)。また、本免疫様現象は、WSSVの構造タンパク質を大腸菌で発現させたrVPsを筋肉接種することでも誘導可能であることが確認され、WSSVに対するワクチン開発の可能性が示唆された (Namikoshi *et al.*, 2004)。さらに、第3章において、rVPsを経口投与したクルマエビは、WSSVによる経口、浸漬および筋肉内接種攻撃に対し十分な抵抗性を示すことが明らかになり、実用的な「WSSV経口ワクチン」の開発が具体化されつつある。WSSVのrVPsを用いた経口ワクチンの効果については、ウシエビ、ホワイトレグシュリンプでも実証されている (Witteveldt *et al.*, 2004a; Witteveldt *et al.*, 2004b; Witteveldt *et al.*, 2006; Vaseeharan *et al.*, 2006)。しかしながら、rVPsを経口投与したエビのWSSVに対する防御効果の持続期間については、ほとんど明らかにされていない。

そこで本章では、WSSV rVP26およびrVP28を経口投与したクルマエビを経時的にWSSV攻撃することで、経口ワクチンによる防御効果の発現時期および持続期間について検討するとともに、rVPs経口ワクチンの追加投与効果について検討した。

2. 材料と方法

(1) 供試クルマエビと接種WSSV

宮崎県の養殖場の種苗生産施設で飼育された、WSD感染履歴のないクルマエビ (平均体重0.08-0.09g) を、予めnested PCR (Kimura *et al.*, 1996) でWSSV陰性であることを確認した後、実験に供した。供試エビは、二重底の上面に砂を敷き詰めたFRP製の水槽を用い、電解処理海水 (0.3 mg/L, 23±1℃) を脱塩素処理をして飼育し、体重の3~20%に当たる市販配

合飼料を毎日1~4回給餌した。

攻撃試験に用いるWSSV液の調整は、第3章に記した方法で行った。すなわち、WSD罹病クルマエビの筋肉を4倍量のPBSで磨砕し、遠心分離 (3,000×g, 10 min, 4℃) により得た上清を回収し、WSSV源として使用するまで-85℃に保存した。

(2) WSSV rVP26およびrVP28含有配合飼料の調製

WSSVのrVP26およびrVP28の発現およびrVPs含有配合飼料の調製は、第3章に示した方法と同様に行った。すなわち、pET-VP26あるいはpET-VP28で形質転換した大腸菌をLB-Amp液体培地に接種し、37℃で時間振とう培養し、濁度 (OD₆₆₀) が0.5程度に達したところで、遠心分離により大腸菌を回収し、1 mM IPTG 含 LB - Amp 液体培地に再懸濁し、37℃で3時間振とう培養した。大腸菌細胞を遠心分離 (930×g, 10分, 4℃) により回収し、Triton X-100で処理した後、超音波処理により核酸を破壊し、さらに遠心分離 (12,000×g, 15分, 4℃) によりrVPsを回収した。rVPsをPBSに懸濁した後、市販配合飼料と1:19の割合で混合、攪拌し、さらに配合飼料に対して0.5%量の展着剤 (武田シエリング・アニマルヘルス) を加え乾燥させることで、rVPs含有配合飼料を調製した。

(3) rVP26およびrVP28の経口投与とWSSVによる攻撃試験

実験 I. WSSVに対する感染防御効果の発現時期および持続期間

クルマエビ780尾 (平均体重 92±34 mg) を210 L容量のFRP製水槽に收容し、rVP26およびrVP28を10 μg/g shrimp/日、大腸菌タンパク質 (投与対照区) を25 μg/g shrimp/日、PBS (非投与対照区) を含む配合飼料を1日当たり体重の20%量の給餌率で、15日間連続して経口投与した。Table 11のスケジュールに従い、投与開始から29, 36, 45, 55, 75, 106, 112, 119, 126および135日目にWSSVによる攻撃試験を行い、それぞれの累積死亡率からRPSを算出した。なお、WSSVによる攻撃は、全て浸漬法で行った。すなわち、20~25尾のエビをバケツに收容し、対照区の累積死亡率がおおよそ70%となるように調整したWSSV攻撃液 (WSSV液を海水で10^{4.0}倍希釈) に1時間浸漬した。浸漬後、クルマエビを清浄な海水により流水洗浄し、150 L容の二重底仕様のFRP製水槽に收容した。攻撃後30日間にわたり、各区の累積死亡の推移を観察し、また死亡個体は毎日2度回収し、WSSVの感染による死亡であることをPCRにより確認するため-30℃に保存した。

実験Ⅱ. rVPs 経口ワクチンの追加投与効果

実験Ⅰで rVP26, rVP28, 大腸菌タンパク質, あるいは PBS を経口投与した各区クルマエビを本実験にも供した。初回ワクチン投与により誘導された WSSV に対する感染防御能が半減した時期, すなわち初回投与から75日目に各ワクチン投与区のカクルマエビを65尾ずつ150 L 容量の FRP 製水槽4つに分槽し, 初回投与と同じタンパク質を含む配合飼料を7日間追加投与した。投与量は, rVP26および rVP28 は10 μg/g shrimp/日, 大腸菌タンパク質は25 μg/g shrimp/日とした初回経口投与から106および135日後に, 各試験区から20尾を新たな水槽に移し, 実験Ⅰと同様の手順で WSSV による攻撃を行った。

実験Ⅲ. 感染防御効果の免疫様記憶

実験Ⅰで rVP26, rVP28, 大腸菌タンパク質, あるいは PBS を経口投与した各区のカクルマエビを本実験にも供した。初回ワクチン投与により誘導された WSSV に対する感染防御能が完全に消失した時期, すなわち初回投与から104日後に, 各ワクチン投与区より各々100尾のカクルマエビを210 L 容量の FRP 製水槽4つにそれぞれ分槽し, 初回投与と同じタンパク質を含む配合飼料を5日間追加投与した。初回投与から112, 119, 126および135日目(追加投与から8, 15,

22および31日目)に, 各区より20~25尾ずつ新たな水槽に移し, 実験Ⅱと同様の方法で WSSV による攻撃を行った。

実験Ⅳ. 感染防御効果の特異性

次に新たなクルマエビ飼育群(平均体重0.08g)を210 L 容 FRP 製水槽3つに500尾ずつ収容し, 実験Ⅰと同様 rVP26, rVP28あるいは PBS を含む配合飼料を15日間給餌した。ワクチン投与量および投与法は, 全て実験Ⅰと同様に行った。初回投与開始から35, 45, 55および106日後に, 各区より20~25尾を新たな水槽に分槽し, 実験Ⅰと同様に WSSV 攻撃試験を実施し, 初回投与による WSSV に対する感染防御能が一度上昇した後, 減衰したことを確認した。さらに, 初回投与開始から106日目に, 初回 rVP26投与群から210 L 容 FRP 水槽に2つに60尾ずつ分槽し, 一方には rVP26含配合飼料を(rVP26-rVP26区), 他方には rVP28含配合飼料(rVP26-rVP28区)を各々7日間追加投与した。同様に, 初回 rVP28投与群からも60尾ずつを2水槽に分槽し, 一方に rVP26含配合飼料を(rVP28-rVP26区), 他方には rVP28含配合飼料を(rVP28-rVP28区)を各々7日間追加投与した。なお, 対照として, 初回 PBS 含配合飼料投与群より60尾を分槽し, PBS 含配合飼料を追加投与した。さらに,

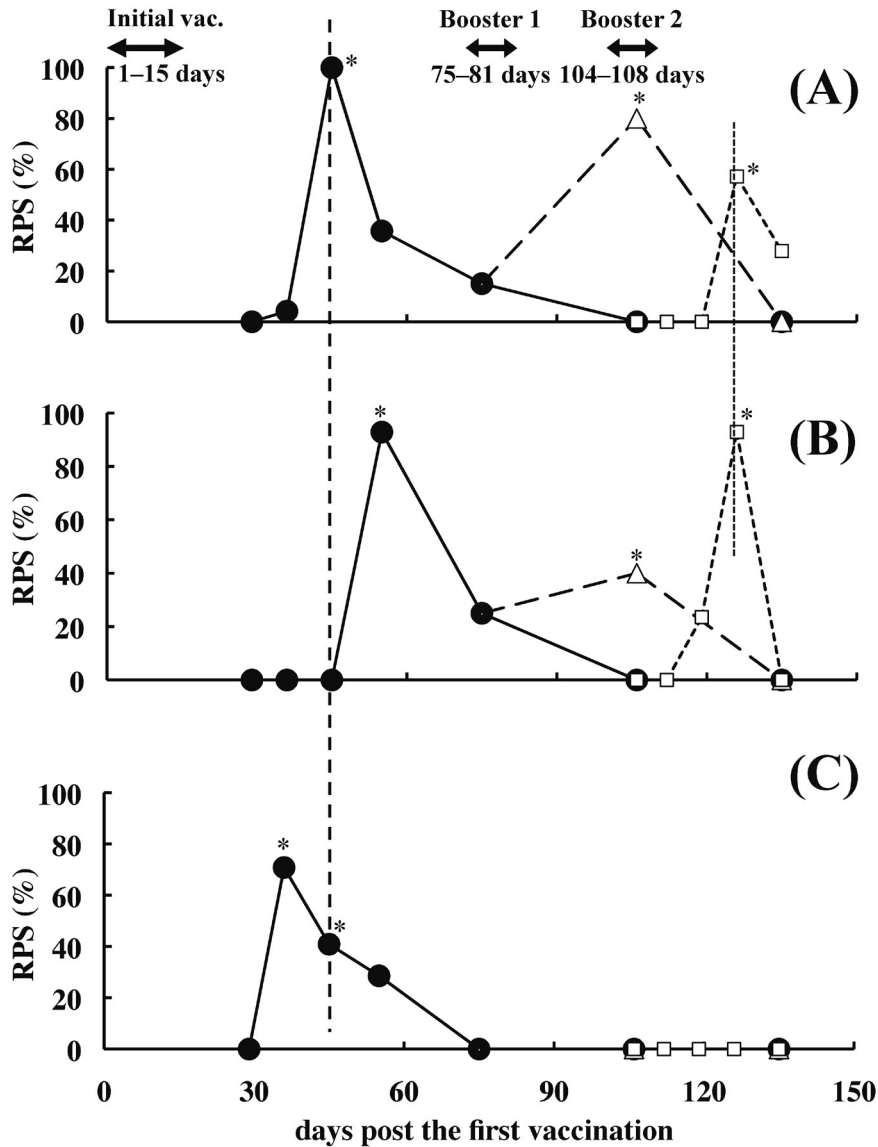
Table 11. Cumulative mortality and relative percentage survival (RPS) in kuruma shrimp vaccinated with WSSV rVP26, rVP28 and *E.coli* proteins by WSSV challenge at different times after the initial vaccination

	Initial Vac. 1-15 d	Days after initial vaccination											
		29 d	36 d	45 d	55 d	75 d	106 d	112 d	119 d	126 d	135 d		
Experiment I	rVP26	Cum. Mort. (%) ^{*1}	92	92	0 ^{*3}	45	68	60				96	
		RPS (%) ^{*2}	0	4	100	36	15	0				0	
	rVP28	Cum. Mort. (%)	96	96	88	5 ^{*3}	60	72				84	
		RPS (%)	0	0	0	93	25	0				0	
	<i>E. coli</i>	Cum. Mort. (%)	92	28 ^{*3}	52 ^{*3}	50	96	72				75	
		RPS (%)	0	71	41	29	0	0				0	
	PBS	Cum. Mort. (%)	84	96	88	70	80	60				70	
Experiment II	rVP26					rVP26	Cum. Mort. (%)	15 ^{*3}				76	
						rVP26	RPS (%)	80				0	
	rVP28					Booster Vac. (75-81 days)	rVP28	Cum. Mort. (%)	45 ^{*3}				79
							rVP28	RPS (%)	40				0
	<i>E. coli</i>					<i>E. coli</i>	Cum. Mort. (%)	75					71
							RPS (%)	0					0
	PBS					PBS	Cum. Mort. (%)	75					71
Experiment III	rVP26					Booster Vac. (104-108 days)	rVP26	Cum. Mort. (%)	85	90	30 ^{*3}	65	
							RPS (%)	0	0	57	24		
	rVP28					rVP28	Cum. Mort. (%)	95	65	5 ^{*3}	88		
							RPS (%)	0	24	93	0		
	<i>E. coli</i>					<i>E. coli</i>	Cum. Mort. (%)	75	85	75	92		
							RPS (%)	0	0	0	0		
	PBS					PBS	Cum. Mort. (%)	65	85	70	86		

*1: Cumulative mortality (%)

*2: Relative percent survival (%) in each group versus PBS group

*3: Significantly different (1% level) from the PBS groups by χ^2 test



(A): rVP26, (B): rVP28, (C): *E. coli* proteins ; RPS of the shrimp with initial vaccination (●), with booster 1 (△), with booster 2 (□). * $p < 0.01$: from the cumulative mortality

Fig. 18. Time-dependent changes of relative percent of survivor (RPS) against WSSV challenge in kuruma shrimp vaccinated with WSSV rVP26, rVP28 or *E. coli* proteins.

初回投与から113日目に、各区から20尾ずつ新たな水槽に分槽し、実験Iと同様の手順でWSSVによる攻撃試験を行い、各ワクチン投与区の累積死亡率の推移を30日間観察した。

(4) 有意差検定および相対生残率

有意差検定および相対生残率は、第3章と同様の方法で行った。

3. 結果

実験I. WSSVに対する感染防御効果の発現および持続期間

rVP26, rVP28, 大腸菌タンパク質およびPBSを経口投与したクルマエビをWSSVで攻撃した際の累積死亡率をTable 11に、またrVP26, rVP28および大腸菌タンパク質投与区のPBS投与区に対する相対生残率(RPS)をTable 11およびFig. 18に示した。

rVP26投与区のWSSVに対する感染防御能は、初回投与36日目から認められ、45日目に最高値(100

%, 累積死亡率0%, $P < 0.01$) に達し, その後減衰し75日目まで持続したが, 106日目以降では WSSV に対する防御能は全く認められなかった。rVP28投与区では, 初回投与から55日目に認められると同時に最高値 (93%, 累積死亡率5%, $P < 0.01$) に達し, その後 rVP26投与区と同様の経過が観察された。一方, 大腸菌タンパク質投与区では, 初回投与から36日目に認められ始めると同時に最高値 (71%, 累積死亡率28%, $P < 0.01$) に達し, 55日目まで持続したが, 75日目以降では防御反応を観察できなかった。なお, PBS 含配合飼料投与区での累積死亡率は, 106日目の攻撃試験で60%と若干低かったものの, その他の攻撃試験では70-96%と安定していた。

これらの結果から, rVP26投与区の感染防御能のピークは, rVP28投与区に比べ若干早いことが明らかになった。また, 大腸菌投与区でも WSSV に対する感染防御能が認められたが, そのピークは rVP26あるいは rVP28投与区に比べさらに早い時期に認められた (Fig. 18-A)。また, rVP26あるいは rVP28を15日間経口投与した際に誘導される WSSV 感染防御能は, 30~40日程度しか持続しないことが明らかになった。

実験Ⅱ. 経口ワクチンの追加投与効果

rVP26を投与したクルマエビに初回投与から75日目に rVP26を5日間追加投与し, 初回投与から106日および135日目に WSSV で攻撃した結果, 106日目に高い感染防御能 (RPS: 80%, 累積死亡率: 15%) が認められたが, 135日目には感染防御能は認められなかった (RPS: 0%, 累積死亡率: 76%) (Table 11, Fig. 18)。rVP28を投与したエビに rVP28を追加投与した場合でも同様に, 106日目に感染防御能が認められたが (RPS: 40%, 累積死亡率: 45%), 135日目には認められなかった (RPS: 0%, 累積死亡率: 79%) (Table 11, Fig. 18)。rVP26あるいは rVP28を追加投与した区で106日目に認められた感染防御能は, 追加投与前 (実験Ⅰ区75日目) および非追加投与区 (実験Ⅰ区106日目) と比べ明らかに高く, 追加投与により WSSV 感染防御能が上昇することが明らかになった。しかしながら, 各追加投与により上昇した感染防御能は, 初回投与より135日目 (追加投与より60日目) には完全に消失していた。一方, 大腸菌タンパク質を初回および追加投与したクルマエビでは, 106日目および135日目の累積死亡率は, 75% (RPS: 0%) および71% (RPS: 0%) となり, 追加投与による感染防御能の上昇は認められなかった。なお, PBS 追加投与区の累積死亡率は, 何れも71%以上であった。

実験Ⅲ. 感染防御効果の免疫様記憶

初回ワクチン投与により誘導された感染防御能が

完全に消失した時期, すなわち初回投与から104~108日目に実験Ⅱと同様に追加免疫を行い, 追加投与による感染防御能の変化を表10および図15に示した。rVP26を追加投与した区では, 112日目 (追加投与8日目) および119日目 (追加投与15日目) の攻撃で感染防御能は認められなかったが, 126日目 (追加投与22日目) の攻撃では RPS が57% (累積死亡率30%) となり, 比較的高い感染防御能が認められた。しかし, 135日目 (追加投与31日目) の攻撃では, RPS は24% (累積死亡率65%) となり, 感染防御能は126日に比べ減衰していた。

rVP28を追加投与した区では, 112日目 (追加投与8日目) の攻撃で感染防御能は認められなかったが, 119日目 (追加投与15日目) の攻撃で感染防御能が認められ始め (RPS: 24%), さらに126日目 (追加投与22日目) の攻撃では RPS が93% (累積死亡率5%) となり, 高い感染防御能が認められた。しかし, 135日目 (追加投与31日目) の攻撃では, 感染防御能は消失していた。

大腸菌追加投与区では, 112~135日目の攻撃で何れも RPS は0%で, 追加投与による WSSV に対する感染防御能は認められなかった。なお, PBS 追加投与区の累積死亡率は, 何れも65%以上であった。

実験Ⅳ. 感染防御効果の特異性

rVP26あるいは rVP28を経口投与し, さらに同種あるいは異種タンパク質を追加投与した場合の WSSV 感染防御能の推移を Table 12に示した。まず, rVP26あるいは rVP28を経口投与し35日, 45日, 55日および106日目に WSSV により攻撃を行ったところ, 35日および45日目の攻撃では感染防御能は認められなかったが, 55日目の攻撃で WSSV 感染防御能が上昇し (rVP26投与区の RPS: 72%, rVP28投与区の RPS: 59%), さらに106日目の攻撃では感染防御能が減衰あるいは消失していた。

次いで, 初回投与106~112日目に初回投与ワクチンと同種あるいは異種タンパク質を追加投与し, 初回投与から113日目 (追加投与7日目) に WSSV 攻撃を行った。その結果, rVP26投与区に rVP26を追加投与した場合 (rVP26-rVP26) の RPS は100%であったのに対し, 同区 rVP28を追加投与した場合 (rVP26-rVP28) の RPS は33%で, 同種抗原を追加投与した場合の RPS は異種抗原を投与した場合に比べ明らかに高かった。また, rVP26-rVP26区の RPS は追加投与直前の RPS (21%) に比べ明らかに高かったが, rVP26-rVP28区と追加投与直前の RPS に有意な差異は認められなかった。一方, rVP28投与区に rVP26あるいは rVP28を追加投与した場合, rVP28-rVP26およ

Table 12. Booster effect of homologous and heterologous rVPs in shrimp phylaxis induced by oral vaccination with recombinant WSSV proteins, rVP26 and rVP28

Initial Vac. 1–15 d	Days after initial vaccination				Booster Vac. 106–112 d	113 d			
	35 d	45 d	55 d	106 d					
Experiment IV	rVP26	Cum. Mort. (%) ^{*1}	80	87	24 ^{*3}	55	rVP26	Cum. Mort. (%)	0 ^{*3}
		RPS (%) ^{*2}	11	0	72	21	rVP28	RPS (%)	100
	rVP28	Cum. Mort. (%)	87	87	36 ^{*3}	90	rVP26	Cum. Mort. (%)	30
		RPS (%)	3	0	59	0	rVP28	RPS (%)	33
PBS	Cum. Mort. (%)	90	80	88	70	PBS	Cum. Mort. (%)	26	
								42	
								15 ^{*3}	
								67	
								45	

*1: Cumulative mortality (%)

*2: Relative percent survival (%) in each group versus PBS group

*3: Significantly different (1% level) from the PBS groups by χ^2 test

び rVP28-rVP28の RPS は、各々 42% および 67% で、先と同様に同種ワクチンを追加投与により誘導された感染防御能の方が、異種ワクチンを追加投与に比べ高いことが明らかになった。さらに、rVP26追加投与区である rVP26-rVP26区 (RPS: 100%) と rVP28-rVP26区 (RPS: 42%) を比較した場合、同じ rVP26 を追加投与したにもかかわらず同種ワクチン投与区の RPS が異種ワクチン投与区の RPS の 2 倍以上高いものであった。逆に、rVP28追加投与区で比較しても同様に、rVP28-rVP26区 (RPS: 33%) の感染防御能は、rVP28-rVP28区 (RPS: 67%) に比べ 2 倍以上高かった。

4. 考察

実験 I の結果から、rVPs をクルマエビに経口投与した場合、WSSV に対する感染防御能は、投与 45-55 日目に出現し、その後 20~30 日間維持されることが明らかになった (Fig. 18-A, B)。Namikoshi *et al.* (2004) は、rVPs をクルマエビに筋肉注射投与した場合、WSSV に対する抵抗性は接種 30 日目以降に確認されることを報告している。また、WSSV 感染体過エビの場合では、WSSV に対する抵抗性は感染後 3 週目から出現し、その後約 2 か月間持続されたとしている (Wu *et al.* 2002)。したがって、クルマエビの場合は、ワクチンの投与方法にかかわらず、WSSV 感染防御能の誘導に約 20~30 日程度必要であると考えられる。しかし、rVPs により誘導された感染防御能の持続期間は、感染耐過エビで認められた防御能に比べ明らかに短いことが示唆された。一方、ウシエビに rVP28 を経口投与した場合、投与後 7 日目に最も高い防御効果が確認され (Witteveldt *et al.*, 2004)、また体重

5g のホワイトレグシュリンプでも同様に、投与後 7 日目に高い防御反応が観察されている (Witteveldt *et al.*, 2006)。この様に、rVPs 経口投与により誘導される感染防御能の時期は、クルマエビとその他のエビ類では大きく異なるように見えるが、実際には、供試エビの種類のみでなく、体重、接種抗原の種類、接種方法あるいは飼育水温等の条件が実験結果に大きく影響すると考えられる。特に体重は、防御反応の誘導時期に影響する最も重要な要因の一つであると考えている。なぜなら、予備的な実験ではあるが、平均体重 0.1 g、0.8 g および 2.5 g のクルマエビに rVP26 を経口投与した場合、0.1 g および 0.8 g のエビでは rVP26 投与後 45 日目まで感染防御能が認められなかったが、0.8 g のエビでは投与後 36 日で検出され、サイズの大きいエビの方が速やかに感染防御能が出現する傾向が認められている。

実験 I において、rVPs の経口投与による防御効果の持続期間は 20~30 日間であり、感染耐過エビに比べ短いことが明らかになり、養殖現場での rVPs 経口ワクチン使用を想定した場合、大きな課題が残された。そこで、実験 II では、rVPs の追加投与により感染防御効果への影響を検証した。実験 II では、rVPs 初回投与による WSSV 感染防御能のピークが過ぎ減衰したものの、まだ防御能が残存する時期、初回投与 75~81 日目に追加投与を行った (Table 11, 実験 I, 75 日)。その結果、初回投与後 106 日目の攻撃試験で、非追加投与区に比べ明らかに高い感染防御能が確認された (Table 11)。本感染防御能は、追加投与直前の感染防御能と比較しても明らかに高かったことから (Table 11)、rVPs を追加投与することで WSSV 感染防御能

を維持することが可能であると考えられる。しかしながら、初回投与から135日目（追加投与より60日目）に行った WSSV 攻撃試験において、rVPs 追加投与区のエビに WSSV 感染防御能が認められなかったことから、追加投与により WSSV 感染防御能の持続期間を延ばすことが可能であるが、追加投与により延びる持続期間は比較短く、WSSV 感染防御能を維持し続けるためには少なくとも30~40日毎にrVPsを追加投与する必要があると考えられる。

実験Ⅲでは、rVPsの初回投与により誘導されたWSSV感染防御能が完全に消失した時期、すなわち初回投与から104~108日目にrVPsを追加投与し、感染防御能の推移を観察した。その結果、rVPsを追加投与した区では、追加投与直後（初回投与112日目、追加投与8日目）の攻撃で感染防御能は認められなかったが、119~126日目（追加投与12-15日目）の攻撃で高い感染防御能（rVP26追加投与：57%、rVP28追加投与：93%）が認められた。しかしながら、135日目（追加投与31日目）の攻撃で、WSSV感染防御能が既に大幅に減衰あるいは消失していることが明らかになった（Fig. 18）。残念ながら、初回非投与群を設けていなかったことから、rVPs追加投与による感染防御能の出現時期について正確に比較することは出来ないが、追加投与による感染防御の誘導（約12~15日前後）は初回投与（約30日前後）に比べ速い可能性が示唆された。また、先にも述べた如く、追加投与による感染防御能の持続期間は、初回投与あるいは感染耐過エビに比べ、明らかに短いことが再確認された。

ところで、Namikoshi *et al.* (2004) は、クルマエビにrVPsを筋肉内注射により追加投与することで、WSSVに対する感染防御能が亢進することを報告している。本実験結果では、初回投与による感染防御能がRPS 93%以上と高かったこともあり、残念ながら追加投与により感染防御能の亢進は認められなかったが、追加投与による感染防御の誘導が速まる傾向が認められた。これらの現象は、脊椎動物における免疫の二次応答に極めて類似した現象である。無脊椎動物であるエビ類は抗体を持たないことから、狭義の免疫はないと考えられてきた。しかしながら、WSSV感染耐過エビがWSSV再感染に抵抗性を示す、いわゆる免疫様現象が発見され（Venegas *et al.*, 2000）、rVPsを投与することでWSSV感染防御能が誘導されること（Wu *et al.*, 2002）、さらにはrVPsを追加投与により感染防御能が持続されることは、エビ類にも免疫反

応に類似した感染防御機構が備わっている可能性を示唆する結果であると考えられる。

そこで実験Ⅳでは、rVPs投与により誘導されるWSSV感染防御能の特異性について検討するために、初回投与と同種あるいは異種のrVPsを追加投与した場合の感染防御能の変化について検討した（Table 12）。その結果、同種rVPsを追加投与した場合（rVP26-rVP26およびrVP26-rVP26）のRPSは、異種rVPsを追加投与した場合（rVP26-rVP28およびrVP28-rVP26）に比べ明らかに高く、また追加投与直前と比べても感染防御能が亢進していることが明らかになった。さらに、rVP26追加投与区であるrVP26-rVP26区（RPS: 100%）とrVP28-rVP26区（RPS: 42%）とを、またrVP26追加投与区であるrVP26-rVP28区（RPS: 33%）とrVP28-rVP28区（RPS: 67%）とを比較した場合、同じrVP26あるいはrVP28を追加投与したにもかかわらず同種ワクチン投与区のRPSが異種ワクチン投与区の2倍以上高いことが明らかになった。一方、予備的に行った試験では、WSSV感染防御能を誘導されたクルマエビは、ピブリオ感染に対する防御能を示さなかったこと、WSSV感染防御能を誘導されたクルマエビの血リンパ上清中には、WSSVを中和する活性が認められること、さらに本血リンパ液は他の魚類病原ウイルスであるinfectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)、viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) およびinfectious pancreatic necrosis virus (IPNV)を中和することができなかった（Wu, 2003 博士論文）*5。これらの結果は、クルマエビがrVP26とrVP28を異なるタンパク質として認識している可能性を示唆するものであり、さらに先の実験では明らかにできなかった同種rVPを追加投与することで、WSSV感染防御能が亢進されることを示す結果であると考えられる。すなわち、クルマエビも、抗体こそ持たないが、脊椎動物の免疫に相当する生体防御機構を備えている可能性があると考えられる。

ところで、本研究で大腸菌タンパク質を経口投与したクルマエビにおいても、WSSV感染防御能が認められた。これまでの研究で、ペプチドグリカン、 β -1,3-グルカンもしくはリポ多糖体（LPS: lipopolysaccharide）の経口投与によって誘導される感染防御反応は、細菌感染のみならず（Sun *et al.*, 1994; Teunissen *et al.*, 1998; Sritunyalucksana *et al.*, 1999）、WSSVに対しても効果が認められている

*5 Wu, J. L., 2003. Studies on quasi-immune response of kuruma shrimp *Penaeus japonicus* against white spot syndrome virus (WSSV). Applied Biological Science, Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University, Doctoral Thesis 62-81.

(Itami *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2000)。また最近, β -1,3-グルカンおよびLPSに対する結合タンパク質遺伝子が *P. monodon* (Luo *et al.*, 2006) および *L. schmitti* (Cominetti *et al.*, 2002) からクローニングされ, さらに Toll 受容体遺伝子が *L. vannamei* (Yang *et al.*, 2007) から単離されている。本実験結果において, 大腸菌タンパク質投与区では, 感染防御能のピーク (RPS 値71%) が投与後36日目から認められおり, rVPs 投与区のピークに比べ10~20日程早かったこと (実験 I), さらに大腸菌タンパク質の追加投与による効果は一切認められなかったことから (実験 II, III), 大腸菌タンパク質により誘導された WSSV 感染防御能は, rVPs により誘導された感染防御能とは異なる機序によって誘導されたのではないかと考える。

総合考察

クルマエビ種苗生産過程における WSSV の防除対策の現状を Fig. 8 に模式的に示した。種苗生産に供する受精卵を確保するのに必要な雌親エビの養成技術はまだ確立されていない。採卵用の成熟した親エビは, ほとんどの場合天然由来の親エビに依存している。天然親エビが WSSV に感染していれば, 種苗生産現場にウイルスを持ち込むことになり, 飼育過程における WSD 発生の危険性が高くなる。また, 天然海域に生息する甲殻類や海水を介しての水平的な伝播が起こる可能性がある。従って, 種苗生産場へ WSSV を持ち込まないために感染経路の遮断を中心とした防除対策の構築が求められる。現在では, 産卵に供試した親エビの PCR 法による WSSV 検出結果に基づくウイルス陽性エビの排除と受精卵のヨード剤による消毒の実施, および飼育用水の殺菌を中心とした防除対策を講じることにより, WSSV フリーの種苗を確保する技術が確立した。次のステップとして, クルマエビの免疫様現象を利用した水平感染防除対策の構築が可能となれば, ウイルスフリーの種苗の有効利用につながるとともにクルマエビにおける WSD の総合的な防除対策の構築が可能となる。本研究第1章および2章においてクルマエビ種苗生産における WSD の発生状況と垂直感染の防除を中心とした防除対策の効果について検討した。第1章では種苗生産過程における WSD の発生状況の詳細な検討により, WSSV の主たる感染経路の推定を行った。また, 第2章ではポビドンヨード剤による安全で効果的な受精卵の消毒条件を把握する目的で, クルマエビ受精卵に対する安全濃度, 消毒処理時間および消毒効果について検討した。

前述の如くウイルスフリーの種苗を生産する技術を

確立したが, 飼育環境をウイルスフリーの状態に保つことが困難な育成段階における水平感染対策は, これまで無策であった。しかし, クルマエビにおける免疫様現象の発見により (Venegas *et al.*, 1999), エビ類においても十分に免疫様現象を利用したワクチン技術の開発が可能であると考えに至った。第3章では, rVPs の経口投与による WSSV 攻撃への防御効果を注射, 浸漬および経口攻撃によって検討した。第4章では, 防御効果の発現時期, 持続期間および追加投与効果について検討し, 経口ワクチンによる水平感染対策の構築を目的として研究に取り組んだ。

ここでは, これまでの結果を総合的にとりまとめ, クルマエビの WSSV 防疫対策の展望について考察する。

第1章において, 1996年以降の志布志庁舎における種苗生産過程の WSD の発生状況を検討した。その結果, 産卵親エビの卵巣から WSSV が検出されたこと, これらの PCR 陽性個体由来の受精卵を排除したところ, 種苗生産の成功事例は23事例中21事例 (91.3%) になり, WSSV の防除効果を確認できる結果が示され (Table 13), 親エビにおける WSSV の検出結果と種苗からの WSSV の検出および WSD の発生が良く符合した。また, WSSV 陽性の親エビを排除した種苗生産での成功率の上昇から, 種苗生産過程における WSSV の主たる感染経路は親エビからの垂直伝播と考えられた (佐藤ら, 1999)。虫明ら (1998) は, 1996年7月から1998年4月までに国内主要漁場で漁獲された天然親エビ合計1,269尾 (雌955, 雄314) の9.2%から WSSV を検出し, 検出率は, 夏期 (7月から8月) に漁獲される親エビで高まる傾向がみられ, 反対に4月から6月にかけて漁獲される雌親エビでは低い傾向があったとした。これとは別に, 2002年から2007年までの実際の種苗生産において採卵に供試された雌親エビ6,312尾からの WSSV 検出状況の推移を Fig. 19 に示した。2002年に東海沿岸および九州東岸2の海域で50%に達する検出率を示した後, 2003年以降15.0%の検出率を最高にほぼ10%前後で推移し, 検出される地域が特定の場所に偏った傾向がみられるとともに, 7月あるいは8月頃に検出されやすい傾向がみられた。天然海域での棲息個体から WSSV が検出されることはウシエビ (Lo *et al.*, 1997) やヨシエビ (Wang *et al.*, 1997) でも報告され, ウシエビでは産卵期である夏から秋の漁獲個体の方が冬の漁獲個体より検出率が高くなることが報告されている。この現象はクルマエビと同様であり, クルマエビにおいては多回産卵がストレスナーとなって, 親エビに不顕性感染している WSSV の増殖を誘発することに起因すると考えら

れている (Mushiake *et al.*, 1999)。このような検出率に季節的な変動が起こる現象を踏まえ、種苗生産においては、WSSV の感染率が比較的低い4月から6月に漁獲される親エビを搬入し、それらの親エビから得られた卵を飼育に用いることも WSSV の防除対策の一つとして有効とされている (虫明ら, 1998)。また、1997年から1999年の3年間における、親エビの産卵前後の卵巣卵および受精囊 (交尾により雄から獲得した精子を貯蔵しておく小囊) からの WSSV 検出率を比較すると、卵巣卵および受精囊のいずれも産卵前より

産卵後の方が検出率が高く、また、産卵後の検出率は卵巣卵より受精囊の方が高くなっている (Table 13) (Mushiake *et al.*, 1999)。以上の結果から、親エビの WSSV 検出結果に基づく受精卵の選別を行う防除対策においては、産卵後の受精囊を検査部位に選択することが重要であると考えられる。

Fig. 19に示した天然クルマエビの WSSV 検出状況の調査において、2002年から2003年にかけて検出率の低下とともに四国東岸での検出率が比較的高く推移した。いずれについても要因は不明であるが、九州東岸

Table 13. Occurrence of WSD at Shibushi and Kamiura station of JASFA in 1996 to 2000

Year	Selection of spawnres* ¹	Disinfection treatment of eggs	No. of successes / conducted
1996	Not done	Not done	6/14 (42.9%)
1997	From ovary pre-spawning	Iodine	21/23 (91.3%)
1998	From R. S. * ² after spawning	Iodine	11/11 (100%)
1999	From R. S. after spawning	Iodine	16/16 (100%)
2000	From R. S. after spawning	Iodine	20/21 (95.2%)
			47/48 (97.9%)

*1 Selection based on PCR results.

*2 R. S. :receptaculum seminis.

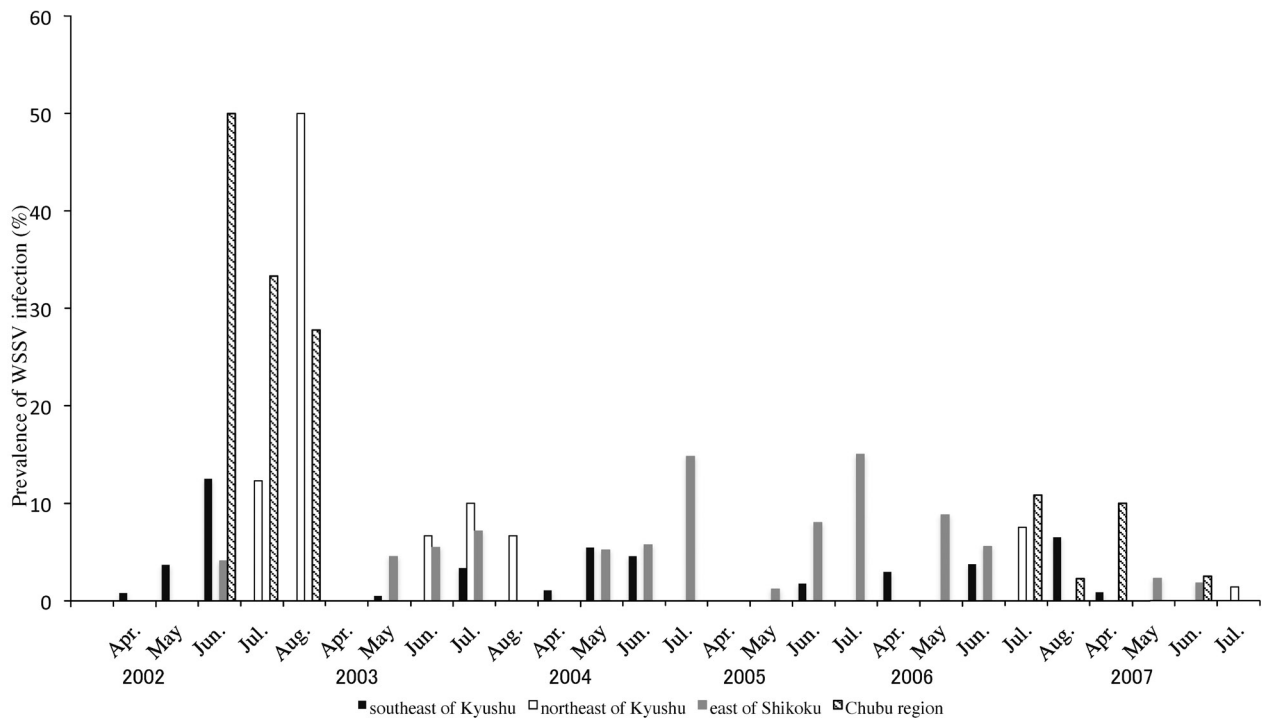


Fig. 19. Seasonal change of prevalence of WSSV in wild female kuruma prawn caught from each major landing places in Japan.

海域で検出率が低下した要因の一つとして病原体と宿主の平衡関係の成立が考えられる。室賀（2000）は、オーストラリアの野ウサギの撲滅に用いたミクスーウイルスとの平衡関係成立までの世代数でみると6世代かかったとされる事例から、国内のニジマス（1世代が3年）におけるIPN（伝染性腭臓壊死症）の発症（1964年頃）から終息まで（20年弱）の事例とも良く符合し、病原体と宿主の平衡化が流行の終息に関わっている可能性を論じている。クルマエビのWSDが発生するようになった1993年から現在までに15年経過し、クルマエビの1世代を2年とすれば7世代が、3年とすれば5世代が経過したと考えられ、クルマエビとWSSVの平衡化が起きているかもしれない。WSDが国内で発生後、WSSVは天然の甲殻類から検出あるいは分離されていることから、このウイルスは国内に定着したものと考えられる。天然クルマエビの検出率が低下傾向にある地域もあるが、継続して検出される地域も存在し、天然の甲殻類にいかにしてWSSVの感染が定着していったのか、天然海域におけるWSSVの感染環については興味深いところである。魚類のベータノダウイルスにおいては、分子疫学的な調査手法により天然マアジから検出されるベータノダウイルスの遺伝的多様性が調べられ、天然マアジ間でのベータノダウイルスの伝播に地理的・季節的要因が関係していると考えられている（菅谷ら、2007学会発表）*6。WSSVの検出状況においても地理的あるいは季節的な変動がみられることから（Fig. 19）、このような、分子疫学的手法によるデータの蓄積を行うことで、天然域でのWSSVの分布および動体を把握することが可能となれば、流行予測という観点から、より高度なWSSV防除対策の構築が可能となると考える。

前述のように、種苗生産過程でのWSDの発生状況から、WSSVの感染経路として垂直伝播が強く示唆され、産卵後の親エビ受精嚢を検査し、陰性と判定された親エビ由来の卵のみを選別して種苗生産を実施したところ、Table 13に示したように1998年から2000年までのクルマエビ種苗生産の成功率は97.9%となった。したがって、親エビの受精嚢検査に基づく卵選別と次項目で述べる卵消毒とを組み合わせた方法は、種苗生産過程におけるクルマエビのWSSV防除対策として極めて有効であると考えられる。しかし、48事例中わずか1例ではあるが種苗からWSSVが検出され、WSDの発生には至らなかったものの、種苗生産を中

止せざるを得ない事例があった。その後、この原因は、産卵後の受精嚢はPCR陰性であったが、卵巣がPCR陽性の個体が含まれていたことが判明し（虫明ら、未発表）（Table 14）、産卵後の受精嚢検査結果だけにに基づく卵の選別では、WSSVの検出漏れを起こすことが判明した。この検出漏れを防ぐには、1個体について卵巣卵と受精嚢の2部位を検査することが必要になるが、コストおよび検査時間の延長など問題点があることから、最も現実的な防除対策として、親エビのPCR陽性率が低い4月から6月の比較的早い時期に漁獲される親エビを用い、産卵後の受精嚢からのWSSV検出結果に基づく受精卵の選別が有効かつ効果的であると考えられる。

WSSVがクルマエビ受精卵に侵入するのか、単に表面に付着しているだけなのかについては明らかではない。また、受精卵の消毒に関しても、今のところ効果を厳密に確認した例は報告されていない。台湾におけるウシエビのWSDでは興味深い報告がある。WSSVが卵巣卵内に存在すると卵の発育が阻害され、垂直伝播が起これないとされている。しかし、この場合でも、卵およびふ化幼生については洗浄または消毒を実施することが有効な垂直伝播の防除になっている（Lo *et al.*, 1997）。志布志庁舎では、受精卵の卵表面に存在するウイルスを不活化することを目的として、1997年以降、ヨード剤（有効ヨウ素濃度5 mg/L）を含む紫外線処理海水で5分間の消毒を行っている。最近の研究報告では、WSSVは有効ヨウ素濃度2.5 mg/L以上では0.2分以内、1.0 mg/Lでは2分以内に不活化されるとされていることから（桃山、谷村、2004）、上述の消毒条件は十分に受精卵表面のWSSVを不活化できているものと推定される。さらに、第2章で述べたように受精卵の発育段階が128細胞期以外の段階に有効ヨウ素濃度の減衰が起これないことが確認された卵密度（0.33 g/L）で有効ヨウ素濃度2.5および5.0 mg/Lで5分間の消毒処理により、ヨードを含まない海水で消毒操作のみを行った対照区の正常ふ化率と遜色ない正常ふ化率が得られることが確認され、安全かつ効果の期待できる卵消毒方法であると考えられる（佐藤ら、2006）。

種苗生産過程におけるWSDの発生には、WSSVの親エビからの垂直伝播のほかに、水平伝播も重要な要因の一つと考えられる（佐藤ら、2003）。特に高密度の飼育環境下では、共食いや飼育水を媒介とした水平感染が容易に成り立つことが報告されている（Wu

*6 菅谷琢磨、森広一郎、西岡豊弘、沖中 泰、中井敏博、池田和夫、2007. 天然マアジから検出されたベータノダウイルスの遺伝的多様性. 平成19年度日本魚病学会春季大会講演要旨集 p. 37.

Table 14. Prevalence of WSSV in ovary and receptaculum seminis of kuruma prawn spawners by nested PCR before and after spawning during 1997-1999

Date of purchase		Prevalence of WSSV (%)			
		Ovary		Receptaculum seminis	
year	month	Pre-spawning	Post-spawning	Pre-spawning	Post-spawning
1997	Apr.	1.6(4/248) ^{*1}	3.4(3 / 87)	NE ^{*2}	NE
	May	0(0/ 81)	0(0/ 40)	NE	NE
	Jun.	0(0/108)	0(0/ 37)	0(0/ 38)	2.3(2/ 86)
	Jul.	0.7(2/297)	4.0(4/101)	8.6(6/ 70)	39.2(83/212)
	Aug.	1.3(3/240)	10.0(10/100)	5.7(2/ 35)	52.6(41/ 78)
Total in 1997		0.9(9/974)	4.7(17/365)	5.6(8/143)	33.5(126/376)
1998	Mar.	0(0/ 3)	0(0/ 18)	0(0/ 3)	0(0/ 18)
	Apr.	0(0/ 38)	0(0/587)	0(0/ 38)	1.4(8/587)
	May.	0(0/ 13)	0.9(1/111)	0(0/ 13)	0.9(1/111)
	Jun.	0(0/ 13)	1.6(2/122)	0(0/ 13)	13.9(17/122)
	Jul.	0(0/108)	1.4(2/148)	0(0/ 21)	24.3(36/148)
Total in 1998		0(0/175)	0.5(5/986)	0(0/ 88)	6.3(62/986)
1999	Mar.	0(0/ 15)	0(0/181)	0(0/ 15)	0(0/181)
	Apr.	0(0/ 10)	0(0/262)	0(0/ 10)	0(0/262)
	May.	0(0/ 5)	0(0/ 39)	0(0/ 5)	0(0/ 39)
	Jun.	0(0/ 10)	6.8(5/ 74)	0(0/ 10)	41.9(31/ 74)
	Jul.	0(0/ 7)	0(0/ 15)	14.3(1/ 7)	56.1(37/ 66)
Total in 1999		0(0/ 47)	1.9(12/622)	2.1(1/ 47)	10.9(68/622)

^{*1}(PCR positive/examined).

^{*2} Not examined.

et al., 2001)。従って、予防措置として極端な高密度飼育を避け飼育環境に配慮する必要があるとともに飼育水槽間の器具の共用の禁止、エアレーションなどによる飛沫感染の防止等に注意を払う必要がある。これらの水槽や使用器具については、WSSVに有効な不活化効果のある薬剤が報告されているので（中野ら, 1998；Chang *et al.*, 1998；Maeda *et al.*, 1998), 用途に見合った消毒剤を使用すれば、容易に消毒は可能であると考えられる (Table 15)。

前述の如く、WSSV フリーの種苗を作る技術は確立したが、中間育成過程あるいは養殖漁業における種苗の育成環境は、自然環境に近い条件で行う場合が多く、前述の如く環境生物や飼育水からの水平伝播による感染が起こる可能性がある (Maeda *et al.*, 1998；Wu *et al.*, 2001；Momoyama, 2003)。ウイルス感染症

の水平感染対策の具体策は、薬剤での治療が困難であることから、養殖用種苗としては、ワクチンを利用する方法や SPR (specific pathogen resistant) 種苗の導入を図ることが最良と考えられる。Venegasu *et al.* (1999) によるクルマエビにおける免疫様現象の発見により、エビ類でも免疫抗原の投与によるワクチンに類似したウイルス感染症防除の確立が十分に期待できると考えられる。WSSVは株化細胞による培養ができないため、免疫抗原の効率的作成が困難であるが、大腸菌発現系等を用いた WSSV 構造タンパク質の発現精製が可能であり、現在では最も効率的な免疫抗原の作成方法の一つとして用いられている (Namikoshi *et al.*, 2004；Witteveldt *et al.*, 2004,2006；Jha *et al.*, 2006, 2007)。本研究では、WSSV の構造タンパク質である rVP26 (tegument タンパク質由来) およ

Table 15. Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of WSSV

Treatment	Condition	Reference
Heat	≥ 1 minute at 60°C, ≥ 1 hour at 50°C	Nakano <i>et al.</i> (1998)
Dry	≥ 3 hours at 26°C	Maeda <i>et al.</i> (1998)
NaCl	≥ 24 hours at concentrations of 25%	Nakano <i>et al.</i> (1998)
UV	$\geq 100,000 \mu\text{w} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$	Nakano <i>et al.</i> (1998)
Ozone-produced oxidants	≥ 1 minute at concentrations of 0.62mg/ l	Nakano <i>et al.</i> (1998)
Sodium hypochlorite	≥ 10 minutes at concentration of 1mg/l	Nakano <i>et al.</i> (1998)
Iodine	≥ 10 minutes at concentrations of 2.5mg/ l	Nakano <i>et al.</i> (1998)
Trimethylammoniummethenechloride	≥ 10 minutes at concentrations of 25mg/ l	Nakano <i>et al.</i> (1998)
Ethyl alcohol	≥ 1 minute at concentrations of 30%	Nakano <i>et al.</i> (1998)
Formalin	≥ 10 minutes at concentrations of 5g/l	Nakano <i>et al.</i> (1998)
pH 3	≥ 60 minutes (25°C)	Chang <i>et al.</i> (1998)
pH 12	≥ 10 minutes (25°C)	Chang <i>et al.</i> (1998)
Duration of WSSV infectivity in sea water	15days (25°C)	Maeda <i>et al.</i> (1998)

び rVP28 (エンベロープタンパク質由来) の経口投与による WSSV 防御効果を明らかにした (Satoh *et al.*, 2008)。経口投与方法は、育成場へ導入する前のウイルスフリーの種苗に WSSV に対する抵抗性を付与する最も現実的で効率的な投与方法である。既に発現タンパク質を経口投与することで WSSV に対する防御反応を誘導した事例は前述の如く *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei* で報告されているが (Namikoshi *et al.*, 2004; Witteveldt *et al.*, 2004, 2006; Jha *et al.*, 2006, 2007), クルマエビにおける検討がなかったことから、本種における防御効果の誘導が確認できたことは意義深い。また、実際の育成環境で頻発するであろう共食いによる水平感染の拡大を想定した経口攻撃試験に対する強い防御効果の誘導についても確認ができた。

第4章において、誘導される WSSV 防御反応の発現時期、持続期間および追加投与の効果について調べた結果、rVPs の経口投与開始から約35~45日後に発現すること、その防御反応の持続期間が10日間程度であるが、rVPs を追加投与することで、防御効果を再度得られることを確認し、効果的な投与スケジュールの設計の可能性を示した (Satoh *et al.*, 2009)。この実験結果のデータによれば、具体的には、発現時期のピークを挟んで前後10日間ほどである程度の防御効果が認められたことから、最初に確認された時点から30~40日間隔で追加投与を行うことで維持できる可能性

が示された。一方、rVP26投与区にホモあるいはヘテロで追加投与した場合、ホモ追加投与区がヘテロ追加投与区に比較して、明らかに高い防御効果が認められた。この結果から、クルマエビに認められる免疫様現象には、改めて特異性と記憶が存在する可能性が考えられた。WSSV の VP26および VP28の抗原特異性については、家兎あるいはマウスを用いた *in vitro* 実験で調べられている。VP28に対する家兎血清は WSSV を中和することが確認されたが (van Hulst *et al.*, 2001), VP26に対するマウス由来の抗血清では WSSV を中和できなかったとされ (Xie and Yang, 2005), 何らかの感染に関わる抗原特異性を示すことが報告されている。クルマエビにおいて観察された、ヘテロ追加投与区で抵抗性が確認されなかったのは、クルマエビが抗原の特異性を認識した可能性が考えられた。今後、クルマエビにおいて免疫抗原に対する記憶や特異性の存在をメカニズムの面から明らかにすることができれば、より効率的な防御効果を誘導できるワクチン開発につながるデータになると考える。

Venegas *et al.* (2000) は、WSSV 感染耐過エビが WSSV 再感染に対し抵抗性を示す現象を「quasi-immune response (免疫様現象)」として説明しているが、これに対し Flegel (2007) は「Accommodation concept (適応概念)」を提唱し、甲殻類のウイルス感染に対する防御機構を説明しようとしている。「Accommodation concept」とは、宿主がウイルスに

対する免疫記憶等の特異的機能を働かせることで、宿主がウイルスの持続感染を許容し (Accommodation: 適応)、結果的にウイルス感染により引き起こされる宿主細胞のアポトーシスが抑制されることで発症を抑えている、宿主と病原ウイルスの相互作用であると説明している (Flegel, 2007)。一般的に脊椎動物ではアポトーシスの一部の働きに、ウイルス感染細胞などの有害化した細胞を除去する生体防御反応が存在するとされる (永田ら, 2003)。事実、WSSV や yellow head disease virus (YHDV) に感染し死亡したウシエビにおいて、アポトーシス細胞が増加していたことが確認され (Wongprasert *et al.*, 2003; Khanobdee *et al.*, 2002), また banana prawn ではアポトーシスに関連するカスパーゼ3プロテアーゼが発見され (Phongdara *et al.*, 2006), アポトーシスがウイルス感染に対するエビ類の生体防御において重要な働きをしていると考えられる。しかし, Wu and Muroga, (2004) は, 免疫様現象による WSSV 感染防御能の誘導の有無に関わらず, WSSV 攻撃により誘導されたクルマエビ体内のアポトーシス細胞数に顕著な差が認められなかったことから, アポトーシスはエビ類の免疫様現象に重要な役割を果たしていないこと述べている。しかし, アポトーシスを起こさない免疫様現象においても抵抗性の付与が液性因子によってもたらされることから (Wu *et al.*, 2002a; Wu and Muroga, 2004), Venegas *et al.* (2000) の発見した免疫様現象を強く支持した。しかし, 免疫様現象を裏付ける血リンパ液中の抗体様物質についての科学的な根拠が薄いことから, その機能解明について興味深いし, 免疫様現象と同様の防御効果を誘導していると推察できるいくつかの報告においても防御効果の機能解明が行われることが大いに期待される。

最後に, 産卵後の受精囊からの WSSV 検出に基づく受精卵の選別とヨード剤を用いた卵消毒とを組み合わせた方法は, 種苗生産過程における WSD 防除対策に有効な方法であることが判明した。しかし, シーズン中にすでに産卵を繰り返している可能性がある夏期に漁獲される親エビにおいて WSSV 検出率の上昇がみられる傾向があることから, 親エビで陽性率が上昇した際には, 必要な受精卵数を確保できず種苗生産が困難になるケースも考えられる。そのためにも, 前述した早い時期 (4~6月) に漁獲される親エビから採卵を行うことも防除対策の一つになると考える。

中南米における *Penaeus vannamei* などの養殖業では IHNV (伝染性皮下造血器壊死症) や TS (タウラ症候群) 等のウイルス病対策として SPR (specific pathogen resistant) 種苗の導入が報告されている

(Lightner and Redman, 1998)。しかし, 放流種苗生産のための親エビは遺伝的多様性も考慮に入れる必要があることから, 放流水域から得られたものが妥当であり, そうすることにより, その水域にしばしば起こり得る疾病の生き残りを親として使用する可能性が高くなる (室賀, 2000)。さらに, 安定した親エビの入手を確実にするためにも, このような天然親エビから得られた種苗からの採卵用親エビの養成技術の開発が強く望まれ, ウイルスフリーの親エビ養成技術が確立されれば, 垂直伝播の防除対策の最も大きな対策となり得るものと考えられる。そして, 本研究で明らかになったように, あらゆる対策を総合的に講じることにより, WSSV 防除を図ることができると言える。

元来, 抗体を持たない無脊椎動物のワクチン開発は無意味であると考えられてきたが, これまでの室賀らの研究により, 感染耐過エビが再感染に対し抵抗性を獲得することなどが解明された (Venegas *et al.*, 1999)。この現象は脊椎動物の免疫現象に極めて類似した反応であり, クルマエビにおいても免疫様現象を利用して WSD の防除技術の開発が十分に可能であると考えられる。これまでに, クルマエビにおいては, WSD への防御反応を組換え大腸菌発現の WSSV タンパク質の筋肉注射投与によって誘導できることが報告されているが (Namikoshi *et al.*, 2004), 本研究では, 実用性に優れた, 組換えタンパク質の経口投与による WSSV 防御効果を明らかにし (Satoh *et al.*, 2008), さらに誘導される防御反応の発現時期および持続期間について明らかにした (Satoh *et al.*, 2009)。今後は, この反応の機序の解明に関しても基礎データの収集を目的に実験に着手し, これらの研究から得られる免疫様現象を利用した防除に関する基礎データを応用し, 増養殖過程におけるより積極的な WSSV 防除対策の構築を目指したいと考えている。

謝 辞

本論文をとりまとめるにあたり, 終始懇切なるご指導とご助言そして本稿の校閲を賜った北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物学分野教授 吉水 守 博士に深甚なる謝意を表します。本研究を遂行するにあたり, 旧日本栽培漁業協会当時からこれまでにわたり, 実験計画の詳細な検討など終始懇切なるご指導ならびに本稿の校閲を賜った北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物学分野准教授 西澤豊彦博士 (現韓国国立全南大学校水産生命医学科教授) に厚く感謝の意を表します。また, 本論文の校閲の労を賜った北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物学分野教授 五嶋聖

治博士, 同海洋生物工学分野准教授 笠井久会博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり, 旧日本栽培漁業協会において当時の広島大学生物生産学部教授の 室賀清邦博士に共同研究者として有益な御助言を賜った。ここに記して感謝の意を表します。

本研究の機会を与えていただき, 多くの便宜をはかっていただいた独立行政法人水産総合研究センターの古澤 徹 元理事, 今村茂生元理事, 増養殖研究所 元所長 酒井保次博士, 前所長 中野 広博士, 現所長・元病害防除部長 飯田貴次博士, 前業務推進部長 杜多 哲博士, 業務推進部長 伊藤文成博士, 前病害防除部長 佐野元彦博士, 病害防除部長 乙竹 充博士に深謝の意を表します。

当初より本研究テーマに関わるチャンスを与えていただき, 種々のご指導ご協力を頂くとともに当初より暖かい激励を頂いた水産総合研究センターの増養殖研究所 資源生産部長 有元 操博士, 西海区水産研究所 まぐろ増養殖研究センター長 虫明敬一博士に心からお礼を申し上げます。

本研究にあたり, 種々のご指導ご協力を頂きました増養殖研究所 病害防除部 種苗期疾病研究グループの池田和夫元グループ長, 同 元栽培技術開発センター 栽培技術研究グループ長 渡辺研一博士 (現東京農業大学教授), 同 元栽培技術開発センター 栽培技術研究グループ主任技術開発員 照屋和久博士 (現西海区水産研究所亜熱帯研究センター生産技術グループ長), 同 病害防除部 種苗期疾病研究グループ主任技術開発員 森 広一郎博士 (現本部研究推進部 研究開発コーディネーター), 同栽培技術開発センター 栽培技術研究グループ 菅谷琢磨博士 (現中央水産研究所 水産遺伝子解析センター 主任研究員) に厚くお礼申し上げます。また, 元 五島栽培漁業センターの 服部圭太場長 (現本部研究推進部研究開発コーディネーター) ならびに元上浦栽培漁業センター場長 岡 雅一博士 (現西海区水産研究所 まぐろ増養殖研究センター 成熟制御グループ長) をはじめとする職員諸氏には, 絶大なるご協力を頂き, 厚くお礼を申し上げます。

最後になりましたが, 種苗生産現場で早朝から深夜まで, 時には炎天下での作業, 毎回100検体を越える検査業務等の共同作業を行った当時志布志栽培漁業センターの 今泉圭之輔主幹場長, 岩本 浩専任技術員, 加治俊二主任技術員 (現増養殖研究所 養殖技術部 健苗生産研究グループ長), 西 明文当時技術員 (現西海区水産研究所奄美庁舎まぐろ増養殖研究センター 種苗量産グループ研究員), 技術員 濱田和久博士 (現増養殖研究所養殖システム部養殖実証研究グループ

長), 山元栄一氏, 元上浦栽培漁業センターの西岡豊弘主任技術員 (現増養殖研究所 魚病診断・研修センター主任研究員), 元古満目栽培漁業センターの 今泉均技術員 (現増養殖研究所養殖技術部ウナギ量産研究グループ主任研究員) および 由利ゆかり氏, 榎谷恵子氏, 吉岡康美氏, 山路郁子氏, 上甲美保氏, 萩原ひとみ氏, ならびに 東田香織氏の臨時職員の方々にご利用よりお礼申し上げます。

文 献

- Amend, D.F., 1981. Potency testing of fish vaccines. In: Anderson, D. P., Hennessen, W. (Eds.) *Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines*. S Karger Basel, pp. 447-454.
- Chakrabarty, A., Otta, S.K., Joseph, B., Kumar, S., Hossain, M.S., Karunasagar, I., Venugopal, M.N., Karunasagar, I., 2002. Prevalence of white spot syndrome virus in wild crustaceans along the coast of India. *Current Science*, **82**, 1392-1397.
- Chang, P.S., Chen, H.C., Wang, Y.C., 1998a. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture*, **164**, 233-242.
- Chang, P.S., Chen, H.C., Wang, Y.C., 1998b. Development and evaluation of a dot blot analysis for the detection of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon*. *Fish Pathol.*, **33**, 45-52.
- Chen, L.L., Leu, J.H., Huan, C.J., Chou, C.M., Chen, S.M., Wang, C.H., Lo, C.F., Kou, G.H., 2002a. Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for targeting VP35 to the nuclei of transfected insect cells. *Virology*, **293**, 44-53.
- Chen, Z.L., Wan, C.S., Shin, H.H., 2002b. An assay for quantification of white spot syndrome virus using a capture ELISA. *J Fish Dis.*, **25**, 249-251.
- Cheng, W.T., Liu, C.H., Tsai, C.H., Chen, J.C., 2005. Molecular cloning and characterization of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.*, **18**, 297-310.
- Chou, H.Y., Huang, C.Y., Wang, C.H., Chiang, H.C.,

- Lo, C.F., 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis Aquat Org.*, **23**, 165-173.
- Cominetti, M.R., Marques, M.R.F., Lorenzini, D.M., Lofgren, S.E., Daffre, S., Barracco, M.A., 2002. Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Dev Comp Immunol.*, **26**, 715-721.
- Corbel V, Zuprizal SZ, Huang C, Sumartono AJM, Bonami JR, 2001. Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *J. Fish Dis.*, **24**, 377-382.
- de la Peña, L.D., Tamaki, T., Momoyama, K., Nakai, T., Muroga, K. (1993) : Characteristic of the causative bacterium of vibriosis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, **115**, 1-12.
- de la Peña, L.D., Koube, H., Nakai, T., Muroga, K., 1995. Dynamics of *Vibrio* sp. PJ in organs of orally infected kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, **30**, 39-45.
- Edgerton, B.F., 2004. Susceptibility of the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor* albidus to white spot syndrome virus (WSSV). *Dis Aquat Organ.*, **59**, 187-193.
- 江草周三, 高橋幸則, 伊丹利明, 桃山和夫, 1988. クルマエビのビブリオ病の病理組織学的研究. 魚病研究, **23**, 59-65.
- 江草周三, 若林久嗣, 室賀清邦, 2004. 魚介類の感染症・寄生虫病. 恒星社厚生閣, 東京, pp. 229-233.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., 2005. Virus Taxonomy. Classification and nomenclature on the taxonomy of viruses. Eighth report of the international committee on the taxonomy of viruses. Virology division international union of microbiological societies. elsevier academic press, 187-192.
- Flegel, T.W., 1997. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **13**, 433-442.
- Flegel, T.W., 2007. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. *Dev Comp Immunol.*, **31**, 217-231.
- Hameed, A.S., Balasubramanian, G., Musthaq, S.S., Yoganandhan, K., 2003. Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV). *Dis Aquat Organ.*, **57**, 157-161.
- Hossain, M.S., Chakraborty, A., Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, I., 2001. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. *Aquaculture*, **198**, 1-11.
- Huang, J., Song, X.L., Yu, J., Yang, C.H., 1995. Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis: study on the pathogen and pathology of the explosive epidemic disease of shrimp. *Mar. Fish. Res.*, **16**, 1-10.
- 藤永元作, 1935. クルマエビの研究 第一報. 早稲水産研究所報告, **1**, 1-51.
- Hudinaga, M., 1942. Reproduction, development and rearing of *Penaeid japonicus*, Bate. *Jap J Zool.*, **1**, 305-393. pls 16-46.
- 畑井喜司雄, 古谷航平, 江草周三, 1978. 養殖クルマエビの鰓黒病起因真菌に関する研究 - I, BG-Fusarium の分離および同定. 魚病研究, **12**, 219-224.
- 畑井喜司雄, 江草周三, 1978. 養殖クルマエビの鰓黒病起因真菌に関する研究 - II . BG-Fusarium に関する2, 3の知見. 魚病研究, **12**, 225-231.
- 本尾 洋, 1988. クルマエビ属 (I . 生態・成熟). エビ・カニ類の種苗生産 (水産学シリーズ No. 71平野礼次郎編) 恒星社厚生閣, 東京, pp. 9-27.
- 浜崎活幸, 北田修一, 2005. クルマエビの放流効果—現状と課題—, 栽培技研, **33**, 27-43.
- Ishimaru, K., Matsushita, M.A., Muroga, K., 1995. *Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of kuruma prawns (*Penaeus japonicus*). *Int J Syst Bacteriol.*, **45**, 134-138.
- 井上 潔, 三輪 理, 大迫典久, 中野平二, 木村武志, 桃山和夫, 平岡三登里, 1994. 1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死: 電顕観察による原因ウイルスの検出. 魚病研究, **29**, 149-158
- Inouye, K., Yamano, K., Ikeda, N., Kimura, T., Nakano, H., Momoyama, K., Kobayashi, J., Miyajima, S., 1996. The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathol.*, **31**, 39-45
- Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K.,

- Nakagawa, A., Takeo, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M., Takahashi, Y., 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*, **64**, 277-288.
- Jha, R.K., Xu, X.R., Shen, J., Bai, S.J., Sun, J.Y., Li, W.F., 2006. The efficacy of recombinant vaccines against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii*. *Immunology letters*, **105**, 68-76.
- Jha, R.K., Xu, Z.R., Bai, S.J., Sun, J.Y., Li, W.F., Shen, J., 2007. Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using recombinant oral vaccine expressed. *Fish Shellfish Immunol.*, **22**, 295-307.
- Jiravanichpaisal, P., Bangyeekhun, E., Söderhäll, K., Söderhäll, I., 2001. Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Dis Aquat Organ.*, **47**, 151-7
- Karunasagar, Indrani., Otta, S.K., Karunasagar, Iddya., 1997. Hostopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. *Aquaculture*, **153**, 9-13.
- Khanobdee, K., Soowannayan, C., Flegel, T.W., Ubol, S., Withyachumnarnkul, B., 2002. Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. *Dis Aquat Org.*, **48**, 79-90.
- 木村武志, 山野恵祐, 中野平二, 桃山和夫, 平岡三登里, 井上 潔, 1996. PCR 法による PRDV の検出. 魚病研究, **31**, 93-98.
- 橘高二郎, 隆島忠夫, 金澤昭夫, 1996. エビ・カニ類の増養殖 基礎科学と生産技術. 恒星社厚生閣, 東京, p.1.
- 倉田 博, 1986. クルマエビ幼生の発育段階区分と名称. クルマエビ栽培漁業の手引き (さいばい叢書 No. 1). 日本栽培漁業協会, 東京, pp. 286-287.
- 笠井久会, 渡辺研一, 吉水 守, 2001. 流水式海水電解装置による飼育排水の殺菌, 日水誌., **67**, 222-225.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lan, Y., Lu, W., Xu, X., 2002. Genomic instability of prawn white spot bacilliform virus (WSBV) and its association to virus virulence. *Virus Res.*, **90**, 269-274.
- Lee, S.Y., Soderhall, K., 2002. Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shellfish Immunol.*, **12**, 421-437.
- Li, Q., Zhang, J., Chen, Y., Yang, F., 2003. White spot syndrome virus (WSSV) infectivity for *Artemia* at different developmental stages. *Dis Aquat Org.*, **57**, 261-264.
- Lightner, D. V., 1996. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Special Publication of the World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. p. 304.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., 1998. Strategies for the control of viral disease of shrimp in the Americas. *Fish Pathol.*, **33**, 165-180.
- Lo, C.F., Leu, J.H., Ho, C.H., Chen, C.H., Peng, S.E., Chen, Y.T., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Huang, C.J., Chou, H.Y., Wang, C.H., Kou, G.H., 1996a. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis Aquat Org.*, **25**, 133-141.
- Lo, C.F., Ho, C.H., Peng, S.E., Chen, C.H., Hsu, H.C., Chiu, Y.L., Chang, C.F., Liu, K.F., Su, M.S., Wang, C.H., Kou, G.H., 1996b. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis Aquat Org.*, **27**, 215-225.
- Lo, C.F., Ho, C.H., Chen, C.H., Liu, K.F., Chiu, K.Y., Yeh, P.Y., Peng, S.E., Hsu, H.C., Liu, H.C., Chang, C.F., Su, M.S., Wang, C.H., Koh, G.H., 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis Aquat Org.*, **30**, 53-72.
- Luo, T., Yang, H.J., Li, F., Zhang, X.B., Xu, X., 2006. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol.*, **30**, 607-617.
- Maeda, M., Itami, T., Furumoto, A., Hennig, O., Imamura, T., Kondo, M., Hirono, I., Aoki, T.,

- Takahashi, Y., 1998. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) in wild-caught shrimp and other crustaceans. *Fish Pathol.*, **33**, 373-380.
- Miyazaki, T., Yamaguchi, K., Yasumoto, S., Takahashi, Y., 2008. Electron microscopy on the heart of kuruma prawn *Penaeus japonicus* artificially infected with penaeid rod-shaped DNA virus. *Fish Pathol.*, **43**, 97-105.
- 宮島義和, 松本 淳, 1996. 人工養成クルマエビを用いた生検法による採卵用親エビの成熟度判定と効率的な採卵方法. 栽培技研, **25**, 37-40.
- 三宅貞祥, 1982. 原色日本大型甲殻類図鑑 (I). 保育社, 大阪, p.6.
- 桃山和夫, 1981. クルマエビの伝染性中腸腺壊死症に関する研究 - I, 発生状況および症状. 山口県内海水産試験場報告, **8**, 1-11.
- 桃山和夫, 1990. 数種消毒剤のクルマエビの受精卵およびノウブリウスに対する毒性. 山口県内海水産試験場報告, **18**, 50-54.
- 桃山和夫, 平岡三登里, 中野平二, 川辺 博, 井上 潔, 大迫典久, 1994. 1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死. 病理組織観察. 魚病研究, **29**, 141-148.
- Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K., Kimura, T., Nakano, H., 1995. Diagnostic techniques of the rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, **30**, 263-269.
- Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K., Kimura, T., Nakano, H., Yasui, M., 1997. Mass mortalities in the production of juvenile greasyback shrimp, *Metapenaeus ensis*, caused by penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathol.*, **32**, 51-58.
- Momoyama K, 2003. Detection of white spot syndrome virus (WSSV) from small penaeid shrimp species caught in the western Seto Inland Sea. *Fish Pathol.*, **38**, 81-85.
- 桃山和夫, 谷村利克, 2004. クルマエビ受精卵のヨード消毒による PAV の予防. 山口県水産研究センター研究報告, **2**, 117-123.
- 桃山和夫, 室賀清邦, 2005. 日本の養殖クルマエビにおける病害問題. 魚病研究, **40**, 1-14.
- 虫明敬一, 有元 操, 佐藤 純, 森広一郎, 1998. 天然クルマエビ成体からの PRDV の検出. 魚病研究, **33**, 503-509.
- Mushiake, K., Shimizu, K., Satoh, J., Mori, K., Arimoto, M., Ohsumi, S., Imaizumi, K., 1999. Control of penaeid acute viremia (PAV) in *Penaeus japonicus*: selection of eggs based on the PCR detection of the causative virus (PRDV) from Receptaculum seminis of spawned broodstock. *Fish Pathol.*, **34**, 203-207.
- 室賀清邦, 2000. 疾病防疫の面から見た放流用種苗生産のあり方 (総説). 栽培技研, **28**, 39-45.
- 中野平二, 河邊 博, 梅沢 敏, 桃山和夫, 平岡三登里, 井上 潔, 大迫典久, 1994. 1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死: 発生状況および感染実験. 魚病研究, **29**, 135-139.
- 中野平二, 平岡三登里, 鮫島 守, 木村武志, 桃山和夫, 1998. クルマエビ類の急性ウイルス血症 (PAV) の原因ウイルス PRDV の不活化. 魚病研究, **33**, 65-71.
- 永田和宏, 宮坂昌之, 宮坂信之, 山本和彦, 2003. 分子生物学・免疫学 キーワード辞典 第2版. 医学書院, 東京, pp. 44-45.
- Namikoshi, A., Wu, J.L., Yamashita, T., Nishizawa, T., Nishioka, T., Arimoto M., Muroga, K., 2003. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture*, **229**, 23-25.
- Natividad, C.D.T., Hagio, M., Tanaka, M., Nomura, N., Matsumura, M., 2007. White spot syndrome virus (WSSV) inactivation in *Penaeus japonicus* using purified monoclonal antibody targeting viral envelope protein. *Aquaculture*, **269**, 54-62.
- Nonaka, L., Venegas, C.A., Nishizawa, T., Muroga, K., 1998. A method for nucleic acid extraction from kuruma prawn for PCR detection of PRDV (Penaeid rod-shaped DNA virus). *Fish Pathol*, **33**, 115-121.
- 日本規格協会編, 2005. JIS ハンドブック 53 環境測定 II 水質. 日本規格協会, 東京, pp. 668-669.
- Peng, B., Ren, J., Shen, J., Zhou, G., Gu, H., Shen, Y., Zheng, G., Gong, Z., 1995. The studies on baculovirus-caused disease of prawns (*Penaeus chinensis*) in Shanghai suburb. *Chinese J Virol.*, **11**, 151-157.
- Phongdara, A., Wanna, W., Chotigeat, W., 2006. Molecular cloning and expression of caspase from white shrimp *Penaeus merguensis*. *Aquaculture*, **252**, 114-120.
- Poulos, B.T., Pantoja, C.R., Bradley-Dunlop, D., Aguilar, J., Lightner, D.V., 2001. Development

- and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org.*, **47**, 13-23.
- Pramod, K.R.B., Rajendran, K.V., Jung, S.J., Oh, M.J., 2002. Experimental susceptibility of different life-stage of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), to white spot syndrome virus (WSSV). *J Fish Dis.*, **25**, 201-207.
- Rajendran, K.V., Vijayan, K.K., Santiago, T.C., Krol, R.M., 1999. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from India. *J Fish Dis.*, **22**, 183-191
- Rodriguez, J., Bayot, B., Amano, Y., Panchana, F., de Blas, I., Alday, V., Calderon, J., 2003. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. *J. Fish Dis.*, **26**, 439-450.
- Romo-Figueroa, M.G., Vargas-Requena, C., Sotelo-Mundoa, R.R., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I., Soderhall, K., Yepiz-Plascencia, G., 2004. Molecular cloning of a beta-glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure. *Dev Comp Immunol.*, **28**, 713-726.
- Roux, M.M., Pain, A., Klimpel, K.R., Dhar, A.K., 2002. The lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virusinfected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *J Virol.*, **76**, 7140-7149.
- 水産庁養殖研究所病理部・熊本県水産研究センター, 1996. PCR による PRDV (RV-PJ) の検出法 (平成 8 年度魚病技術者研修魚病専修コース研修用資料) 日本水産資源保護協会, 東京, pp.1-8.
- 水産庁・水産総合研究センター・全国豊かな海づくり推進協会, 2008. 平成18年度栽培漁業種苗生産, 入手・放流実績 (全国). p. 8.
- Sakai, T., Hirae, T., Yuasa, K., Kamaishi, T., Matsuyama, T., Miwa, S., Oseko, N., 2007. Mass mortality of cultured kuruma prawn *Penaeus japonicus* caused by *Vibrio nigripulchritudo*. *Fish Pathol.*, **42**, 141-147.
- Sano, T., Nishimura, T., Oguma, K., Momoyama, K., Takeo, N., 1981. Baculovirus infection of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* in Japan. *Fish Pathol.*, **15**, 185-191.
- 佐藤 純, 虫明敬一, 森広一郎, 有元 操, 今泉圭之輔, 西澤豊彦, 室賀清邦, 1999. クルマエビの種苗生産過程における PAV の発生状況. 魚病研究, **34**, 33-38.
- Satoh, J., Mushiake, K., Mori, K., Arimoto, M., Imaizumi, K., 2001. Control of penaeid acute viremia (PAV) in seed production of *Penaeus japonicus*. *Bull Natl Res Inst Aquacult.*, Suppl **5**, 95-99.
- 佐藤 純, 虫明敬一, 森広一郎, 有元 操, 今泉圭之輔, 2003. 種苗生産過程におけるクルマエビの急性ウイルス血症 (PAV) の防除対策. 栽培技研, **30**, 101-109.
- Satoh, J., Nishizawa, T., Yoshimizu, M., 2008. Protection against white spot syndrome virus (WSSV) infection in kuruma shrimps orally vaccinated with WSSV rVP26 and rVP28. *Dis Aquat Org.*, **82**, 89-96.
- Satoh, J., Nishizawa, T., Yoshimizu, M., 2009. Duration and booster effect of phylactic response against white spot syndrome virus infection in kuruma shrimp orally administered with recombinant viral proteins, rVP26 and rVP28. *Fish Pathol.*, **44**, 120-127.
- Shi, Z., Huang, C., Zhang, J., Chen, D., Bonami, J.R., 2000. White spot syndrome virus (WSSV) experimental infection of the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *J Fish Diseases.*, **23**, 285-288.
- Soto, M.A., Lotz, J.M., 2001. Epidemiological parameters of white spot syndrome virus infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. *J Invertebr Pathol.*, **78**, 9-15.
- Sritunyalucksana, K., Sithisarn, P., Withayachumnarnkul, B., Flegel, T.W., 1999. Activation of prophenyloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. *Fish Shellfish Immunol.*, **9**, 21-30.
- Sritunyalucksana, K., Lee, S.Y., Soderhall, K., 2002. A beta-1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol.*, **26**, 237-245.

- Sung, H.H., Kou, G.H., Song, Y.L., 1999. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.*, **29**, 11-17.
- Supamattaya, K., Hoffmann, R.W., Boonyaratpalin, S., Kanchanaphum, P., 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. *Dis Aqua Org.*, **32**, 79-85.
- 高橋幸則, 山下泰正, 桃山和夫, 1985. 養殖クルマエビから分離された *Vibrio* 属細菌の病原性ならびに性状. *日水誌*, **51**, 721-730.
- 高橋幸則, 伊丹利明, 近藤昌和, 1995. 甲殻類の生体防御機構. *魚病研究*, **30**, 141-150.
- Takahashi, Y., Itami, T., Maeda, M., Suzuki, N., Kasornchandra, J., Supamattaya, K., Khongpradit, R., Boonyaratpalin, S., Kondo, M., Kawai, K., Kusuda, R., Hirano, I., Aoki, T., 1996. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricius. *J Fish Dis.*, **19**, 399-403.
- Takahashi, Y., Itami, T., Maeda, M., Kondo, M., 1998. Bacterial and viral disease of kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) in Japan. *Fish Pathol.*, **33**, 357-364.
- Takahashi, Y., Kondo, M., Itami, T., Honda, T., Inagawa, H., Nishizawa, T., Soma, G., Yokomizo, Y., 2000. Enhancement of disease resistance against penaeid acute viremia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS). *Fish Shellfish Immunol.*, **10**, 555-558.
- Takahashi, Y., Fukuda, K., Kondo, M., Chongthaleong, A., Nishi, K., Nishimura, M., Ogata, K., Shinya, I., Takise, K., Fujishima, K., Matsumura, M., 2003. Detection and prevention of WSSV infection in cultured shrimp. *Asian Aquaculture Magazine* November/December, pp. 25-27.
- Tapay, L.M., Lu, Y., Gose, R.B., Nadala, J.E.C.B., Brock, J.A., Loh, P.C., 1997. Development of an in vitro quantal assay in primary cell culture for a non-occluded baculo-like virus of penaeid shrimp. *J Virol Methods.*, **64**, 37-41.
- Teunissen, O.S.P., Faber, R., Booms, G.H.R., Latscha, T., Boon, J.H., 1998. Influence of vaccination on vibriosis resistance of giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture*, **164**, 359-366.
- Tsai, J.M., Wang, H.C., Leu, J.H., Wang, A.H.J., Zhuang, Y., Walker, P.J., Kou, G.H., Lo, C.F., 2006. Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *J Virol.*, **80**, 3021-3029.
- Venegas, C.A., Nonaka, L., Mushiake, K., Shimizu, K., Nishizawa, T., Muroga, K., 1999. Pathogenicity of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) to kuruma prawn in different developmental stages. *Fish Pathol.*, **34**, 19-23.
- Venegas, C.A., Nonaka, L., Mushiake, K., Nishizawa, T., Muroga, K., 2000. Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Dis Aquat Org.*, **42**, 83-89.
- van Hulten, M.C.W., Westenberg, M., Goodall, S.D., Vlak, J.M., 2000. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology*, **266**, 277-236.
- van Hulten, M.C.W., Goldbach, R.W., Vlak, J.M., 2000. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. *J Gen Virol.*, **81** : 2525-2529.
- van Hulten, M.C.W., Witteveldt, J., Snippe, M., Vlak, J.M., 2001. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology*, **285**, 228-233.
- Vaseeharan, B., Anand, T.P., Murugan, T., Chen, J.C., 2006. Shrimp vaccination trials with the VP292 protein of white spot syndrome virus. *Lett Appl Microb.*, **43**, 137-142.
- Wang, C.S., Tsai, Y.J., Kou, G.H., Chen, S.N., 1997. Detection of white spot disease virus infection in wild-caught greasy back shrimp, *Metapenaeus ensis* (de Haan) in Taiwan. *Fish Pathol.*, **32**, 35-41.
- Wang, Y.C., Lo, C.F., Chang, P.S., Kou, G.H., 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture*, **164**, 221-231

- Wangteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tssanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W., 1995. Anon-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org.*, **21**, 69-77.
- Witteveldt, J., Vlak, J.M., van Hulten MCW., 2004a. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. *Fish Shellfish Immunol* **16**, 571-579
- Witteveldt, J., Cifuentes, C.C., Vlak, J.M., van Hulten, M.C.W., 2004b. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *Journal of Virology*, **78**, 2057-2061.
- Witteveldt, J., Vlak, J.M., van Hulten, M.C.W., 2006. Increased tolerance of *Litopenaeus vannamei* to white spot syndrome virus (WSSV) infection after oral application of the viral envelope protein VP28. *Dis Aquat Org.*, **70**, 167-170.
- Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W., 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org.*, **2**, 69-77.
- Wongprasert, K., Khanobdee, K., Glunukarn, S.S., Meeratana, P., Withyachumnarnkul, B., 2003. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus. *Dis Aquat Org.*, **55**, 3-10.
- Wu, J.L., Namikoshi, A., Nishizawa, T., Mushiake, K., Teruya, K., Muroga, K., 2001. Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Dis Aquat Org.*, **47**, 129-135.
- Wu, J.L., Nishioka, T., Mori, K., Nishizawa, T., Muroga, K., 2002. A time-course study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, **13**, 391-403.
- Wu, J.L., Muroga, K., 2004. Apoptosis does not play an important role in the resistance of "immune" *Penaeus japonicus* against white spot syndrome virus. *J Fish Dis.*, **27**, 15-21.
- Xie, X., Yang, F., 2005. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology*, **336**, 93-99.
- Yan, D.C., Dong, S.L., Huang, J., Yu, X.M., Feng, M.Y., Liu, X.Y., 2004. White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. *Dis Aquat Org.*, **59**, 69-73.
- Yan, D.C., Dong, S.L., Huang, J., Zhang, J.S., 2007. White spot syndrome virus (WSSV) transmission from rotifer inoculum to crayfish. *J Invertebr Pathol.*, **94**, 144-148.
- Yang, F., He, J., Lin, X., Li, Q., Pan, D., Zhang, X., Xu, X., 2001. Complete genome sequence the shrimp white spot bacilliform virus. *J Virol.*, **75**, 11811-11820.
- Yang, L.S., Yin, Z.X., Liao, J.X., Huang, X.D., Guoa, C.J., Weng, S.P., Chanc, S.M., Yu, X.Q., Hea, J.G., 2007. A Toll receptor in shrimp. *Molecular Immunol.*, **244**, 1999-2008.
- You, Z., Nadala, E.C.B., Yang, J., van Hulten, M.C.W., Loh, P.C., 2002. Production of polyclonal antiserum specific to the 27.5kDa envelope protein of white spot syndrome virus. *Dis Aquat Org.*, **51**, 77-80.
- Zhan, W.Z., Wang, Y.H., Fryer, J.L., Okubo, K., Fukuda, H., Yu, K., Meng, Q.X., 1999. Production of monoclonal antibodies (Mabs) against white spot syndrome virus (WSSV). *J Aquat Anim Health.*, **11**, 17-22.
- Zhang, J.S., Dong, S.L., Tian, X.L., Dong, Y.W., Liu, X.Y., Yan, D.C., 2006. Studies on the rotifer (*Brachionus urceus* Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Aquaculture*, **261**, 1181-1185.