水研機構研報，第48号，1－60，平成31年
Bull. Jap. Fish. Res. Edu. Agen., No. 48, 1-60, 2019

博士論文

海産魚の種苗生産過程に発生するウイルス性神経壊死症の防除に関する研究*[1]

西岡　豊弘*[2]

Studies on the control measures of viral nervous necrosis (VNN) in seed production process of marine fish

Toyohiro NISHIOKA*[2]

Abstract: Stock enhancement to increase fishery production has been recognized worldwide as the most useful fishery-management program. For almost 50 years in Japan, government- and prefecture-based marine hatcheries have played a key role in production of seed (juveniles of fish and shellfish) to ensure a source for release to the marine environment. However, mass mortalities have occurred in produced larvae and juveniles at high frequency, and particularly microbial infection has been regarded as a major hindrance to the stable production of seeds.

The present study focused on viral nervous necrosis (VNN), which has caused a great deal of damage in the seed production process for the last three decades worldwide. The causative agent, piscine nodavirus (genus *Betanodavirus*, family *Nodaviridae*), is non-enveloped and icosahedral in shape (about 25 nm in diameter) with two positive-sense single-stranded RNAs; RNA1 (3.1 kb) encodes the replicase and RNA2 encodes the coat protein. Currently, betanodaviruses are classified into four genotypes: SJNNV, RGNNV, TPNNV, and BFNNV. SJNNV (the type species of the genus *Betanodavirus*) was originally isolated from diseased striped jack (*Pseudocaranx dentex*) larvae and RGNNV has been most frequently isolated from diseased warm-water fishes.

In the present study, I examined VNN in fish species attracting attention as new targets at marine hatcheries and aquaculture facilities in Japan, with special reference to potential control measures for the disease. These fish include red spotted grouper (*Epinephelus akaara*), red tilefish (*Branchiostegus japonicus*), bluefin tuna (*Thunnus orientalis*), and striped jack.

Chapter 1：Firstly, I described activities of marine fish farming and aquaculture in Japan as a background of this study, and then summarized major disease problems caused by a variety of viruses, bacteria, fungi, and parasites that severely afflicted the seed production activity. Particular attention was paid to VNN and the major detrimental impact on fish production, with previously reported findings on control measures of the disease.

Chapter 2：In this chapter, I first analyzed the status of the seed production in target species based on the data in the annual reports from 1984 to 2009 by the Japan Sea Farming Association (JASFA). The association was recently integrated with Japan's Fisheries Research and Education Agency (FRA). During this period, the total seed production amounts began to decline in 2000 and onwards, but the number of target species did not substantially change and more than 1 million individual juveniles were produced in 16 species of fish, 8 species of crustaceans, and 18 species of other shellfish. Next, I summarized mass mortality cases from 2000 to 2009, based on reports by JASFA and the council collecting information about disease

2018年10月26日受理（Accepted on October 26, 2018）
*[1]　広島大学審査学位論文（掲載するに際し投稿規定に沿って一部修正した）
*[2]　国立研究開発法人水産研究・教育機構 増養殖研究所 魚病研究センター上浦庁舎　879-2602 大分県佐伯市上浦大字津井浦
（Kamiura Laboratory, Research Center for Fish Diseases, National Research Institute of Aquaculture, National Research and Development Agency, Japan Fisheries Research and Education Agency, Saiki, Oita, 879-2602, Japan）

outbreaks in national and prefectural hatcheries. Viral, bacterial, fungal, and parasitic diseases accounted for 26%, 37%, 8%, and 12% of the reported cases, respectively, with 17% of unknown cause. While the incidence of viral and fungal diseases decreased compared with those in the previous period (1989 to 1999), bacterial and parasitic diseases increased particularly in newly targeted fish species for aquaculture. Diseases such as VNN, red sea bream iridoviral disease, gliding bacterial disease, bacterial abdominal swelling, vibriosis, bacterial enteritis, scuticociliatosis, and crustacean fungal diseases were reported continuously, as were in 1989 to 1999. Among them, VNN outbreaks have occurred in 21 fish species of 5 orders and particularly for over 10 years in redspotted grouper, kelp grouper (*Epinephelus moara*), striped jack, and Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Thus, VNN is considered as a serious menace to stable seed production.

Chapter 3：Control measures against VNN in redspotted grouper was examined. Redspotted grouper is an important species in the stock enhancement program of marine fish in Japan because of its migration behavior within relatively limited area. In this species, VNN outbreaks have been reported for over 11 years. Incidence of VNN at the larval stage decreased by disinfecting the fertilized eggs with iodine and/or ultraviolet radiation-treated seawater. However, subsequent mortalities at juvenile and older stages before release to the open water were not entirely prevented, mainly due to lack of knowledge on the infection route. In the present study, I detected the betanodavirus (RGNNV) gene by RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) in apparently healthy juveniles of redspotted grouper that survived after VNN occurrence at a hatchery (Tamano Laboratory, Okayama pref., FRA). Furthermore, retina and brain samples of adult redspotted grouper (n=132) collected from four Japanese sea waters were 4.5% and 33.3% positive for a betanodavirus RGNNV by RT-PCR and nested PCR, respectively, although the detection rates of virus varied fairly depending on captured waters. This suggests that wild redspotted grouper as broodstock candidates are subclinically infected with RGNNV at high rates. Experimental pathogenicity test demonstrated that RGNNV isolates from the wild fish were highly pathogenic to juvenile redspotted grouper. Based on these findings, I proposed the following measures to prevent VNN of redspotted grouper at hatchery; broodstock candidates should be introduced from sea area where fish were betanodavirus-free or at lower infection rates, and reared for short period and spawned under less stressful conditions. Electrolizer-treated seawater is preferable to disinfect the fertilized eggs.

Chapter 4：VNN of Japanese red tilefish, which is a particularly important species in coastal fishery because of its very high commercial value, was targeted in this study. In winter of 2004, juveniles produced in a hatchery (Miyazu Laboratory, Kyoto pref., FRA) exhibited abnormal swimming behavior, circling either at the surface of the water or the bottom prior to death. Based on histopathological, immunological and virological examinations of the affected fish, it was concluded that this was caused by betanodavirus RGNNV infection; this is the first record of VNN in red tilefish. An epidemiological examination to determine the infection source of the virus was performed using the PCR-based methods and revealed that wild-caught red tilefish were highly infected with the virus, suggesting that these broodstocks are the most probable source of infection into the produced juveniles. For the prevention of VNN, PCR-negative broodstocks were selected for artificial insemination, and the fertilized eggs were disinfected with electrolyzer-treated seawater and fish were reared in the treated water. As the result, RGNNV was not detected from produced larvae and juveniles by PCR, and no VNN occurred in red tilefish seed productions from 2005 to 2009 at the hatchery.

Chapter 5：Pacific bluefin tuna is a species that has attracted interest in view of both stock enhancement and aquaculture worldwide. In this species, however, seed production technology has not yet been fully established; thus, there is substantial depletion in juveniles. Amami Laboratory (Kagoshima pref.) of FRA has experienced mass mortalities at larval stages of this

species in the process of seed production since around 2000. In some cases of the mortalities, but not all cases, the diseased fish showed abnormal swimming behavior characteristic to VNN and a betanodavirus (RGNNV genotype) was detected in the affected fish, suggesting that VNN can be a cause of larval mortality of Pacific bluefin tuna. This is the first record of VNN in larval Pacific bluefin tuna. In epidemiological investigations, RGNNV was detected by PCR in wild juveniles, aquaculture broodstocks, fertilized eggs, and larvae, suggesting a vertical viral transmission from broodstocks. Because adult bluefin tuna are extremely large to handle, they cannot be subjected to virus screening by PCR-based methods as other fish species. Therefore, I concentrated my research on practical methods for disinfection of fertilized eggs and rearing waters, and showed that use of electrolyzer-treated water decreased VNN occurrences at larval stages and increased the number of produced juveniles. As a future subject, improvement of spawning methods is required to reduce viral propagation in fish.

Chapter 6: VNN of larval striped jack has long been successfully controlled by the established methods; elimination of virus-carrying broodstocks and disinfection of fertilized eggs and rearing waters. However, a VNN case of striped jack larvae happened in a hatchery (Kamiura Laboratory, Oita pref., FRA) where the broodstocks, previously proved to be betanodavirus-free, were reared using disinfected seawater, but frozen wild fish were routinely used as supplementary feed for the broodstocks. Epidemiological investigations to estimate the infection route of this VNN case revealed that a betanodavirus SJNNV was detected in 55% of frozen samples of wild Japanese jack mackerel (*Trachurus japonicus*) kept as feed for broodstocks. A virus isolate (05SaiJJM-3) from feed fish exhibited almost same pathogenicity as a representative SJNNV (SJNag93) from diseased larval striped jack against larvae of both Japanese jack mackerel and striped jack which had been artificially produced in the Kamiura Laboratory. These results suggest that wild Japanese jack mackerel was a virus source to striped jack larvae. However, phylogenetic analysis on RNA2 (T4 region) showed that 05SaiJJM-3 was clustered differently from SJNag93 and other SJNNV strains including European type SJNNVs. Thereafter, in seed productions of striped jack without use of wild fish as a supplementary feed, no VNN cases were not encountered in the facility. This means that a special attention should be paid to infection via wild fish as feed for aquaculture.

Chapter 7: Finally, considering all the above-mentioned findings, I discussed further practical procedures to control VNN in the process of seed production of marine fish from various aspects.

Key words: viral nervous necrosis, control measure, *Epinephelus akaara, Branchiostegus japonicu, Thunnus orientalis*, wild fish

---

目　次

第１章　緒 論
第２章　種苗生産対象種および種苗生産過程における疾病の発生状況
第３章　キジハタにおけるベータノダウイルスの感染状況
第４章　アカアマダイにおけるウイルス性神経壊死症の防除対策
第５章　クロマグロにおけるウイルス性神経壊死症の防除対策
第６章　ウイルス感染源としての餌料魚の重要性
第７章　総合考察
謝　辞
引用文献
付　表
要　約

第１章　緒　論

1-1　わが国における栽培漁業

我が国の水産業は，自然界の水生生物を獲ることを生産手段とする漁業とそれらを一定の区画内で育成して収穫する養殖業より成り立っている。海面漁業のうち沿岸漁業，沖合漁業および遠洋漁業における最近30年間(1984年～2013年)の総漁獲量の変動をみると，1984年が1,261万トンで戦後において最も多い漁獲量となり，その後1990年までの7年間は1,000万トン台を維持し推移していたが，1991年以降に急激に減少に転じ，2001年にはピーク時の1/2以下の600万トンに減少した。その後は漸減傾向となり2013年度では470万トンとなっている。この減少傾向は，海面漁業の漁獲量の50～60%を占めている沖合漁業の漁獲変動と相関し，特に，資源変動が大きい浮魚のサバ類やマアジ *Trachurus japonicus* の漁獲量が低下したことによるものである。また，1982年に採択された「海洋法に関する国際連合条約」により，領海基線から200海里までの水域を排他的経済水域として宣言できることが明文化され，遠洋漁業により操業できる漁場が減少した結果，総漁獲量の10～20%を占める遠洋漁業も減少した。一方，沿岸漁業の漁獲量も，沖合漁業や遠洋漁業の漁獲量ほどの急激な減少はないものの漸減傾向を示し，1984年の226万トンに対し，2013年は約1/2の115万トンとなっている（農林水産省大臣官房統計部, 2015a, 2015b）(**Fig. 1**)。

漁獲量のこのような減少傾向を踏まえ，我が国では水産資源を持続的に利用しつつ，水産業を発展させて行くための基本的な理念として，2001年に水産基本法が制定された。その中で，沿岸漁業資源の増殖を推進するための施策として水産基本計画が策定され，水産動物の種苗生産および放流並びに水産動物の育成に関する基本方針に基づき，種苗の生産と放流をおこなう，いわゆる栽培漁業が日本全国で実施された（小林, 2006)。栽培漁業は“天然の生産力を十分に利用しながら，漁業の対象資源の増殖を図ることを積極的に推進して，資源の減少を防ぎ時には生産量を増すことも可能にしていく”との考え方に基づく（稲葉・吉牟田, 1980)。すなわち，栽培漁業は対象とする生物資源に人為的な管理をおこない，その繁殖を保護・助長し，漁業生産の維持増大を目的とした，いわゆる増殖であり，生産主体は漁業である。

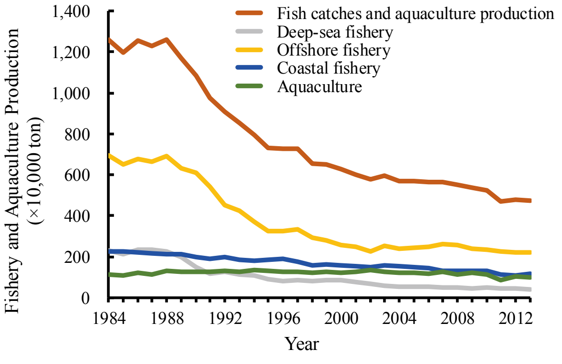

Fig. 1. Yearly changes of the fishery and aquaculture production in Japan during 1984－2012 (Annual Statistics of Fishery and Fish Culture; Statistics Department of Ministry of Agriculture, Forestry and Fish).

栽培漁業は1963年に設立された社団法人瀬戸内海栽培漁業協会により，水産庁からの委託を受け技術開発を担う栽培漁業センターが瀬戸内海を中心に整備され事業が開始された。1979年には栽培漁業を全国に展開するため，改組された社団法人日本栽培漁業協会（以下，日栽協）により，親魚養成と種苗の量産および放流に関する技術開発研究が実施されてきた（日本栽培漁業協会, 2003a)。その後，2003年からは独立行政法人水産総合研究センター，2016年からは国立研究開発法人水産研究・教育機構（以下，水産研究・教育機構）において，資源造成に関する技術開発研究が実施されている。一方，1973年以降に全国の都道府県または第三機関が運営する栽培漁業センターが設置され，栽培漁業の全国展開がさらに進められた。その結果，2015年には，水産研究・教育機構の5研究所の11庁舎，都道府県の水産研究機関および公益法人など75機関の121施設において，栽培漁業に関する研究・技術開発が進められている（(公社）全国豊かな海づくり推進協会, 2013；(公社）全国豊かな海づくり推進協会･海域栽培漁業推進協議会, 2014）(**Table 1**)。2013年度の栽培漁業の種苗生産対象種は，魚類34種，甲殻類10種，貝類22種，その他7種の合計73種類であり，このうち魚類12種，甲殻類4種，その他11種の合計27種では，年間100万個体以上の種苗が生産可能となっている（(独）水産総合研究センター, 2015)。

Table 1. The number of institutions and facilities for fishery stock-enhancement in Japan

Organization	Institution	Facility
National Fisheries Research Institute	5	11
Prefectural Fisheries Research Department Center	40	67
Quasi-public corporation*	35	54

* Quasi-public corporation includes General Incorporated Associations and Public Interest Incorporated Associations.

この栽培漁業に対し，海面養殖業は区画された水域を専用して水産生物を所有し，それらの繁殖および生活を積極的に管理・育成して収穫する手段と規定され，生産は経済行為であることから生産主体は企業に位置づけられる。養殖は対象生物の人為的な管理の度合いにより，集約的養殖と粗放的養殖に大別される。このうち，海産魚類養殖は集約的養殖の中の給餌養殖に区分され，我が国では1927年に野網和三郎氏が香川県の安土池においてブリ *Seriola quinqueradiata* の稚魚（モジャコ）を放養したことが起源とされる。1965年頃より水産物需要が増大し，供給体制を確立するため海面養殖振興が国の施策として推進され，水産試験研究機関の研究成果等を応用する技術開発が展開された。特に海産の魚類養殖では網生け簀（小割）方式による養殖形態が確立したことにより，養殖技術が高度化するとともに養殖対象種も多様化した。海産魚類養殖の生産量は，2011年と2013年では100万トンを下回ってはいるものの，過去30年間では110～130万トンの間で推移している（農林水産省大臣官房統計部，2015a, 2015b）（**Fig. 1**）。このように安定して養殖生産が可能となった一つの要因は，養殖用に使用する種苗が安定的に供給されるようになったからである。海産魚類養殖に用いられる種苗は，当初は天然の稚魚・幼魚であったが，その後，種苗生産技術の発展に伴いマダイ *Pagrus major* やヒラメ *Paralichthys olivaceus* をはじめ，種々の魚種で種苗を大量に生産する技術が確立された。特にマダイでは養殖に適した形質を有する人工種苗が選抜育種により作出され，現在のマダイ養殖は人工種苗の生産に大きく依存している。養殖業は経済行為であることから必然的に生産性が要求され，新しい養殖対象種が常に求められている。最近では，ハタ類や太平洋クロマグロ *Thunnus orientalis* が特に注目されており，種苗生産技術の開発の重点化がなされている。このように，種苗生産により生産された対象生物は，栽培漁業や養殖業を推進するために利用されていることから，安定して対象生物の種苗を生産する種苗生産技術が担う役割は大きい。

しかしながら，海産魚介類の種苗生産過程においては，仔稚が大量に死亡する事例がしばしば見られる。その要因の一つとしてウイルスや細菌による感染症および寄生虫の寄生による疾病の発生がある。（室賀，1995；西岡ら，1997；Muroga, 2001；鴨志田ら，2005）。これらのうち特に，感染症は種苗生産の安定に支障を及ぼすだけではなく，放流種苗においては水産資源を維持・増殖させる可能性がある一方で，放流された種苗による天然資源に対する病原体の伝播が，生物学的なリスクの一つとして懸念されており（有元，2000；Waples and Deake, 2004），種苗生産機関では，病原体の天然海への拡散を避けるために，「防疫的見地からみた放流種苗に関する申し合わせ事項（Ｉ）」（栽培漁業技術開発推進事業全国協議会，1999）に基づき，種苗生産過程で異常な死亡が認められなかった生産回次の種苗のみを放流している。一方，養殖業に用いる人工種苗では，被害が大きい疾病の病原体感染の有無が直ちに養殖生産に影響を与えるため，よりいっそうの防除対策を講じる必要がある。

1-2　ウイルス性神経壊死症

海産魚介類の種苗生産過程に発生するウイルス性疾病としては，ウイルス性神経壊死症（viral nervous necrosis：VNN），ウイルス性表皮増生症（viral epidermal hyperplasia），ウイルス性腹水症（viral acites），クルマエビ急性ウイルス血症（Penaeid acute viremia: PAV= white spot syndrome：WSS）等が知られている（室賀，1995）。これらのウイルス病の中で，VNNは，我が国では1990年に種苗生産されたイシダイ *Oplegnathus fasciatus* の仔稚魚において，極めて死亡率が高い疾病として初報告され（Yoshikoshi and Inoue, 1990），その後もシマアジ *Pseudocaranx dentex* など本論文で扱う主要な新規養殖対象魚で多発している。ほぼ同時期に海外では，バラマンディ *Lates calcarifer*，ターボット *Scophthalmus maximus* やシーバス *Dicentrarchus labrax* において同様の疾病が脳脊髄炎（encephalomyelitis）あるいはウイルス性脳症・網膜症（viral encephalopathy and retinopathy：VER）の病名で報告されている（Glazebrook *et al.*, 1990；Bloch *et al.*, 1991；Breuil *et al.*, 1991）。VNNの発生は，これまでに冷水性，温水性および熱帯性の魚種で確認され，海外での事例を含めて24科45種以上の魚種から報告があり，本疾病の発生により種苗生産中の仔稚魚が大量に死亡すること，また，養殖場においても稚魚や成長した養成魚が発病し死亡することから世界的に大きな問題となっている（Munday and Nakai, 1997；Munday *et al.*, 2002；Sano *et al.*, 2011）（**Table 2**）。

本病についてはシマアジ仔魚のVNNに関して詳細な研究がおこなわれ，Mori *et al.*（1992）により原因ウイルスの性状が初めて明らかにされた。原因ウイルスのベータノダウイルス（ノダウイルス科，ベータノダウイルス属）は，直径が約25 nmの正20面体でエンベロープを有せず，核酸はプラスセンスのRNA依存RNAポリメラーゼをコードするRNA1（3.1kb）と外被タンパク質をコードするRNA2（1.4 kb）の

2分節の1本鎖RNAからなっている（Thiéry *et al.*, 2012）。RNA2にコードされている外被タンパク質遺伝子の変異領域（T4領域：3' 末端の約380塩基）における塩基配列の比較から，ベータノダウイルスの基準株はシマアジ型ウイルス（striped jack nervous necrosis virus：SJNNV），キジハタ型ウイルス（redspotted grouper nervous necrosis virus：RGNNV），マツカワ型ウイルス（barfin flounder nervous necrosis virus：BFNNV）およびトラフグ型ウイルス（tiger puffer nervous necrosis virus：TPNNV）があり，それぞれ4つの主要な遺伝子型に分類されている（Nishizawa *et al.*, 1995, 1997）。また，抗血清での中和反応により血清型はシマアジ型がA型，トラフグ型がB型，キジハタ型およびマツカワ型がC型の3つに分けられる（Mori *et al.*, 2003）。VNNに罹病した仔稚魚は，体色の黒化や鰾の膨張が認められ，回転や旋回といった異常遊泳を示し，病理組織学的には網膜組織や脳組織における神経細胞の壊死や崩壊による空胞形成を特徴とする（Yoshikoshi and Inoue, 1990；Glazebrook *et al.*, 1990；Mori *et al.*, 1991；有元ら, 1994）。本病の診断には，病理組織検査（神経組織の空胞変性）や抗SJNNVウサギ血清を用いた蛍光抗体法（immunofluorescent antibody test：FAT），RNA2遺伝子のT4領域を主標的とするRT-PCR（reverse-transcriptase polymerase chain reaction）法，およびストライプト・スネークヘッド *Ophicephalus striatus* 仔魚から樹立された株化細胞（SSN-1）由来のE-11細胞などの培養細胞を用いて，細胞が球形化する細胞変性効果を観察する方法などがある（Nguyen *et al.*, 1996；Nishizawa *et al.*, 1994；Iwamoto *et al.*, 2000）。

種苗生産場における本疾病の主たる感染様式は，ウイルス保有親魚から仔稚魚への垂直伝播である（Arimoto *et al.*, 1992）。防除対策としてシマアジ，マツカワ *Verasper moseri* およびマハタ *Epinephelus septemfasciatus* では，ELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）により親魚血清中の原因ウイルスに対する抗体価を測定する方法やRT-PCR法またはRT-PCR増幅産物を鋳型とし4つの遺伝子型に特異的なプライマーを用いたnested PCRにより，生殖腺組織からウイルス遺伝子を検出することでウイルス・フリー親魚を選別し，それらの親魚から得られた受精卵をオキシダントで消毒するとともに，仔稚魚の飼育水には，オキシダントで処理した後に残留オキシダントを除去した海水を用いる方法が有効であるとされている（Mori *et al.*, 1998；Watanabe *et al.*, 1998；土橋ら, 2002）。しかし，ハタ類では同様の防除方法を実施しても，VNNが発生し顕著な防除効果が認められない

Table 2. Fish species affected by viral nervous necrosis (VNN): modified Munday *et al.* (2002) and Sano *et al.* (2011)

Family	Host fish species	Reference
Acipenseridae	Sturgeon *Acipenser gueldestaedti*	Athanassopoulou *et al.* (2004)
Anguillidae	European eel *Anguilla anguilla*	Chi *et al.* (2003)
Chanidae	Milkfish *Chanos chanos*	Maeno *et al.* (2007)
Siluridae	Chinese catfish *Parasilurus asotus*	Chi *et al.* (2003)
Gadidae	Atlantic cod *Gadus morthua*	Starkey *et al.* (2001); Johnson *et al.* (2002); Patel *et al.* (2007)
	Pacific cod *Gadus macrocephalus*	Unpublished
	Haddock *Melanogrammus aeglefinus*	Gagné *et al.* (2004)
Platycephalidae	Bartail flathead *Platycephalus indicus*	Song *et al.* (1997)
Centropomatidae	Asian sea bass *Lates calcarifer*	Glazebrook *et al.* (1990); Renault *et al.* (1991); Munday *et al.* (1992); Zafran *et al.* (1998); Azad *et al.* (2005)
Percichthydae	Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*	Jung *et al.* (1996)
	European sea bass *Dicentrarchus labrax*	Breuil *et al.* (1991); Le Breton *et al.* (1997); Athanassopoulou *et al.* (2003)
Serranidae	Red-spotted grouper *Epinephelus akaara*	Mori *et al.* (1991); Chi *et al.* (1997)
	Yellow grouper *E. awoara*	Lai *et al.* (2001)
	Seven-band grouper *E. septemfasciatus*	Sohn *et al.* (1991); Fukuda *et al.* (1996)
	Black-spotted grouper *E. fuscogutatus*	Chi *et al.* (1997)
	Dusky grouper *E. marginatus*	Munday *et al.* (2002)
	Brown-spotted grouper *E. malabaricus*	Danayadol and Direkbusarakom (1995); Boonyaratpalin *et al.* (1996); Lin *et al.* (2001)
	Kelp grouper *E. moara*	Nakai *et al.* (1994)*
	Greasy grouper *E. tauvina*	Chua *et al.* (1995); Chew-Lim *et al.* (1998)
	Dragon grouper *E. lanceolatus*	Lin *et al.* (2001)
	Orange -spotted grouper *E. coioides*	Maeno *et al.* (2002)
	White grouper *E. aeneus*	Ucko *et al.* (2004)
	Humpback grouper *Chromileptes alitivelis*	Zafran *et al.* (2000)
Malacanthidae	red tilefish *Branchiostegus japonicus*	Nishioka *et al.* (2011)*
Latridae	Striped trumpeter *Latris lineata*	Munday *et al.* (2002)
Carangidae	Striped jack *Pseudocaranx dentex*	Mori *et al.* (1992)
	Purplish amberjack *Seriola dumerili*	Nishizawa *et al.* (1997)
	Yellow-wax pompano *Trachinotus falcatus*	Chi *et al.* (2001)
Lutjanidae	Mangrove red snapper *Lutjanus argentimaculatus*	Maeno *et al.* (2007)
Sciaenidae	Red drum *Sciaenops ocellatus*	Ucko *et al.* (2004)
	Shi drum *Umbrina cirrosa*	Bovo *et al.* (1999)
	White sea bass *Atractoscion nobilis*	Curtis *et al.* (2001)
Oplegnathidae	Japanese parrotfish *Oplegnathus fasciatus*	Yoshikoshi and Inoue (1990)
	Rock porgy *O. punctatus*	Muroga *et al.* (1998b)*
Mugilidae	Grey mullet *Mugil cephalus*	Ucko *et al.* (2004)
Cichlidae	Tilapia *Oreochromis niloticus*	Bigarre *et al.* (2009)
Eleotridae	Sleepy cod *Oxyeleotris lineolatus*	Munday *et al.* (2002)
Rachycentridae	Cobia *Rachycentron canadum*	Chi *et al.* (2003)
Scombridae	Bluefin tuna *Thunnus orientalis*	Nishioka *et al.* (2010)
Pleuronectidae	Baifin flounder *Verasper moseri*	Watanabe *et al.* (1999)*
	Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*	Grotmol *et al.* (1995,1997); Starkey *et al.* (2001)
Bothidae	Japanese flounder *Paralichthys olivaceuss*	Nguyen *et al.* (1994)
	Turbot *Pasta maxima*	Bloch *et al.* (1991); Johansen *et al.* (2004)
Soleidae	Dover sole *Solea solea*	Starkey *et al.* (2001)
Tetraodontidae	Tiger puffer *Takifugu rubripes*	Nakai *et al.* (1994)*

* in Japanese.

事例も報告されており（鴨志田ら, 2005），魚種によっては垂直伝播以外の感染経路の解明が課題となっている。例えば，マハタの種苗生産では，親魚の選別と受精卵・飼育水の消毒により生産したウイルス・フリーの稚魚を，海面小割で飼育するとしばしばVNNが発症し大量死亡に至る。これは飼育海水中に存在するウイルスが感染源であると推察される。2000年以降，天然魚のベータノダウイルス感染の調査において，外見上健康と思われる多くの天然魚からPCR法によりウイルス遺伝子が高頻度に検出されており，これらの天然魚が本ウイルスの感染源（レゼルボア）になっていると考えられる（Barker *et al.*, 2002；Gomez *et al.*, 2004；Sakamoto *et al.*, 2008）。したがって，種苗生産に用いる親魚や親魚候補として天然魚を使用することは種苗生産場でのVNNの発生要因となる可能性が高い。一方，予防免疫によるVNN防除法としてワクチン開発の研究が進められ，大腸菌で発現させた遺伝子組換えカプシド蛋白質，合成ペプチド，バキュロウイルス発現系で作らせたウイルス様粒子，および細胞培養不活化ウイルスがある。また，DNAワクチンの研究もなされており（Sano *et al.*, 2011），それぞれ有効性が認められているものの基礎研究の段階である。これらのうち，マハタでは注射用不活化ワクチンが開発・市販されており，マハタ養殖ではワクチンによる防除対策がなされている（黒田・中井, 2012）。養殖においてワクチンの使用は，VNN発生の抑制に非常に有効である。しかし，栽培漁業で使用する人工種苗は天然海に放流することを目的としており，放流種苗に対するワクチン接種の可否については十分に議論されていない。そこで，本論文では，ワクチンによらないVNN防除法について検討する。

本論文では，緒論（第1章）に続き，第2章でまず2000～2009年度に種苗生産過程で発生した疾病の発生状況をとりまとめ，我が国の種苗生産機関において種苗の安定生産に影響を与える疾病を整理した。次に，栽培漁業の対象種として期待されているキジハタ *Epinephelus akaara*（第3章），アカアマダイ *Branchiostegus japonicus*（第4章），および水産資源の保護や特に養殖において人工種苗の利用が注目されている太平洋クロマグロ（第5章）について，ベータノダウイルスの感染状況調査とその防除対策について検討した。第6章では 種苗生産場で餌として使用される天然魚のベータノダウイルス感染状況を調査し，VNN感染源としての可能性を検討し，最後に総合考察（第7章）では，VNNの新たな感染経路の推定をおこなってその防除対策について考察した。

なお，本研究の実施期間中に組織改編があったため，日栽協は，独立行政法人水産総合研究センターを経て，現在は水産研究・教育機構と組織名が変わり，日栽協の玉野事業場は瀬戸内海区水産研究所玉野庁舎（以下，玉野庁舎，2015年閉庁），伯方島事業場は瀬戸内海区水産研究所伯方島庁舎（以下，伯方島庁舎），上浦事業場は増養殖研究所上浦庁舎（以下，上浦庁舎），宮津事業場は日本海区水産研究所宮津庁舎（以下，宮津庁舎），五島事業場は西海区水産研究所五島庁舎（以下，五島庁舎），奄美事業場は西海区水産研究所奄美庁舎（以下，奄美庁舎）と記載した。

第2章　種苗生産対象種および種苗生産過程における疾病の発生状況

2-1　はじめに

我が国の栽培漁業に関わる海産魚介類の種苗生産に関する研究は，1941年に藤永がクルマエビ *Marsupenaeus japonicus* のゾエア幼生が浮遊珪藻である *Skeletonema costatum* を摂餌することを明らかにして（Hudinaga, 1942），種苗生産の基本的な技術を確立したのが最初である。クルマエビはその後1963年から事業規模での生産および養殖がおこなわれるようになった。1950年代にはナマコ類（今井ら, 1950）やクロアワビ *Haliotis discus discus*（狩野, 1952），ホタテガイ *Mizuhopecten yessoensis*（Yamamoto, 1955），マベ *Pteria penguin*（新村ら, 1963）等の貝類の飼育に関する研究が本格的に始められた。これらのうち，アワビ類の人工種苗生産技術は1960～1970年代の研究により確立された（狩野, 1966；菊池・浮, 1974）。また，ガザミ *Portunus trituberculatus* の種苗生産試験が1960年前半から実施され（前川, 1961；八塚, 1963），1973年代には約100万個体の稚ガニの生産がなされている（日本栽培漁業協会, 1983）。一方，魚類では1960年前後にニシン *Clupea pallasii*，クロダイ *Acanthopagrus schlegeli*，トラフグ *Tkifugu rubripes* およびマダイについて，天然産卵の受精卵または人工授精により得た受精卵からふ化した仔魚を体長およそ20 mmの稚魚にまで飼育し，その個体発生や成長過程が研究された（倉田, 1959；笠原ら, 1960；藤田, 1962；山下, 1963）。その後，1960年代後半に作出されたシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* sp. complexの海水培養株を仔魚の初期餌料として導入することにより海産仔稚魚の飼育が可能となり（伊藤, 1960），さらには，水産庁が推進する栽培漁業の全国展開により，飼育水槽などの施設面での拡充がなされ種苗生産研究が促進された。その結果，種々の魚種に

において技術開発がなされ，対象種の種類や生産される数量は飛躍的に増加した（福所 , 1986；日野 , 2004)。

しかし一方で，種苗を安定的に生産するには様々な問題が存在し，その中には仔稚魚期に発生する疾病による大量斃死が含まれる（Matsuoka, 1989；西岡ら , 1997)。種苗生産期の海産仔稚に関する疾病の研究は 1980 年頃より始まり，仔稚期に発生する感染性疾病については，室賀（1995）や Muroga（2001）により取りまとめられている。その中でもウイルス性神経壊死症（VNN）やクルマエビ急性ウイルス血症（PAV = WSS）等のウイルス病，細菌性腸管白濁症や細菌性腹部膨満症等の細菌病，および甲殻類の真菌症等の疾病は著しく種苗生産効率の低下を招くとされている。

本章では，海産魚介類の種苗生産過程における疾病の発生や大量死亡事例の状況を把握するため，宿主である種苗の生産状況と種苗期の疾病発生状況について述べる。

2-2 種苗生産対象種と生産量（1984 ～ 2010 年度）

海産魚介類の種苗生産は，主として栽培漁業の推進のために放流用として生産されていることから，水産庁・日栽協，水産総合研究センターおよび（社）全国豊かな海づくり協会が集計し刊行された「栽培漁業種苗生産、入手・放流実績（全国）～資料編～」（水産庁・日本栽培漁業協会 , 1986 ～ 2003；水産庁・水産総合研究センター , 2004；水産庁・水産総合研究センター・全国豊かな海づくり協会 , 2005 ～ 2010）の中で，1984 年度～ 2010 年度に種苗生産された海産魚介類のデータを用いた。栽培漁業の進め方に関する基本的な方向性は，国（農林水産大臣）が，概ね 5 年ごとに策定・公表する「水産動物の種苗の生産及び放流並びに水産動物の育成に関する基本方針」（以下，基本方針）により示してきた。これまでに，第 1 次は 1984 ～ 1987 年度の 4 年間，第 2 次は 1988 ～ 1993 年度の 6 年間，第 3 次は 1994 ～ 1999 年度の 6 年間，第 4 次は 2000 ～ 2004 年度，第 5 次は 2005 ～ 2009 年度，第 6 次は 2010 ～ 2014 年度のそれぞれ 5 年間を対象期間として策定・公表がなされている。そこで，基本方針が示された年度，すなわち 1984 年度，1988 年度，1994 年度，2000 年度，2005 年度および 2010 年度の種苗生産対象種と生産数量を魚類，甲殻類および軟体動物やウニ類を含むその他に区分し **Table 3** に示した。

2-2-1 魚類

魚類では 1984 年には，対象種が 31 種類で約 5,000 万個体が生産されていた。その後，1988 年では 36 種類で約 6,100 万個体，1994 年は 33 種類で約 8,600 万個体，2000 年では 36 種類で約 1 億個体にまで増加したが，その後は種類，生産数ともに減少し 2010 年では 34 種類で約 7,300 万個体となった。このように魚類では 1984 年から 2000 年にかけて種類数や生産量が増加しており，種々の魚種で種苗生産技術の開発がおこなわれ，大量生産が可能になったと考えられる。2000 年以降は安定した生産技術が確立されなかった魚種の見直しや，量産が可能となった種についても 1 魚種当たりの生産量が少なくなり，総生産個体数が減少したものと考えられる。

2-2-2 甲殻類

甲殻類では 1984 年には対象種が 15 種類で約 5 億 6,000 万個体，1988 年には 16 種類で約 6 億 6,000 万個体が生産されたが，その後生産数は減少し，1994 年では 17 種類で約 6 億個体, 2000 年は 16 種類で約 4 億個体, 2005 年は 14 種類で約 2 億 7,000 万個体，2010 年は 11 種類で約 1 億 9,000 万個体が生産されている。甲殻類では 1984 年から 1994 年にかけて対象種類数および生産数が増加しているが，2000 年以降は対象種も生産数も減少している。特に 2010 年の生産数では 1994 年の 7 割近い減少率となっている。これには，放流資源共同管理型栽培漁業総合モデル事業（日本栽培漁業協会，2003b）において，旧日栽協志布志事業場が生産していた約 8,000 万個体のクルマエビの生産事業が終了したことが影響している。冒頭で述べたように，日本における種苗の大量生産技術は魚類に先駆けて，最初にクルマエビ，次いでガザミで確立されたことから，栽培漁業を進める上でこれらの甲殻類が主要な対象種と位置付けられた。放流事業の実施期間はクルマエビで 30 年以上，ガザミで 25 年以上が経過している。し

Table 3. The number of juveniles of marine fish and shellfish produced in hatcheries for Japanese marine stock enhancement programs

Year	Number of the basic principles	Finfish	Crustaceans	Others*3
1984	1st	50,240*1 (31)*2	565,702 (15)	1,821,176 (23)
1988	2nd	61,375 (36)	664,298 (16)	3,254,239 (29)
1994	3rd	86,227 (33)	606,396 (17)	3,073,906 (30)
2000	4th	104,099 (36)	404,409 (16)	3,778,509 (28)
2005	5th	87,298 (36)	269,840 (14)	3,097,975 (29)
2010	6th	73,865 (34)	193,671 (11)	3,346,774 (29)

*1 ×1000 individuals.
*2 The number of species produced.
*3 include mollusks and echinoderms.

かし，基本方針の指針に合わせて放流事業規模の見直し等がなされた結果，生産数は減少してきている。

2-2-3 その他

その他の海産生物の種苗生産の対象種および生産数は，1984年では23種類で約18億2,000万個体であったがその後増加し，1988年には29種類で約32億5,000万個体，1994年は30種類で約31億個体，2000年では28種類で約38億個体，2005年は29種類で約31億個体，2010年は28種類で約33億個体であった。1988年に生産数が30億個体を超えた後は，増減はあるものの30億個体を維持しており，対象種類数も1988年以降大きな減少はない。特に貝類では放流後の移動範囲がある程度限定的であることから，放流効果が漁業者に認識されており事業が継続されている。

2-2-4 主要対象種

1984年から2010年までの27年間のうち8割の期間に当たる22年間にわたって種苗生産され，かつ全国で100万個体以上の個体数が生産されたことがある動物種を栽培漁業の主要な対象種とし**Table 4**に示した。魚類ではニシン，マダラ *Gadus macrocephalus*，スズキ *Lateolabrax japonicus*，シマアジ，イサキ *Parapristipoma trilineatum*，マダイ，クロダイ，ハタハタ *Arctoscopus japonicus*，クロソイ *Sebastes schlegelii*，カサゴ *Sebastiscus marmoratus*，オニオコゼ *Inimicus japonicus*，ヒラメ，マツカワ，マガレイ *Pleuronectes herzensteini*，マコガレイ *Pleuronectes yokohamae*，トラフグの16魚種，甲殻類ではクマエビ *Penaeus semisulcatus*，クルマエビ，コウライエビ *Penaeus chinensis*，ヨシエビ *Marsupenaeus ensis*，トゲノコギリガザミ *Scylla paramamosain*，ガザミ，タイワンガザミ *Portunus pelagicus*，モクズガニ *Eriocheir japonica* の8種，その他ではサラサバテイ *Trochus niloticus*，トコブシ *Haliotis diversicolor supertexta*，フクトコブシ *H. diversicolor diversicolor*，メガイアワビ *H. gigantea*，クロアワビ，エゾアワビ *H. discus hannai*，サザエ *Turbo cornutus lightfoot*，バイ *Babylonia japonica*，アカガイ *Scapharca broughtonii*，ホタテガイ，ウバガイ *Pseudocardium sachalinense*，チョウセンハマグリ *Meretrix lamarckii*，ハマグリ *M. lusoria*，アカウニ *Pseudocentrotus depressus*，バフンウニ *P. pulcherrimus*，エゾバフンウニ *Strongylocentrotus intermedius*，キタムラサキウニ *S. nudus*，マナマコ *Stichopus japonicus* の18種であった。

Table 4. Major species of seed production for Japanese marine stock enhancement programs

Animal	Species
Finfish	Pacific herring *Clupea pallasii*
	Pacific cod *Gadus macrocephalus*
	Japanese seabass *Lateolabrax japonicus*
	Striped jack *Pseudocaranx dentex*
	Chicken grunt *Parapristipoma trilineatum*
	Red seabream *Pagrus major*
	Black seabream *Acanthopagrus schlegelii*
	Sailfin sandfish *Arctoscopus japonicus*
	Schlegel's black rockfish *Sebastes schlegelii*
	Marbled rockfish *Sebastiscus marmoratus*
	Devil stinger *Inimicus japonicus*
	Japansese flounder *Paralichthys olivaceus*
	Barfin flounder *Verasper moseri*
	Littlemouth flounder *Pleuronectes herzensteini*
	Marbled sole *P. yokohamae*
	Japanese pufferfish *Takifugu stictonotus*
Crustacean	Green tiger prawn *Penaeus semisulcatus*
	Fleshy prawn *P. chinensis*
	Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*
	Greasyback shrimp *Metapenaeus. ensis*
	Green mud Crab *Scylla serrata*
	Swimming crab *Portunus trituberculatus*
	Flower crab *P. pelagicus*
	Japanese Mitten crab *Eriocheir japonica*
Others	Commercial trochus *Trochus niloticus*
(Mollusks, Echinoderm)	Tokobushi abalone *Haliotis diversicolor aquatilis*
	Fukutokobushi abalone *H. diversicolor diversicolor*
	Disk abalone *H. gigantea*
	Japanese abalone *H. discus discus*
	Ezo abalone *H. discus hannai*
	Spiny top shell *Turbo cornutus lightfoot*
	Ivory shell *Babylonia japonica*
	Bloody cockle *Scapharca broughtonii*
	Yezo giant scallop *Patinopecten yessoensis*
	Surf clam *Pseudocardium sachalinense*
	Lamarck's meretrix, hard clam *Meretrix lamarckii*
	Common orient clam *M. lusoria*
	Red sea urchin *Pseudocentrotus depressus*
	Japanese green sea urchin *P. pulcherrimus*
	Short-spined sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*
	Northern sea urchin *S. nudus*
	Japanese common sea cucumber *Stichopus japonicas*

2-2-5 生産を休止した対象種

第6次の基本計画が示されるまでに，年間100万個体以上の生産が実施され，生産技術は確立されたとみなされるが，生産を休止した対象種は，魚類ではシシャモ *Spirinchus lanceolatus*，ブリ，ミナミクロダイ *Acanthopagrus sivicolus*，甲殻類ではトヤマエビ *Pandalus hypsinotus*，アミメノコギリガザミ *Scylla serrata*，フトミゾエビ *Penaeus latisulcatus*，その他では，アコヤガイ *Pinctada fucata martensii*，ヒオウギ *Chlamys senatoria nobilis*，イタヤガイ *Patinopecten albicans*，トリガイ *Fulvia mutica*，バカガイ *Mactra chinensis*，ミルクイ *Tresus keenae* があった。また，新たに種苗生産が始められた対象種は，魚類の

クロガレイ *Pleuronectes obscurus*，アカシタビラメ *Cynoglossus joyneri* と貝類のサルボウガイ *Scapharca subcrenata* であった。

2-3 種苗期疾病の発生状況（2000 ～ 2009 年度）

日栽協では，1990 年から水産庁の委託を受け，海産魚介類の種苗生産期に発生する疾病を把握し，これらの情報を種苗生産機関との間で共有することにより，疾病防除に繋げることを目的として種苗期疾病情報事業を開始した（中田，1990）。その後，2005 年から 2012 年度まで増養殖研究所の魚病関連部局が事務局となり，種苗期疾病情報連絡協議会において情報交換が実施された。ここでは，種苗期疾病情報事業で 2000 ～ 2006 年度まで提供されたデータと種苗期疾病情報連絡協議会において提供された 2007 ～ 2009 年度までのデータを元に，種苗生産過程で発生している疾病の発生状況について述べる。なお，種苗期疾病情報連絡協議会の 2010 年から 2012 年の 3 年間では合計 3 件の報告にとどまり，全国的な疾病発生状況を反映していないと判断して割愛した。また，種苗生産現場における疾病の発生状況をまとめた西岡ら（1997）および鴨志田ら（2005）のデータを含め 1989 年度から 2009 年度における VNN の発生魚種をまとめた。

2-3-1 種苗期疾病情報事業における疾病発生状況（2000 ～ 2006 年度）

(1) 種苗期疾病情報の入手

種苗生産期間中に発生した疾病や大量死亡例の情報内容は，生産対象種，発生時期，症状，種苗の飼育や被害状況および対処法である。情報はファックスや電子メールで入手した。また，アンケート調査により，報告後に明らかとなった情報内容を補填した。

(2) 参加機関

2000 ～ 2006 年度は海産魚介類を種苗生産している全国の公的機関で，39 都道府県の 63 の栽培漁業センターと 16 水産試験場，日栽協の 16 事業場（現水産研究・教育機構の栽培漁業関係庁舎）の計 95 機関（2000 年 3 月現在）である。

(3) 種苗生産対象種

2000 ～ 2006 年度の種苗生産・入手放流実績に記載されている放流および養殖用に人工種苗が複数年生産されている種類数を **Table 5** に示した。なお，ウミガメ類は除いた。海産魚介類のうち魚類が 49 種（46%），甲殻類が 18 種（17%），その他（軟体動物類および棘皮動物類）が 39 種（37%）の合計 106 種が種苗生産されている。

Table 5. The number of species of creatures in seed production for Japanese marine stock enhancement programs and aquaculture from 2000 to 2009 fiscal year

Animals	Species	Ratio (%)
Finfish	49	46
Crustaceans	18	17
Others	39	37
Total	106	100

(4) 疾病名

疾病名は日本魚病学会で選定された疾病名（日本魚病学会，2015）を基本とした。本学会で選定されておらず，参画機関において一般に呼称される疾病は，仮称（仮）と記載した。未確定の疾病の原因については，情報提供者の推察に基づき分類した。また，甲殻類の卵や幼生に感染する真菌病は広く知られており（Spark, 1985），日本で発病が確認されている甲殻類幼生の真菌病は，下等菌類の鞭毛菌類クサリフクロカビ目に分類されることから（畑井，1998），真菌症としてまとめた。

(5) 取りまとめ方法

提供された情報を基に種苗生産対象種，疾病の原因，発生地域，被害の状況および主な疾病の発生状況について，鴨志田ら（2005）の方法に準じ整理した。すなわち，疾病報告件数は，年ごとに 1 機関の単一の生産対象種において 1 つの疾病が発生した場合を 1 件とし，疾病発生時の生産対象種の発育状況を大きさやステージで示した。

(6) 動物種別疾病発生状況

2000 ～ 2006 年度（2000 年 4 月から 2007 年 3 月）に合計で 444 件の疾病の発生が報告された。

魚類，甲殻類，その他における種別の報告状況を **Fig. 2** にまとめた。魚類で報告件数が多かったのは，ヒラメの 121 件（38%）であった。次いで，マダイが 46 件（14%），クロダイが 19 件（6%），オニオコゼとマコガレイがそれぞれ 13 件ずつ（4%），シマアジが 11 件（3%），クエ *Epinephelus bruneus* が 10 件（3%）であった。甲殻類では，クルマエビの疾病が 50 件（55%）と最も多く，次いでガザミの 22 件（24%），ヨシエビの 11 件（12%）の順となった。その他では，クロアワビが 17 件（52%），アカウニが 5 件（15%），メガイアワビが 4 件（12%）であった。

(7) 原因別疾病発生状況

原因別の報告件数は，細菌病が 162 件（36%），ウイルス病が 112 件（25%），不明が 75 件（17%），寄

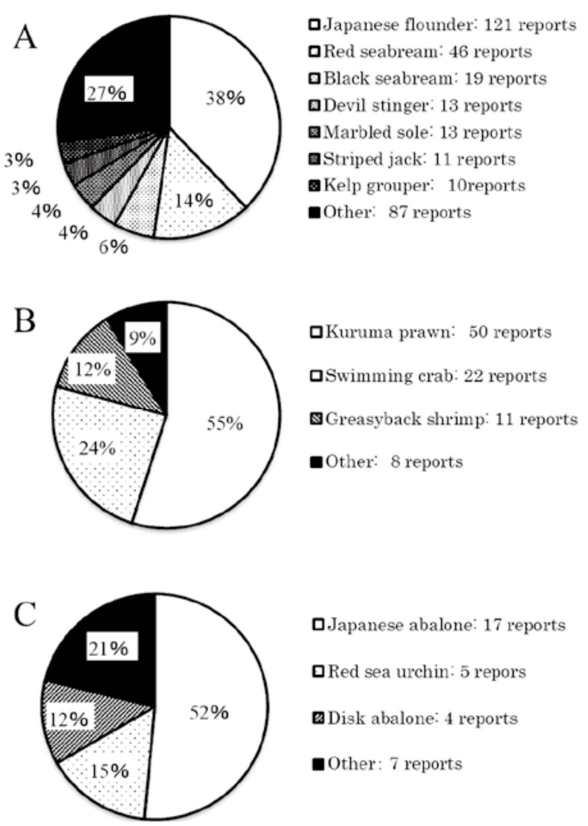

Fig. 2. Rate of reported disease occurrences in Fish (A), Crustaceans (B) and others (C) in 2000-2007.

生虫病が 55 件（12%），真菌病が 40 件（9%）であった（**Appendix table 1 〜 3**）。

ウイルス病では，VNN の報告が 60 件と最も多く，次いで PAV が 15 件，筋萎縮症が 14 件であった。本種苗期疾病情報の中では，新たに，クロマグロ，オオニベ *Argyrosomus japonicus*，アカアマダイ，シロクラベラ *Choerodon shoenleinii*，マダイ，チャイロマルハタ *Epinephelus. coioides*，マサバ *Scomber japonicus* において VNN の発生が報告された。VNN はこれまでに海外の発生例を含むと 24 科 45 種以上の魚種から報告されており（Munday and Nakai, 1997；Munday *et al*., 2002；Sano *et al*., 2011），発生魚種は今後も増加すると考えられる。その他のウイルス病で新たに，ヤイトハタ *Epinephelus malabaricus*，ハマフエフキ *Lethrinus nebulosus* でマダイイリドウイルス病（red sea bream iridoviral disease：RSIVD），ホシガレイ *Verasper variegatus*，メイタガレイ *Pleuronichthys cornutus* でウイルス性表皮増生症（viral epidermal hyperplasia：VEH）が発生した。また，タケノコメバル *Sebastes oblongus*，ホシガレイのウイルス性出血性敗血症（viral hemorrhagic septicemia：VHS），ヒラメのビルナウイルス病，マダカアワビ *Haliotis madaka* の筋萎縮症が新たに発生した。

細菌病では，滑走細菌症が 44 件，細菌性腹部膨満症が 34 件，ビブリオ病が 30 件と多く，マコガレイ，ヒラメの非定型エロモナス症，アミメノコギリガザミおよびガザミの壊死症（仮），シラヒゲウニ *Tripneustes gratilla* の斑点病（仮），ヤイトハタのエピテリオシスチス類症が発生した。このうちマコガレイの非定型エロモナス症は，非定型 *Aeromonas salmonicida* による感染症で，水温が 17℃前後の水温時に発生し注意すべき疾病であるとされている（熊谷ら , 2006）。ガザミ類の壊死症（仮）は，ガザミでは原因が不明であるが細菌の関与が疑われており（浜崎 , 1997），アミメノコギリガザミではグラム陰性の長桿菌が原因である（浜崎 , 2002）。シラヒゲウニの斑点病では，単年度のみの報告で原因は特定されていないが，細菌による疾病と考えられている。また，同じウニ類の疾病では，北日本で種苗生産されているエゾバフンウニで長桿菌の *Tenacibaculum* sp. が原因の斑点病がある（Suzuki *et al*., 2001）。本疾病は，水温が低い時期に複数年にわたって発生しており，シラヒゲウニとエゾバフンウニの事例では発生要因が異なると推察される。一方，低水温期には，アカウニ，シラヒゲウニの棘抜け症（仮）があり，アカウニでは滑走細菌が原因とされ（室賀 , 1998），シラヒゲウニでは長桿菌が原因菌と疑われている（真崎 , 1994）。発生水温や原因菌の形態が類似するなど両疾病の共通点は多く，シラヒゲウニにおける防除法（Taniguchi *et al*., 2006）の活用が期待される。新しく疾病が発生した魚種では，滑走細菌症がウスメバル *Sebastes thompsoni*，タケノコメバル，クロダイ，シマアジ，スズキ，オニオコゼ，シロクラベラ，ハマフエフキ，クロアワビ，マダカアワビ，細菌性腸管白濁症がオニオコゼ，パスツレラ症がスギ *Rachycentron canadum*，棘抜け症（仮）ではバフンウニ，シュードモナス症ではヒラメとカサゴがあった。

寄生虫病では，スクーチカ症の発生が 19 件と最も多かった。また，1999 年度までに 10 種類の寄生虫病が報告されていたが（西岡ら , 1997；鴨志田ら , 2005），本疾病情報の報告においてヨシエビ，クマエビのツリガネムシ寄生（仮），クロソイのブルークリネラ症，カサゴのクリプトビア症，スジアラ *Plectropomus leopardus* の原虫感染症，マダラのトリコジナ症，カンパチ *Seriola dumerili*，キジハタのネオベネデニア症，マダイのビバギナ症が新たに追加された。本疾病情報で新たに発生が確認された寄生虫病の罹病魚種は，スクーチカ症でマダイ，オニオコゼ，メイタガレイ，クロソイ，タケノコメバル，イク

チオボド症でクロソイ，ヤナギムシガレイ *Tanakius kitaharai*，メバル，タケノコメバル，ウスメバルであった。スジアラの原虫感染症では，*Ichthyodinium* 属原虫が受精卵内や仔魚の卵黄中で分裂増殖し，卵や仔魚が死亡に至る。防除法として砂ろ過海水をオキシダント処理し，活性炭により残留オキシダントを除いた海水中で親魚を産卵させることが提案されている（Mori *et al*., 2007）。

真菌病では，新たにマダイ，シマアジの *Ochroconis thawytschae* または *O. humicola* が感染するオクロコニス症，マダイ，オニオコゼのミズカビ病が報告され，オニオコゼでは未同定の真菌症が報告された。

不明病では，ガザミに *Licmophora* 属の珪藻が付着するリクモホラ症（仮）の発生があった。

2-3-2　種苗期疾病情報連絡協議会における疾病発生状況（2007 ～ 2009 年度）

（1）情報の入手および参加機関

都道府県の魚病担当機関を通じて，種苗生産実施機関から間接的に情報を収集した。参加機関は 32 機関（2007 年 3 月時点）である。

（2）原因別疾病発生状況

2007 年度から 2009 年度において 21 機関より 35 件の疾病発生の報告があり，原因別や疾病別に報告件数をまとめた（**Appendix table 4**）。原因別では，ウイルス病 11 件（33%），細菌病 14 件（39%），寄生虫病 3 件（8%），不明が 6 件（19%）であった。ウイルス病では，VNN が 7 魚種で発生し，マコガレイでアクアレオウイルス感染症（仮）が毎年報告され複数機関で発生した。細菌病では，スジアラ，ヤイトハタ，ヒラメで滑走細菌症が，ヤイトハタ，トラフグ，クルマエビでビブリオ病がそれぞれ 3 件ずつ報告された。フランシセラ細菌感染症（仮）がバイで初めて報告された。寄生虫病ではカサゴのミクロコチレ症が報告された。原因不明の死亡が魚類 6 種，甲殻類 1 種から報告された。ウイルス病では VNN の発生が多魚種で報告され，依然として生産現場で問題となっていると考えられる。また，アクアレオウイルス感染症（仮）が，複数機関で複数年度にわたって発生の報告があり，種苗生産場における疫学情報の収集に努め防除対策を講じていく必要がある。細菌病のフランシセラ症は，貝類ではメガイアワビで確認されており（Kamaishi *et al*., 2010），類似の疾病がバイで報告されたことから，今後の発生状況を把握するとともに原因菌の性状を含め迅速診断法や防除法の開発をおこなう必要がある。

2-3-3　VNN の発生状況（1989 ～ 2009 年度）

1989 年から 2009 年度までに本情報事業および連絡協議会において VNN の発生が報告された魚種は 5 科 21 種におよび，このうち，キジハタ，クエ，シマアジ，ヒラメでは発生年が 10 年以上にも及んでいる。シマアジでは 1995 年に疾病防除対策が確立されている（Mori *et al*., 1998）にもかかわらず，2000 年以降にも報告がある。これは，種苗生産機関において親魚検査を実施する PCR 検査機器や卵や飼育用水を処理するオゾン装置などの機器や機材の整備が難しいことが一因と考える。一方，シマアジ以外の魚種の VNN 対策では，受精卵の消毒や飼育用水や飼育施設の消毒および飼育に供する個体数の低減が実施されているが，防除効果が低いことが示されている（鴨志田ら , 2005）。1989 ～ 2009 年度の 21 年間のうち，本論文で研究対象としたキジハタは 11 年間，アカアマダイは 3 年間，およびクロマグロは 7 年間で VNN 発生の報告があった。

2-4　まとめ

栽培漁業を目的とした種苗生産の対象種は，量産技術が確立したマダイ，クロダイ，ヒラメ，クルマエビ，ガザミ，アワビ類を中心に事業が推進されてきた。これらの種類は，現在も継続して生産されており，生産個体数は減少したものの主要対象種に大きな変化はないことが明らかとなった。

本章で示した 2000 ～ 2009 年度に報告された疾病の件数は 478 件であり，ウイルス病が 123 件（26%），細菌病が 176 件（37%），真菌病が 40 件（8%），寄生虫病が 58 件（12%），不明が 81 件（17%）であった。種病期の疾病のうち，複数年にわたり報告された疾病は，魚類では VNN，RSIVD，滑走細菌症，細菌性腹部膨満症，ビブリオ病，細菌性腸管白濁症，スクーチカ症，甲殻類では真菌症，介類では筋萎縮症，棘抜け症（仮）があり，これらの疾病は，1989 ～ 1999 年（西岡ら , 1997；鴨志田ら , 2005）においても同様に報告されていることから，種苗生産過程や育成期間に発生する主な疾病の種類は，大きくは変化していないといえる。

その中でも VNN は，動物種別の疾病発生状況，原因別発生状況，地域別疾病発生状況，被害状況において，報告件数が多く魚類の種苗生産で最も危惧される疾病であるといえる。本研究の対象種であるキジハタでは 11 年間，アカアマダイでは 3 年間，クロマグロでは 7 年間で発生の報告があり，安定生産をおこなうには防除対策が必要であると考えられる。

第3章　キジハタにおけるベータノダウイルスの感染状況

3-1　はじめに

キジハタは，スズキ目ハタ科マハタ属に分類され，全長60 cm程度に成長する暖海性のハタ類で，青森県以南から朝鮮半島南部，中国，台湾までの沿岸域に分布し，国内では特に瀬戸内海および日本海南西部の岩礁域に多く生息する。主として刺網や延縄により漁獲され，瀬戸内海海域では，一般に「アコウ」と呼称され，きわめて美味であるため市場価値が高く，高級食材として扱われている重要な漁業対象種である。しかし，漁場環境の変化や乱獲などにより，近年は漁獲量が著しく減少している。主生産地の一つである岡山県におけるキジハタの年間漁獲量は，1955年の28トンを最高に，1956年から1968年にかけて8.0トンから18.5トンで推移していたが，1995年から2006年にかけては1トンから4トンの範囲であり激減している（農林省岡山統計調査事務所，1956；中国四国農政局統計情報部，2004, 2005, 2010）。その後は統計の銘柄に記載されなくなり，資源水準は依然として低いと推察される。また，本種は定着性が強いことから移動回遊範囲は比較的狭いと推定される（奥村ら，2003）。以上のように市場性が高く天然の資源量が小さいうえに定着性が強いことから，本種は種苗放流による資源の維持や増加を目的とする栽培漁業の対象種として有望である。

キジハタの種苗生産に関する研究は，1960年代より開始され，自然産卵による受精卵の大量確保，初期餌料としてシオミズツボワムシ（タイ産株）*Brachionus rotundiformis*の有効性の確認，摂餌生態や適正な飼育環境の把握により飼育技術が開発され，生理生態や形態学的研究に基づく飼育技術の改良に伴い種苗生産技術は向上し，1988年以降には10万個体を超える生産が可能となっている（福永ら，1990）。しかし，日齢5～10日の仔魚期および仔魚後期から稚魚期にかけての減耗や，第2章で述べたように，仔稚魚期にしばしばウイルス性神経壊死症（VNN）が発生して種苗の安定生産に支障をきたしている（Mori *et al*., 1991）。

シマアジ種苗生産におけるVNNの防除対策としてPCR検査に基づく陰性親魚の選別，受精卵の消毒や飼育用水の殺菌が提案され，これらを総合的に実施することにより本病の発生を防止できることが報告されている（Mori *et al*., 1998；虫明・有元，2000）。ハタ類においてもマハタの種苗生産では，同様の手法がVNNの発生防除に有効であると報告されている（土橋ら，2002）。しかし，キジハタ親魚は，シマアジやマハタに比べて魚体が小さいうえに，産卵期前の未熟な時期にPCR検査用にカニューレなどを用いて生殖腺を採取することが難しい。また，自然産卵では受精率が低いことから，生殖腺採取作業により産卵行動や受精卵の卵質に悪影響を及ぼすことが危惧される。一方，養成されたシマアジ親魚では，天然魚あるいは人工生産魚に関わらず養成期間が長いほど，また，年齢が高いほどSJNNVに対する抗体の検出率が高いことから（Mushiake *et al*., 1992），玉野庁舎ではキジハタのVNN防除対策として，養成期間が1～3年間と短い親魚を用い，ヨード剤による受精卵消毒や紫外線装置（フロンファインNPL-10，日本フォトニクス社）により100 mJ/cm^{2}の紫外線強度で処理した海水（以下，紫外線で処理した海水をUV処理海水と記す）を使用することにより，仔魚期におけるVNNの発生は防除できるようになった（山下，2000；津村，2002）。しかしながら，稚魚を育成中に発生するVNNは依然として問題となっている。また，近年，天然キジハタからPCR法によりベータノダウイルスが検出されており，親魚として用いる天然魚が感染源となる可能性が示されている（Gomez *et al*., 2004；Sakamoto *et al*., 2008）。

そこで，本章では，2002年に玉野庁舎において，種苗生産に用いた親魚や種苗生産された仔稚魚をPCRにより検査し，ウイルスの感染状況を把握するとともに，ウイルスが検出された稚魚群における感染状況を追跡調査した。また，瀬戸内海の2カ所，若狭湾および九州西岸域の合計4カ所の天然海域で漁獲されたキジハタ未成魚におけるベータノダウイルスの感染状況を調査した。これらの疫学調査をもとに，種苗生産場における本種のVNNの感染経路および防除対策について考察した。

3-2　材料および方法

3-2-1　人工飼育キジハタ

（1）養成親魚

1999年の種苗生産では1996年および1998年に香川県伊吹島近海で漁獲された未成魚88個体（平均全長33.5 cm，平均体重763 g），2002年では1999年～2002年に同海域で漁獲された未成魚119個体（平均全長34.1 cm，平均体重581 g）を親魚養成に供した。未成魚は陸上水槽（50 kL）に収容し，砂ろ過海水を流水式紫外線装置（フロンファインNPL-10，日本フォ

トニクス社）で処理（100 mJ/cm^2）したUV処理海水で，モイストペレットを給餌し１～３年間養成した。モイストペレットの組成はマアジ：エビ類（種不明）：スルメイカ *Todarodes pacificus*：配合飼料（日清飼料株式会社製）を１：１：１：３の割合で配合し，総合ビタミン剤を全体量の３％の割合で添加した。自然産卵により得た受精卵を飼育に供した。

(2) 種苗生産および稚魚の育成

1999年はポビドンヨード液（有効ヨウ素濃度50 mg/L）で15分間消毒した受精卵を使用した。飼育初期の環境を安定させるため，ナンノクロロプシス *Nannochloropsis oculata* または濃縮淡水クロレラ *Chlorella vulgaris* および多孔質素材（フィッシュグリーン，グリーンカルチャ社製）を添加した。仔魚には成長に合わせて，シオミズツボワムシ（タイ国産株），アルテミア *Artemia salina* 幼生，配合飼料（協和発酵工業社製）を給餌し，25～27℃の飼育水温で通気を施し飼育した。日齢46と58（平均全長31.8～37.0 mm）でRT-PCR陰性の稚魚11,400個体を取り上げ，陸上水槽内に設置した小割網（4×4×1.5 mおよび2×2×1 m）に収容し，UV処理海水を用いて配合飼料（坂本飼料社製）を給餌し育成した。調査には1飼育例を供した。

2002年はUV処理海水で洗卵した受精卵を飼育水槽（60 kL）に収容し，1999年と同様の餌料系列で飼育した。日齢39～42（平均全長25.5～31.4 mm）でRT-PCR陰性の稚魚78,300個体を取り上げた後，陸上水槽内に設置した小割網に収容し，UV処理海水の流水で配合飼料を給餌し育成した。調査には4飼育例を混合した飼育群を供した。なお，2002年生産魚の一部は日齢200日以降に上浦庁舎に移送し，オゾン処理海水にて自然水温で飼育し調査を継続した。

(3) PCRによるベータノダウイルスの検出

ベータノダウイルスの検出には，RT-PCR法およびnested PCR法を用いた。RT-PCRには1検体当たり1または2個体の頭部（日齢20～50），5個体の片眼（日齢70～80），個体別の目または脳（日齢80以降）を供した。親魚（体重270～1,510 g）では採材した検体50 mgを個体別に検査に供した。採取した材料は，PCR法による検査をおこなうまで-30℃以下で保管した。検査組織からのRNAの抽出には，市販の核酸抽出試薬（アイソジェン，ニッポンジーン社製）を用い，マニュアルに従ってRNAを抽出した。得られたRNAは適当量の0.1% DEPC（diethylpyrocarbonate，ナカライテスク製）処理した超純水で溶解した。抽出したRNA1 μLを鋳型とし，Nishizawa *et al.*（1994）の報告したRT-PCRに準じRNA2のT4領域を増幅した。すなわち，増幅用プライマーとしてF2（5'-CGTGTCAGTCATGTGTCGCT-3'）とR3（5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'）を使用し，逆転写酵素にはSuper Script II Reverse Transcriptase（サーモフィッシャー社），Taq DNA合成酵素には *Takara EX Taq*（タカラバイオ製）を用いた。サーマルサイクラー（GeneAmp PCR System 9700，アプライドバイオシステムズ）により，42℃で30分間の逆転写反応をおこない，次に95℃で40秒間の熱変性，55℃で40秒間のアニーリング，72℃で40秒間の伸張反応のサイクルを30回おこなった。なお，最初の熱変性および最後の伸張反応の時間は5分間とした。続いて，Nishioka *et al.*（2010）の方法に準じ，Nishizawa *et al.*（1997）が報告したT4領域の変異に基づいた4つのベータノダウイルスの遺伝子型のうち，RGNNV遺伝子型に特異的なプライマーであるRG-nf（5'-ACCTGAGGAGACTACCGCTC-3'）とRG-nr（5'-CAGCGAAACCAGCCTGCAGG-3'）を用いnested PCRをおこなった。nested PCRではPCR反応液（10 mMトリス塩酸：pH8.3，50 mM KCl，1.5 mM $MgCl_2$，0.2 mM dNTP）の全量を25 μLとし，Taq DNA合成酵素には *Takara EX Taq*（タカラバイオ製）を2.5 unit，各プライマーを0.2 μMとした。cDNA（complementary DNA）の反応条件は，熱変性が95℃の30秒，アニーリングが65℃の30秒，伸長反応が72℃の30秒とし，最初の熱変性と最後の伸長反応の時間は5分間とした。PCR法により増幅された前述のRT-PCRの増幅産物の1 μLの核酸をテンプレートとし，上述のPCR反応を30サイクルで繰り返した。RT-PCRおよびnested PCRによる増幅産物の解析は，トリスホウ酸/EDTA緩衝液（0.46 M Tris，0.46 Mホウ酸，0.01 M EDTA）で調整した2.0% Nusieve 3:1Agarose（ロンザジャパン社）で電気泳動をおこない，エチジウムブロミドで染色後，トランスイルミネーター（CSF-10CFC，コスモ・バイオ社）により，RT-PCRでは427 bp，nested PCRでは258 bpの増幅産物の有無を確認した。

3-2-2 天然キジハタ

(1) 検査サンプル

天然キジハタの漁獲場所を **Fig. 3** に，個体数および大きさを **Table 6** に示した。2002年9月から2003年12月の間に瀬戸内海の東部（18個体）と中部（75個体），日本海の若狭湾（27個体）および九州西岸域（12個体）の4海域において，延縄あるいは刺し網により漁獲された合計132個体のキジハタ鮮魚を入手した。魚は4℃

で保冷した状態で36時間以内に上浦庁舎に搬入し後速やかに解剖し，眼球の網膜組織，脳，延髄，脊髄，心臓，肝臓，脾臓，腎臓および生殖腺を検査サンプルとして採取した。その際に，腹鰭が切除された魚を放流された人工生産魚と判断した。採取したサンプルは検査に供するまで -80℃で冷凍保存した。

(2) PCRによるウイルス遺伝子の検出と検出率の検定

採取したサンプルのうち約50 mgをRNA抽出に供した。検査サンプルからのRNAの抽出およびPCRによる増幅産物の確認は，前述と同様の方法で実施した。各海域間におけるウイルス遺伝子の検出率の違いについて，RT-PCRでのウイルス検出率ではクラスカル・ワーリス検定を用い，nested PCRによる検出率ではχ二乗検定を使用して有意差を検定した。

(3) 培養細胞によるウイルス分離

PCRによりウイルス遺伝子が検出された一部のサンプルについて，E-11細胞（Iwamoto *et al*., 2000）を用いウイルスの分離を実施した。すなわち，重量を測定したサンプルに9倍量のHBSS（Hank's balanced salt solution）を加え磨砕し，4℃で3,000 rpmの15分間遠心した。回収した上清を孔径0.45 μmのフィルター（Millipore社製）でろ過した後，HBSSで10倍希釈系列を作製した。予め96ウェルのマイクロプレートで培養したE-11細胞に，希釈した磨砕ろ液50 μLを接種した後25℃で10日間培養し，細胞変性効果の発現の有無からReed and Muench法により50%の細胞に対して感染するウイルス濃度をウイルス力価とし$TCID_{50}$/gを求めた。

(4) 分離ウイルスの病原性試験

玉野庁舎で種苗生産されたキジハタ稚魚（平均全長5.3 ± 0.45 mm, 平均体重1.9 ± 0.46 g）を供試魚とした。稚魚は上浦庁舎まで輸送後500 Lの黒色ポリエチレン水槽に収容し，水温25℃で3日間飼育し飼育環境に馴致させた。天然キジハタからE-11細胞により分離したウイルスは，E-11細胞で限界希釈法により3回継代しクローニングした。クローニングしたウイルス株のうち瀬戸内海で漁獲された天然魚由来の1株（RGEhi02株）と若狭湾の天然魚由来の1株（RGFuk02株）および陽性対照としてキジハタ病魚由来のRGOka99株を用いて，キジハタ稚魚に対する病原性試験をおこなった。1試験区あたり20個体を供試し，HBSSでウイルス感染力価を$10^{7.0}$ $TCID_{50}$/mLに調整したウイルス液50 μLを稚魚の背部筋肉内に個体別に接種した後100L水槽に収容した。陰性対照区ではHBSSを同様に接種した。稚魚は水温25～26℃で2週間飼育し死亡率を調査した。ウイルス感染の調査は死亡魚の目および脳のRT-PCR検査で実施した。また，一部の死亡個体ではE-11細胞によりウイルスの再分離や常

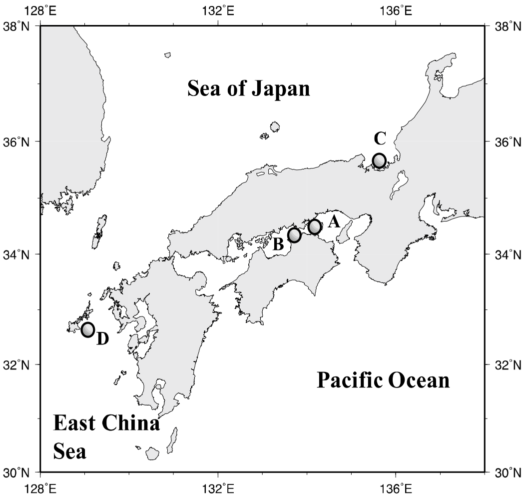

Fig. 3. Sampling sites of the wild redspotted grouper. (A) East area of Seto inland sea; (B) Middle of Seto inland Sea; (C) Wakasa bay in Sea of Japan; (D) West area of Kyusyu.

Table 6. The number and size of wild redspotted grouper examined in this study

Capture place	Capture method	Year	Date	Number of fish	Total length*1(cm)	Body weight *1(g)
East area of Seto inland sea	Gill net	2002 2003	Sep.29 Oct.22, Nov.6, 26, Dec.6, 17	18 *2	30.5±30.0	413±150
Middle area of Seto inland sea	Long line, Gill net	2002 2003	Sep.27 Oct.8, 20, 21, 29, Nov. 7,14	75	29.1±4.7	393±182
Wakasa bay in Japan sea	Gill net	2002 2003	Oct.5 Nov.5	27	23.9±1.4	210±40
West area of Kyushu	Gill net	2002	Oct.25, Nov.6	12	35.0±3.2	717±162
Total				132	29.2±5.1	415±231

*1 Mean ± S.D.
*2 Include four individuals of artificial produced fish.

Table 7. Betanodavirus (RGNNV) detection from the seedling redspotted grouper by PCR method in 1999 and 2002

Year	Days after hatching					
	20-50	70-90	110-120	130-160	450-470	1,300-1,310
1999	0/6*1 (NT*2)	10/10 (NT)	NT	NT	NT	0/26 (18/26)
2002	NT	0/60 (0/60)	0/30 (0/30)	0/35 (6/35)	0/30 (30/30)	NS *3

*1 The number of positive / examined in RT-PCR (nested PCR).
*2 Not tested.
*3 No samples.

Table 8. Betanodavirus (RGNNV) detection from reared brood stock of redspotted grouper by PCR method in 1999 and 2002

Year	Number of fish	Number of positive / examined in RT-PCR (nested PCR)		
		Eye	Brain	Gonad
1999	124	ND*	ND	0/124 (0/124)
2002	10	0/10 (0/10)	0/10 (0/10)	ND

* No data.

Table 9. Detection of betanodavirus (RGNNV) from the wild redspotted grouperby PCR method

Captured area	RT-PCR	Nested PCR
East area of Seto inland sea	0/18 *1(0) *2	4/18*1 (22.2)
Middle area of Seto inland sea	3/75 (4.0)	22/75 (29.3)
Wakasa bay in Sea of Japan	2/27 (7.4)	14/27 (51.9)
West area of Kyusyu	1/12 (8.3)	4/12 (33.3)
Total	6/132 (4.5)	44/132 (33.3)

*1 Include four individuals of artificial produced fish.
*2 The number of positive fish / examined fish (%) in retina, brain or spinal cord.

法により作製した目の組織切片を Nguyen *et al.* (1996) の方法に準じて抗 SJNNV ウサギ抗体を用い IFAT（Indirect fluorescent antibody method）により特異抗原の検出をおこなった。

3-3　結　果

3-3-1　人工飼育キジハタ

(1) PCR による稚魚からのベータノダウイルスの検出

1999 年および 2002 年に生産された稚魚の PCR 法によるベータノダウイルスの検出状況を **Table 7** に示した。1999 年生産魚では，日齢 20 ～ 50 の仔稚魚では PCR 陰性であったが，中間育成過程の日齢 70 ～ 90 で一部の稚魚が旋回遊泳などの異常行動を示し，これらの個体は RT-PCR 陽性であった。しかし，その後 VNN の症状を示す個体は飼育群全体に拡大せず，死亡も観察されなくなったが，約 3 年間育成した日齢 1,300 ～ 1,310 の時期に検査した 26 検体では，RT-PCR では陰性であったものの，nested PCR では 18 検体からウイルス遺伝子が検出された。

2002 年生産魚では，VNN の症状を示す死亡は認められなかったが，日齢 110 ～ 120 の時期に放流用として他機関へ輸送した稚魚が，輸送先において VNN の症状を呈し，死亡個体が PCR 陽性であったことから VNN の発生が確認された。他機関へ輸送した稚魚と同じ生産群で玉野庁舎にて育成中の魚のウイルス感染状況を調査したところ，日齢 70 ～ 120 の 90 検体は，RT-PCR と nested PCR のいずれも陰性であった。しかし，日齢 130 ～ 160 の 35 検体では，RT-PCR は陰性であったが nested PCR では 6 検体が陽性であった。その後，約 1 年 2 ヵ月まで育成した日齢 450 ～ 470 の 30 検体では，nested PCR がすべての検体で陽性であった。PCR でウイルス遺伝子は検出されたが，この飼育群で VNN の特徴的な症状を示す稚魚や死亡は認められなかった。

(2) PCR による親魚からのベータノダウイルスの検出

1999 年および 2002 年の養成親魚の PCR 法によるベータノダウイルス遺伝子の検出結果を **Table 8** に示した。1999 年の養成親魚では，124 個体の生殖腺を，2002 年の養成親魚では 10 個体について眼および脳をそれぞれ検査した結果，いずれの検体においても RT-PCR，nested-PCR ともに陰性であった。

3-3-2　天然キジハタ

(1) PCR 法によるウイルス検出

PCR 法による天然キジハタからのウイルス検出結果を **Table 9** に示した。瀬戸内海東部で漁獲された 18 個体のうち，RT-PCR 法ではウイルス遺伝子は検出されなかったが，nested PCR では 4 個体（検出率 22.2%）からウイルス遺伝子が検出された。同様に瀬戸内海中部で漁獲された 75 個体では 3 個体（検出率 4.0%）と 22 個体（検出率 29.3%），若狭湾で漁獲さ

Table 10. Detection of betanodavirus (RGNNV) from each tissue of wild redspotted grouper by PCR method

Captured area	No. of fish	Detection rate by RT-PCR (nested PCR) (%)								
		Retina	Brain	Oblongata	Spinal cord	Heart	Liver	Spleen	Kidney	Gonad
A	18*	0 (22.2)	0 (16.7)	0 (11.1)	0 (11.1)	0 (16.7)	0 (16.7)	0 (16.7)	0 (11.1)	0 (11.1)
B	75	4.0 (26.7)	2.7 (29.3)	1.3 (24.0)	1.3 (26.7)	0 (26.7)	0 (21.3)	0 (25.3)	0 (18.7)	0 (8.3)
C	27	3.7 (51.9)	3.7 (51.9)	7.4 (40.7)	3.7 (44.4)	0 (3.7)	0 (0)	0 (0)	0 (3.7)	0 (0)
D	12	8.3 (25.0)	8.3 (16.7)	0 (16.7)	0 (33.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	132	3.8 (31.1)	3.0 (31.1)	2.3 (25.0)	1.5 (28.8)	0 (18.2)	0 (14.4)	0 (16.6)	0 (12.9)	0 (6.0)

A: East area of Seto inland sea; B: Middle area of Seto inland sea; C: Wakasa bay in Sea of Japan; D: West area of Kyusyu.

* Include four individuals of artificial produced fish.

Table 11. Detection and isolation of betanodavirus (RGNNV) from the wild redspotted grouper in 2002

Captured area	RT-PCR	Nested PCR	Cell culture
Middle area of Seto inland sea	3/10 (30.0)*	6/10 (60.0)	4/ 6 (66.6)
Wakasa bay in Sea of Japan	2/15 (13.3)	7/15 (46.7)	4/ 7 (57.1)
West area of Kyushu	2/12 (16.6)	3/12 (25.0)	0/ 3 (0)
Total	7/37 (18.9)	16/37 (43.2)	8/16 (50.0)

* The number of positive fish / examined (%) in retina, brain or spinal cord.

れた 27 個体では 2 個体（7.4%）と 14 個体（51.9%），九州西岸域で漁獲された 12 個体では 1 個体（16.7%）と 4 個体（25.0%）であった。調査海域全体では 132 個体のうち RT-PCR で 6 個体（4.5%），nested PCR で 44 個体（33.3%）からウイルス遺伝子が検出され，検出率はいずれの海域においても nested PCR の方が高かった。瀬戸内海東部で漁獲されたキジハタ 18 個体のうち 4 個体は，腹鰭の切除が認められ人工生産魚と判断され，何れの個体からもウイルス遺伝子は検出されなかった。RT-PCR によるウイルス検出率は，海域間で有意差は認められなかったが，nested PCR による検出率では，瀬戸内海東部と若狭湾および瀬戸内海中部と若狭湾の間には，それぞれ有意差（$p < 0.05$）が認められた。

組織別の PCR によるベータノダウイルスの検出結果を **Table 10** に示した。網膜組織，脳，延髄，脊髄の神経組織のいずれかにおけるウイルス検出率は，RT-PCR で 3.8%，nested PCR で 31.1%であったのに対し，心臓，肝臓，脾臓，腎臓および生殖腺のいずれかの組織では，nested PCR でのみ 18.2%が陽性であった。

(2) 培養細胞によるウイルス分離

PCR 法で陽性となった一部のサンプル（網膜組織，脳および延髄）からの E-11 細胞によるウイルス分離

Table 12. Mortalities in juvenile redspotted grouper after challenge with betanodavirus (RGNNV)

Strain	Mortalities (%) in 14 days
RGEhi02 *1	55 (11/20) *4
RGFuk02 *2	30 (6/20)
RGOka99 *3	20 (4/20)
Control	0 (0/20)

*1 Isolate from wild redspotted grouper in West area in Seto inland sea.

*2 Isolate from wild redspotted grouper in Wakasa bay in Japan sea.

*3 Isolate from diseased juvenile redspotted grouper during seedling production in 1999.

*4 The number of dead fish / examined fish.

結果を **Table 11** に示した。ウイルスが分離された個体は，瀬戸内海中部のキジハタでは 6 個体のうち 4 個体，若狭湾の個体では 7 個体のうち 4 個体であり，いずれも RT-PCR 法で陽性のサンプルであった。九州西岸の nested PCR 陽性・RT-PCR 陰性の 3 個体からは，ウイルスは分離されなかった。ウイルス感染力価は，網膜組織では $10^{3.8}$ ～ $10^{7.8}$ $TCID_{50}/g$，脳では $10^{3.2}$ ～ $10^{7.3}$ $TCID_{50}/g$，延髄では $10^{3.9}$ ～ $10^{5.7}$ $TCID_{50}/g$ であった。

(3) 分離ウイルスの病原性試験

キジハタ天然魚から分離した RGNNV 株（RGEhi02 株，RGFuk02 株）を用いた病原性試験の結果を **Table 12** と **Fig. 4** に，RGEhi02 株攻撃区と陽性対照の RGOka99 株攻撃区の死亡魚の網膜組織の IFAT 結果を **Fig. 5** に示した。HBSS を接種した陰性対照区では死亡魚は認められなかった。14 日後の累積死亡率は RGEhi02 株攻撃区で 55.0%，RGFuk02 株攻撃区が 30.0%および病魚由来の RGOka99 株攻撃区が 20.0%であった。死亡魚について RT-PCR で検査をおこなっ

た結果，全ての死亡魚の網膜および脳からウイルス遺伝子が検出され，E-11 細胞でウイルスが再分離された。また，供試したすべての死亡魚の網膜組織にベータノダウイルス特異抗原の存在が確認された（**Fig. 5**）。

3-4 考　察

玉野庁舎におけるキジハタ種苗生産過程での VNN の発生は 1991 年～ 1994 年まで認められた。異常遊泳を伴う大量死亡は，全長 3 ～ 16mm（日齢 10 ～ 35）の仔魚期に発生した（吉田，1994）。また，全長 7 ～ 20mm の仔魚期における VNN の発症と大量死亡は，旧広島県水産試験場（現広島県水産海洋技術センター）においても認められている（Mori *et al.*, 1991）。主として親魚からの垂直伝播により発生するシマアジの VNN では，日齢 10 までの仔魚期に発生することが，垂直伝播を示す一現象と考えられており（Arimoto *et al.*, 1992），キジハタの仔魚期に発生する VNN もシマアジの VNN と同様に，親魚からの垂直伝播が関与していると推定される。本研究で調査した養成親魚の PCR 検査では，目や脳および生殖腺からウイルス遺伝子は検出されず，養成親魚がベータノダウイルスに感染していることを明らかにできなかった。一方，シマアジの養成親魚における SJNNV に対する抗体価は，養成期間は長いほど，年齢は高いほど検出率が高くなる傾向を示し，抗体の陽性率の上昇は親魚体内でのウイルスの増殖を裏付けると考えられている（Mushiake *et al.*, 1992；虫明，2000）。玉野庁舎のキジハタ種苗生産で仔魚期に VNN が発生した 1991 年～ 1994 年における親魚群の養成年数は 2 ～ 8 年であるが，養成期間が長い親魚群では，種苗生産に用いた卵数が多くなっており（野上，1994），VNN 防除対策として養成期間が 3 年までの親魚の使用やヨード剤による卵消毒および UV 処理海水を用いた飼育により，種苗生産過程での VNN の発生は認められなくなった（山下，2000）。これは，養成期間の長い親魚群からの受精卵を使用せずに，さらに受精卵消毒と UV 処理海水の使用により，親魚からのベータノダウイルスの垂直伝播の機会が低減され，VNN の発生件数が減少したものと考えられる。このことから，キジハタもシマアジと同様に，長期間の養成期間中に親魚体内でウイルスが増加していると想定される。

シマアジの VNN ではポビトンヨードによる受精卵消毒のみでは，仔魚への SJNNV 感染を阻止できない（虫明，1994；有元，1995）。1999 年と 2002 年のキジハタ受精卵の消毒による VNN 防除対策では，ごく微量なウイルス感染を防止できなかったため，仔魚期に VNN の発症はなかったものの，稚魚期において一部の個体で VNN の発症や nested PCR によりウイルス遺伝子が検出されたと推測される。一部で VNN が発生した 1999 年生産魚では，3 年後においても nested PCR でベータノダウイルスの感染が確認され，3 ～ 5 ヵ

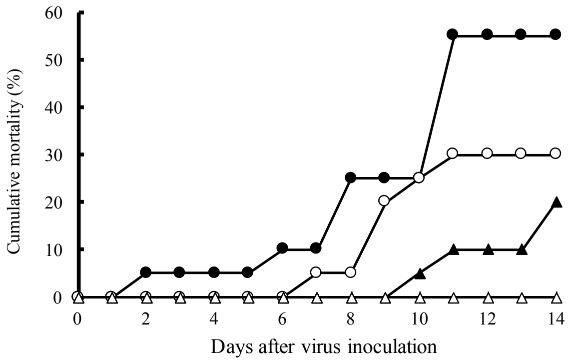

Fig. 4. Cumulative mortalities in juvenile redspotted grouper injected with betanodavirus (RGNNV). The fish were injected with different strain of betanodavirus at dose of $10^{7.0}$ $TCID_{50}$/fish and reared at 25 ℃ . RGEhi02 (●), RGFuk02 (○), RGOka99 (▲), Control (△).

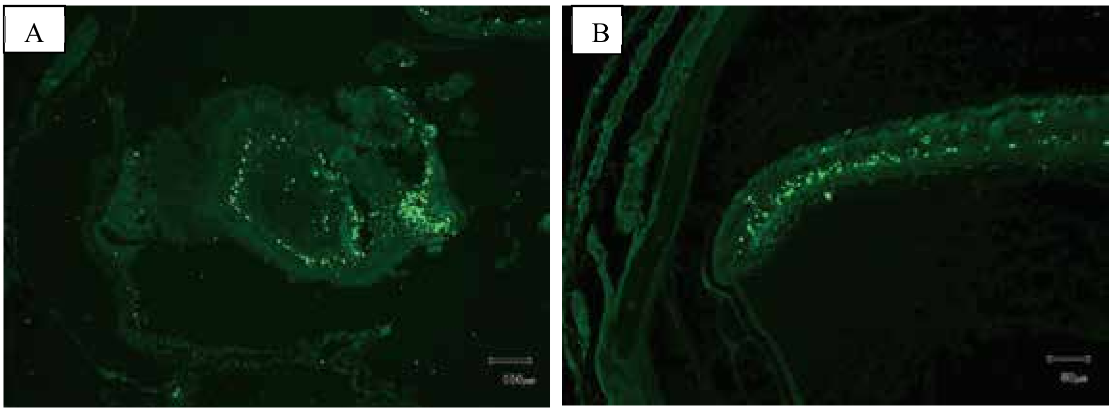

Fig. 5. Specific fluorescence in the retina of dead redspotted grouper challenged with betanodavirus (RGNNV). (A) RGEhi02; (B) RGOka99.

月育成後にPCR でウイルス遺伝子が検出された2002年生産魚では，約1年2ヵ月後においてもウイルス遺伝子が検出された。これらのことは，ベータノダウイルスに感染したキジハタでは，体内からウイルスを完全に排除できず，長期間にわたり不顕性感染していることを示している。感染状況を調査した2002年生産魚では，nested PCR による検出率が日齢130 ～ 160では17.1%であったが，日齢450 ～ 470では100%に達したことから，魚体内においてウイルスが標的器官やその他の部位で増殖していると考えられる。これらの稚魚では，培養細胞を用いたウイルス分離をおこなっておらず，感染性を有するウイルスを保有しているかは不明であるが，長期間あるいは生涯にわたって感染が持続する持続感染の状態と考えられる（本間，1997）。

天然キジハタにおけるベータノダウイルスの感染状況では，日本沿岸の4海域で漁獲された天然キジハタ132個体をPCR 法で検査した結果，いずれの海域で漁獲されたキジハタからもRGNNV 遺伝子型に特異的なnested PCR によりウイルス遺伝子が検出され，その陽性個体の一部からは，キジハタ稚魚に病原性を示すウイルスがE-11細胞で分離された。これらのことから，天然に広範囲に生息しているキジハタが，感染性を有するRGNNV 型のベータノダウイルスを保有していることが明らかになった。したがって，天然キジハタを養成した親魚の種苗生産への使用は，種苗生産場で発生するVNN の感染源となると考えられる。

我が国の周辺海域の天然魚におけるベータノダウイルスの検出では，これまでに，7目16科27種の魚類からPCR 法によりウイルス遺伝子が検出されている（Gomez *et al.*, 2004；Sakamoto *et al.*, 2008）。本邦沿岸域で漁獲された天然魚でPCR 法によるウイルス遺伝子の検出が高い魚種の検出率は，RT-PCR ではマダイが10.0%，ブリ，カツオ *Katsuwonus pelamis* およびキハダ *Thunnus albacares* は，それぞれ3.3%であり，RGNNV 遺伝子型とSJNNV 遺伝子型を合わせたnested PCR では，カイワリ *Kaiwarinus equula* が46.2%，マアジが30.0%，カツオが23.3%，マサバとゴマサバ *S. australasicus* が20.0%であった（Sakamoto *et al.*, 2008）。本研究における天然キジハタのウイルス検出率は，RT-PCR で4.5%，RGNNV 遺伝子型のnested PCR では33.3%であり，これまでに日本沿岸の天然魚で報告されているウイルス検出率と比較すると，キジハタはウイルス検出率が高い魚種に位置付けられる。一方，4海域におけるnested PCR のウイルス検出率では，若狭湾と瀬戸内海東部および瀬戸内海中部との間に，χ二乗検定（$p < 0.05$）により有意差が認められ，海域によって天然キジハタのウイルス感染の状況が異なると考えられる。この結果からウイルスの感染率が低い海域から親魚候補の天然魚を搬入することは，種苗生産場へウイルス感染魚を持ち込む確率を低減できる可能性を示す。天然クルマエビのPRDV（Penaeid rod-shaped DNA virus）の検出率では，年や季節により変動することが知られていることから（虫明ら，1998），複数の海域における天然キジハタのウイルス検出率を定期的に調査し，海域間や入手時期と検出率の違いを把握する必要があろう。それらのデータは，親魚候補を導入する時期や地域を選定する際の貴重な情報になり得る。PCR 法によるウイルス遺伝子の検出では，RT-PCR で陽性となった検体は，nested PCR では全て陽性となった。nested PCR はRT-PCR の増幅産物を鋳型としPCR を行うことから，RT-PCR が陰性でnested PCR が陽性となる検体があり，検出率は何れのサンプルにおいてもnested PCR の方が高かった。したがって，天然魚におけるウイルス感染の有無を調査するには，nested PCR を用いることが有効であると考えられる。さらに，ウイルスを検出する組織としては，神経系の器官である網膜組織，脳，脊髄，延髄が適当であると考えられた。Sakamoto *et al.*（2008）は，RT-PCR 法あるいはnested PCR 法で陽性となった天然魚87個体の脳または目からE-11細胞を用いてウイルス分離を試みたが，ウイルスは分離されていない。また，カナダの天然のwinter flounder *Pleuronectes americanus* では目と脳の組織をプールしSSN-1（Frerichs *et al.*, 1996）細胞を用いてウイルスの分離をおこなった結果，440個体中わずかに1個体からウイルスが分離されたのみであった（Barker *et al.*, 2002）。本研究においてE-11細胞でウイルスが分離されたサンプルは，RT-PCR 法で陽性であった。RT-PCR 法の検出限界が約$10^{3.5}$ $TCID_{50}$/mL のウイルス感染力価であることから，ウイルスの分離率が50%と高かったのは，これらの魚体内のウイルス感染力価が$10^{3.5}$ $TCID_{50}$/mL 以上であったことによると考えられた。

本研究に用いた天然キジハタは，延縄や刺し網で漁獲されていることから健常魚と考えられるが，一部の個体では，網膜で$10^{7.8}$ $TCID_{50}$/g，脳から$10^{7.3}$ $TCID_{50}$/g の高いウイルス感染力価が測定され，かつnested PCR により主要臓器である心臓，肝臓，脾臓，腎臓，生殖腺からウイルス遺伝子が検出された。このような個体は，体内に微量のウイルスを保有した持続感染状態とは考え難く，漁獲された時点で感染が進行している状態と考えるのが妥当と思われる。また，天然キジハタでベータノダウイルスが感染して発病状態にある

例が報告されている（Gomez *et al*., 2009）。これらの結果を考え合わせると，本ウイルスがキジハタ天然魚の生存に少なからぬ関わりをもっているものと思われる。

以上，本章で述べてきたように，VNN を発症した稚魚では，1,300 日以上においてもウイルスを排除できず，親魚候補の天然キジハタのウイルス感染状況は，海域により異なってはいるもののウイルスに感染している個体が存在することから，キジハタの種苗生産過程における VNN の発生は，親魚からの垂直伝播によると推定された。玉野庁舎では 1991 年から 1994 年に発生した VNN では，主に仔魚期で大量死亡を伴った。その後，養成期間が 3 年以内の親魚からの受精卵をポビドンヨード剤で卵消毒し，UV 処理海水を用いる防除対策をおこなうことにより，種苗生産段階での VNN の発生はなくなった（山下，2000）。しかし，稚魚を取り上げた後の育成期に一部の稚魚で VNN の発生が認められる場合や，発病はないものの nested PCR によりウイルス遺伝子が検出されるようになった。このように VNN の発病やベータノダウイルスの検出が，仔魚期から稚魚期へと時期が遅くなったのは，上述した防除対策により親魚からの感染ウイルス量が低減されたためと考えられる。実際に，伯方島庁舎での 1999 年の種苗生産において，すくなくとも 5 年以上（正確な養成年数は不明）の長期間養成されていた親魚群からの受精卵を使用し，ポビドンヨード剤による卵消毒をおこない UV 処理海水により種苗生産した飼育例では，日齢 25 の仔魚期に VNN が発生し廃棄処分している（津村，2001）。このことから，キジハタにおける防除対策のうち，養成期間が短い親魚の利用が最も有効な対策となっていると推察される。

第 4 章　アカアマダイにおけるウイルス性神経壊死症の防除対策

4-1　はじめに

第 2 章の疾病発生状況においてアカアマダイのウイルス性神経壊死症（VNN）が，複数年にわたり発生していることを示した。また，第 3 章において種苗生産に使用する親魚候補の天然キジハタがウイルスに感染していることを示し，天然魚が種苗生産場での VNN の感染源となり得ることを明らかにした。本章では，キジハタと同様に天然親魚から受精卵を確保し，種苗放流用に人工生産するアカアマダイについて，VNN の発生状況の把握，感染経路の推定および本種の種苗生産工程に合わせた防除対策について検討した。

アカアマダイは，日本の本州中部以南から東シナ海の水深 30 ～ 200 m に生息する暖海性の底魚で，京阪神を中心に商品価値が高く，マダイやヒラメに劣らない高級魚として沿岸漁業の重要な水産資源となっている（奥村，1999）（**Fig. 6**）。しかし，近年は漁獲量が減少しつつあり，アマダイ類（シロアマダイ *Branchiostegus albus*，キアマダイ *Branchiostegus auratus* を含む）の漁獲量は，1986 年の 11,451 トンをピークとして 2000 年にかけて急激に減少し，2005 年以降は，1,000 トンから 1,500 トンの低位で推移している（**Fig. 7**）。そのため栽培漁業の対象種として取り上げられ，2007 年には 3 機関で平均全長 30 mm サイズの種苗が約 8 万個体生産されている（水産庁ら，2009）。

宮津庁舎では 1984 年からアカアマダイ親魚の養成技術および種苗生産技術の開発をおこなっており（本藤ら，2001），2004 年には平均全長 98 mm サイズの稚魚 1.6 万個体を放流するに至った。しかし，2004 年に種苗生産され 2005 年に放流用として育成していた稚魚に少なからぬ死亡が発生し，それらの死亡魚および

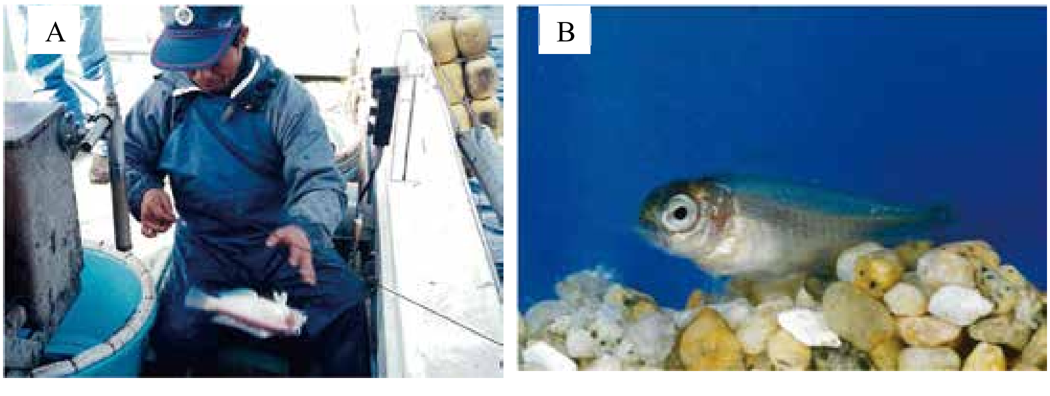

Fig. 6. A red tilefish was captured by a longline fishing (A); Artificial seedling of red tilefish, Total length = 30 mm (B).

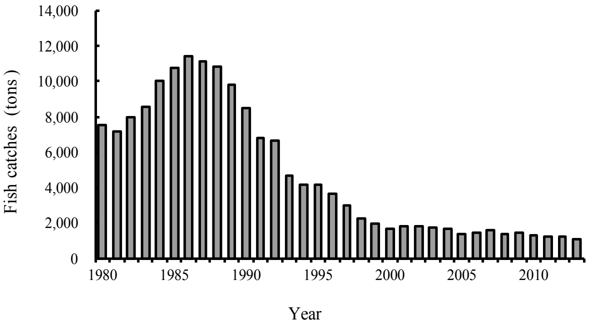

Fig. 7. Capture production for a tilefish (Annual report for fisheries and aquaculture of production statistics).

生残魚からVNNの原因ウイルスであるベータノダウイルスが検出されたため放流を中止した。放流には重要な疾病であるVNNの感染が認めらない種苗のみが用いられることから，VNNはアカアマダイの栽培漁業を推進する上での障害の一つとなっている。

本章では，まず，アカアマダイ稚魚でのVNNの発生を病理組織学的観察，ウイルスの分離および分離ウイルスの遺伝子解析をおこなった。遺伝子解析により原因ウイルスがRGNNV型遺伝子であったことから，本遺伝子型に感受性が高いマハタを用いて感染試験により病原性を確認した。また，異なる飼育水温によるVNNの影響を調査した。次に，ウイルスの感染経路を推定するため，親魚として使用する天然アカアマダイや生産現場で餌料として使用する天然魚介類についてウイルス調査をおこない，それらの結果に基づいて本種の種苗生産におけるVNNの防除対策を講じた。

4-2　材料および方法

4-2-1　アカアマダイの種苗生産

種苗生産の雌親魚として，長崎県（2004年），山口県（2004年），島根県（2004年）および京都府（2004～2009年）の日本海側の沖合で延縄により漁獲された天然魚を用いた（**Fig. 8**）。魚は，生かした状態でそれぞれの県下にある漁業協同組合または水産試験場へ輸送した。雌親魚は，魚体重1 kgに対してHCG（human chorionic gonadotropin，帝国臓器製薬）を300 IUの割合で背筋肉中に注射して成熟を誘導した。人工的に搾出した成熟卵に天然の雄親魚から採取した精子を媒精して受精卵を得た。なお，精子は採取後，人工精漿（Morisawa, 1985）で冷蔵保存し，保存期間が72時間以内のものを用いた。得られた受精卵を輸送して宮津庁舎での種苗生産に使用した。受精卵は，2004年では流量調整した砂ろ過海水を紫外線殺菌装置（フロンファインNPL-22，日本フォトサイエンス社製）で処理した（照射量100 mJ/cm^2）UV処理海水を満たした100 L水槽に収容し，浮上した卵のみを飼育水槽である50 kLコンクリート水槽へ収容した（卵密度：1.9～2.8万粒/kL）。2005～2009年は，後述するVNN防除対策を施した後，受精卵を0.3～3.5万粒/kLの密度で飼育水槽へ直接収容した。

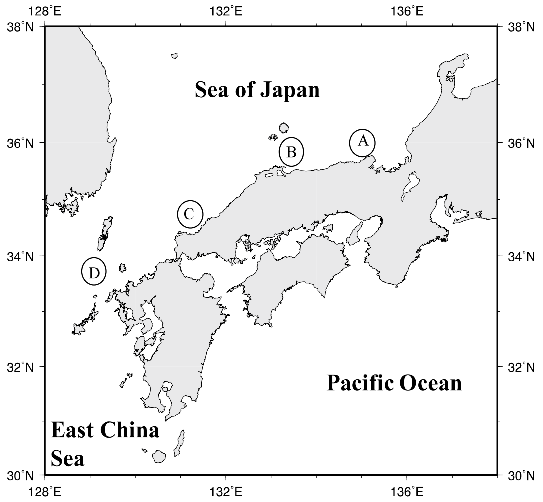

Fig. 8. Location of the wild red tilefish sampling sites.
(A) Offshore sea area of Kyoto;
(B) Offshore sea area of Shimane prefecture;
(C) Offshore sea area of Yamaguchi prefecture;
(D) Offshore sea area of Nagasaki prefecture.

ふ化仔魚の飼育では，2004年はシオミズツボワムシ（タイ国産株）を日齢3から，シオミズツボワムシ（小浜株）を日齢12から給餌し，その後は成長に合わせてアルテミア幼生，また場合によっては市販の冷凍したコペポーダ *Apocyclops royi*，イサザアミ *Neomysis intermedia* やジンケンエビ *Plesionika semilaevis* のミンチ肉を与え，最後は配合飼料を給餌した。2005年以降の飼育には，冷凍コペポーダとエビ類は使用しなかった。飼育水温は20～23℃に調整し，日齢43～75（全長約19～59 mm）に達した時，稚魚を飼育水槽から取り上げ，放流まで別の水槽に移して配合飼料で育成した。育成期間中は，2004年は水温を20℃から徐々に低下させて16℃とし，2005年以降は自然水温（12℃）にまで低下させた。

4-2-2　アカアマダイ稚魚におけるVNN検査

2004年12月から2005年の1月にかけて水温16℃で飼育中の稚魚（日齢61～90，n=20～60），およびこの間に死亡した魚（日齢80～86，n=48）からそれらの目または脳を採材した。Nishioka *et al.*（2010）に従ってPCR法（RT-PCR, nested PCR）によりベー

タノダウイルスの外被タンパク質遺伝子の検出，E-11細胞（Iwamoto *et al*., 2000）を用いたウイルス分離と感染力価の測定，およびウイルス遺伝子解析をおこなった。また，10％中性緩衝ホルマリンで固定した病魚の目および脳（n=3）について，パラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン・エオシン染色を施して病変（空胞形成）を観察した後，Nguyen *et al*.（1996）の方法に準じて，抗SJNNVウサギ抗体を用いた蛍光抗体法によりウイルス抗原を検出した。

4-2-3 ウイルス遺伝子の塩基配列の解析

RT-PCRで得られたPCR産物を，Freeze'N Squeezeスピンカラム（バイオラッド社製）を用いてマニュアルに従いアガロースゲルから精製した。精製した核酸は，シークエンス用のプライマーを用いABI Prism dye terminator cycle sequencing ready reaction kit（アプライドバイオシステムズ社製）により増幅した後，ABI PRISM3130xl ジェネティックアナライザー（アプライドバイオシステムズ社製）によりシークエンスをおこなった。ウイルス間の遺伝的類縁関係は，塩基置換数に基づき，近隣結合法によって作成した分子系統樹を用いて検討した。近隣結合法の計算にはPHYLIP version 3.2（Felsenstein, 1989）を用い，ブートストラップ法により1,000回の試行検定をおこなった。遺伝的類縁関係を比較するためにベータノダウイルスの各遺伝子型の代表株，すなわち，SJNNV遺伝子型にはSJOri株（Nishizawa *et al*., 1997），TPNNV遺伝子型にはTP93Kag株（Nishizawa *et al*., 1997），BFNNV遺伝子型にはBF93Hok株（Nishizawa *et al*., 1997），RGNNV遺伝子型にはJF93Hir株（Nishizawa *et al*., 1997）およびRG91Tok株（Nishizawa *et al*., 1997）を用いた。

4-2-4 分離ウイルスのマハタに対する病原性

分離したベータノダウイルスの病原性の確認は，人工生産されたマハタ稚魚（全長22.6 ± 1.5 cm，体重197 ± 33g）に対する攻撃試験によりおこなった。アカアマダイ病魚由来の分離株（RTKyo04）を接種する試験区と，マハタ病魚由来の分離株（SGWak97；Iwamoto *et al*., 2000）を接種する陽性対照区，HBSS（Hank's balanced salt solution, Gibco社製）を接種する陰性対照区を設定し，それぞれ2水槽を設けた。1試験区1水槽につきマハタ稚魚5個体を供試し，$10^{7.0}$ $TCID_{50}$/mLに調整したウイルス液またはHBSSを腹腔内に1個体当たり100 μLずつ注射した。稚魚は，砂ろ過海水を流水式電解殺菌装置（ESF-30，荏原実業社製）により生成した電解オキシダントと反応させた後，オキシダントを活性炭で除去した海水（以下，電解処理海水）を用いて25℃で流水飼育し，適宜配合飼料を給餌して14日間観察した。

4-2-5 ウイルス保有調査

VNNの感染源を推定するために，宮津庁舎で育成試験用に飼育していたアカアマダイ親魚（全長28.8 ± 2.1cm，n=3），ならびに親魚の餌として使用していたマアジ（全長22.1 ± 1.6cm，n=8），稚仔魚の餌であるジンケンエビ（体長4.7 ± 6.1cm，n=10），イサザアミ（全長5.0 ± 0.6mm）およびコペポーダ（体長600 ～ 800 μm）をPCR検査に供した。養成アカアマダイ親魚，マアジ，ジンケンエビは目を個体別に検査した。イサザアミは1検体当たり3個体の目と脳を供試し（n=3），コペポーダは1検体当たり700 ～ 900個体をプールして検査に供した（n=3）。また，2005年の4月または9月に京都府，島根県，山口県および長崎県の日本海側の沖合で延縄により漁獲された天然アカアマダイ（全長28.7 ± 2.1cm，n=234）について，それらの目と脳および生殖腺を個体別に検査した。

4-2-6 飼育水温とVNN発生の関係

アカアマダイの種苗生産時の飼育水温（20 ～ 23℃）と育成時における飼育水温（12 ～ 16℃）を設定し，飼育水温とVNN発生の関連を調査した。2005年1月5日にnested PCRによる検出率が1.7％（n=60）の水槽から，無作為に取りあげた400個体のアカアマダイ稚魚（全長4.8 ± 0.5 cm, 体重1.7 ± 0.4 g）を用いた。稚魚は，酸素封入した海水とともにビニール袋に入れ，発泡スチロールで梱包し上浦庁舎に輸送した。水温馴致させた稚魚は100L水槽4個に90個体ずつ収容した。試験区はそれぞれ2区を設け，飼育水温の違いにより加温区（21.3 ± 0.8℃）と無加温区（14.3 ± 0.5℃）を設定した。試験期間は3週間とし，配合飼料を適宜給餌し電解処理海水の流水で飼育した。ウイルス感染状況を調査するため，試験開始時の稚魚（n=20），試験期間中の死亡魚，および試験終了時の生残個体（n=10）の眼球を採材し，個体別にPCR法で検査した。

4-2-7 VNN防除対策

VNNの防除を目的として，2004年から2009年における種苗生産過程で，親魚からの垂直伝播と飼育水

からのウイルス伝播を防除するために，親魚のウイルス検査，受精卵の消毒，および用水の殺菌方法について検討した。すなわち，Ⅰ）親魚のウイルス検査や卵消毒はおこなわず，用水にUV処理海水を使用した。Ⅱ）人工授精に使用した雌雄親魚の目をnested PCRで検査し，陰性の親魚から得た受精卵を消毒することなく生産に供し，用水にはUV処理海水または電解処理海水を用いた。なお，親魚のPCR検査結果が判明するまで，受精卵は人工授精のロット毎に，約15 Lの UV処理海水または電解処理海水を満たした22 L水槽に収容し無通気で管理した。Ⅲ）同じくnested PCR陰性の親魚から得た受精卵を使用し，それらを電解オキシダント（0.5 mg/L）を含む海水で1分間消毒して生産に供した。用水には電解処理海水を用いた。なお，オキシダント濃度は，o-トリジン法により測定した（三村ら，1998）。Ⅳ）未受精卵からのウイルス除去を目的として，雌親魚から採取した未受精卵を9倍量の人工卵巣液（160 mM NaCl，4.2 mM KCl，1.1 mM $MgCl_2$，2.2 mM $CaCl_2$，2.0 mM glucose，20 mM HEPES，pH 7.5）で3回洗浄後，nested PCRで陰性と判断された雄親魚の精子と受精させた。受精卵は電解オキシダントで1分間消毒後，電解処理海水を用いて飼育した。これらの試験において，各日齢で仔稚魚のウイルス検査をPCR法でおこなった。1検体当たりの個体数と検査部位を，日齢0～10では5個体または10個体の全身，日齢11～40では2～5個体で全身，頭部，眼球，眼球と脳，日齢41以降では2または3個体で目または目と脳とした。1回の検査で10～60個体を検査した。

4-3　結　果

4-3-1　アカアマダイ稚魚におけるVNNの確認

2004年に全長約20 mm（日齢49～52）に成長したアカアマダイ稚魚を取り上げ，放流に供するまで4水槽で育成した。育成期間中の生残魚と死亡魚のPCR検査結果を**Table 13**に示した。12月下旬に，No.1水槽で水面近くや水底で回転遊泳するなどの異常遊泳をする個体が出現し，その後死亡する個体が認められた（**Fig. 9**）。RT-PCR検査の結果，それらの一部からウイルス遺伝子が検出された。やや遅れて，2005年の1月には，No.3水槽においても，同様の行動を示す衰弱個体が認められ，それらの一部がRT-PCR陽性であった。No.2とNo.4水槽では，異常行動を示す稚魚は認められず，生きていた魚ではRT-PCRはすべて陰性であった。ただし，No.2水槽の1個体の死亡魚で陽性となった。これらのアカアマダイからのRT-PCR増幅産物（RTKyo04，RTKyo05）の塩基配列をSJNNV（SJOri株），TPNNV（TPKag93株），BFNNV（BF93Hok株）およびRGNNV（JF93Hir株，RG91Tok株）と比較し，その類縁性を系統解析した結果，これらはすべてRGNNV遺伝子型に分類された（**Fig. 10**）。病理組織学的検査の結果，一部の検査魚の脳（嗅脳部）にVNNの特徴である空胞変性が確認され，抗SJNNVウサギ抗体を用いた間接蛍光抗体法によりベータノダウイルス特異抗原が検出された（**Fig. 11**）。また，RT-PCR陽性であった死亡魚の目または脳の磨砕液を接種したE-11細胞に，細胞の球型化を伴う細胞変性効果が認められ（**Fig. 12**），その感染力価は，目で$10^{6.7}$～$10^{8.2}$ $TCID_{50}$/g，脳で$10^{6.6}$～$10^{9.1}$ $TCID_{50}$/gであった。

4-3-2　分離ウイルスのマハタに対する病原性

アカアマダイ病魚由来のベータノダウイルス株（RTKyo04）を接種した試験区1とマハタ病魚由来のウイルス株（SGWak97）を接種した試験区2（陽性対照区）およびHBSSを接種した試験区3（陰性対照

Table 13. RT-PCR detection of betanodavirus coat protein gene in juvenile red tilefish reared at Miyazu laboratory in 2004

Tank No.	Live fish		Dead fish
	Dec. 20, 2004	Jan. 5, 2005	Dec.30, 2004-Jan. 4, 2005
1	7/20*1	NT*2	11/27
2	0/20	0/60	1/21
3	0/20	8/60	NT
4	NT	0/60	NT

*1 No. of fish positive / examined.
*2 Not tested.

Fig. 9. The moribund or abnormal swimming included loss of balance of fish around water surface in red tilefish juveniles affected with VNN.

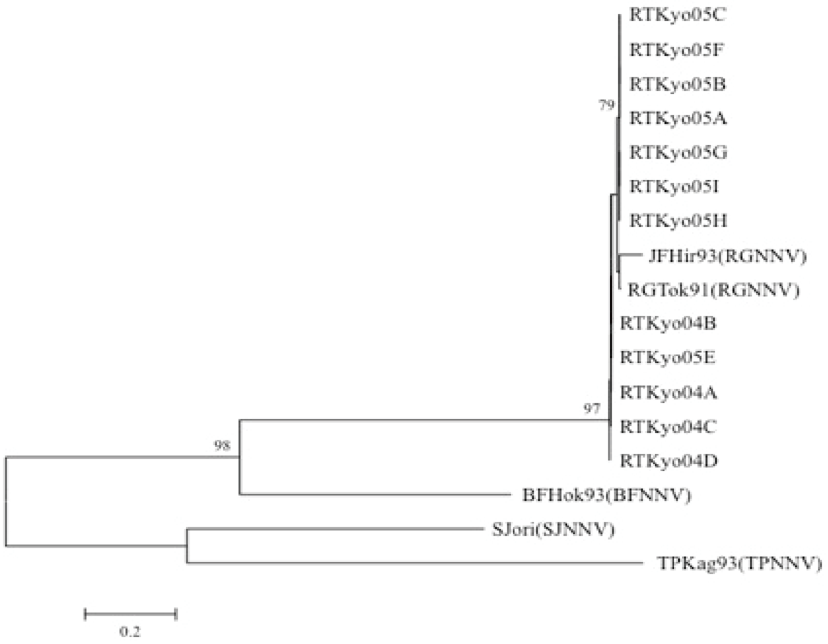

Fig. 10. Neighbor-joining phylogenetic tree deduced from analysis of T4 region of nucleotide sequences of coat protein gene from red tilefish and reference strains (RGNNV, BFNNV, SJNNV, TPNNV). Numbers on branch nodes indicate percent bootstrap support for that node with 1,000 replications. The scale bar equals 0.2 nucleotide replacement.

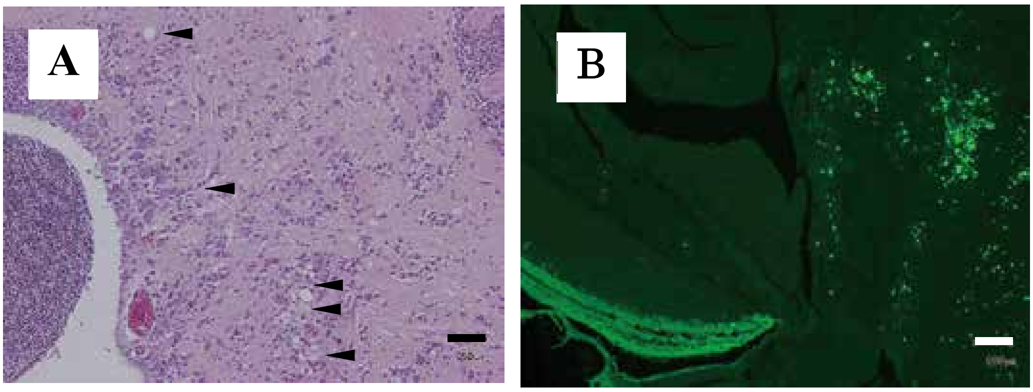

Fig. 11. Histopathology (A) and immuno-histopathology (B) in the brain of naturally infected red tilefish. (A) Haematoxylin eosin staining. Scale bar = 50 μm (B) Immuno-staining using rabbit anti-SJNNV serum. Scale bar = 100 μm.

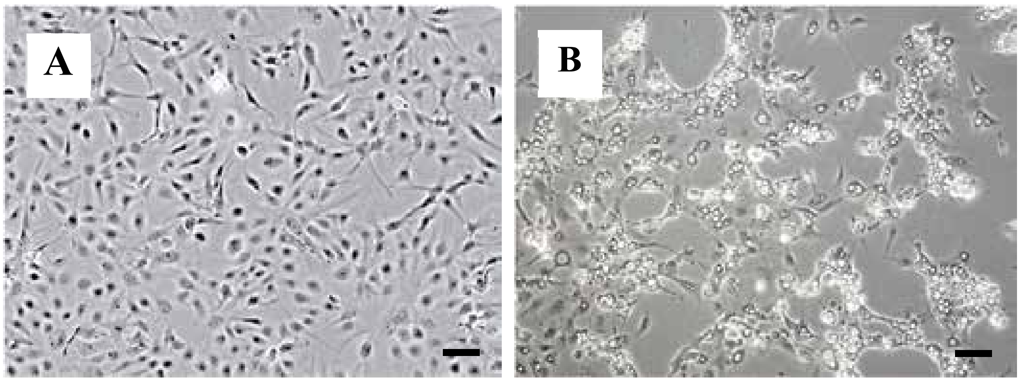

Fig. 12. Cytopathic effects (CPE) appeared in the E-11 cells after inoculation with a virus sample of diseased red tilefish juvenile. (A) Normal cells, (B) inoculated cells. Scale bar = 100 μm.

区）のマハタ稚魚における累積死亡数および死亡個体のウイルス感染価を **Table 14** に示した。いずれのウイルスを接種した場合も，魚は接種後4日目より摂餌が不活発となり，5日目より転覆や横転する個体が観察された。試験区1では9日目より，試験区2では6日目より死亡個体が観察され，累積死亡率は試験区1，2ともに50％に達した。死亡魚はすべて鰾が膨張していた。ウイルス感染価は，試験区1の死亡魚の目が $10^{8.0}$ ～ $10^{10.1}$ $TCID_{50}$/g，脳が $10^{8.1}$ ～ $10^{9.2}$ $TCID_{50}$/g であり，試験区2の死亡魚の目では $10^{8.8}$ ～ $10^{9.6}$ $TCID_{50}$/g，脳では $10^{8.4}$ ～ $10^{10.1}$ $TCID_{50}$/g であった。試験区3では発症および死亡は認められず，生残魚からウイルスは検出されなかった。

4-3-3　飼育水温の影響

ベータノダウイルスに自然感染し nested PCR の検出率が10 ％（n=20）のアカアマダイ稚魚を異なる水温（加温区：21℃，無加温区：14℃）で3週間飼育した結果を **Table 15** に，累積死亡率の推移を **Fig. 13** に示した。加温区では，飼育開始後10日以降に死亡する個体が増加し，いずれの水槽も半数以上の魚が死亡し，それらの死亡魚の半数以上は RT-PCR によりウイルス遺伝子が検出された。また，生残魚では，nested PCR（RGNNV 型）で高率にウイルス遺伝子が検出された。一方，無加温区における死亡数は，加温区に比べて少なく，死亡魚からは RT-PCR でウイルス遺伝子は検出されなかった。また，生残魚の nested PCR によるウイルス検出率も加温区に比べて有意に低く，試験開始時よりもやや高くなった程度であった。

4-3-4　ウイルス保有調査

宮津庁舎で養成されていたアカアマダイ親魚と餌料生物について RT-PCR および RGNNV 特異プライマーによる nested PCR をおこなった結果，いずれの検体からもベータノダウイルスは検出されなかった（**Table 16**）。一方，4カ所の異なる沿岸域で漁獲されたアカアマダイ天然魚からはベータノダウイルス（RGNNV）が検出された（**Table 17**）。RT-PCR 法による検査では，生殖腺と脳からはウイルス遺伝子は検出されな

Table 14. Pathogenicity of a betanodavirus isolates in juvenile sevenband grouper

Intraperitoneal injection with	No. of fish dead/examined	Range of virus infective titers ($TCID_{50}$/g) in organs of dead fish	
		Eye	Brain
RTKyo04 (red tilefish isolate)	5/10 (2/5, 3/5)	$10^{8.0}$–$10^{10.1}$	$10^{8.1}$–$10^{9.2}$
SGWak97 (sevenband grouper isolate)	5/10 (3/5, 2/5)	$10^{8.8}$– $10^{9.6}$	$10^{8.4}$– $10^{10.1}$
HBSS	0/10 (0/5, 0/5)	＜$10^{3.8}$	＜$10^{3.8}$

After injection, fish were reared at 25℃ and observed for 14 days.

Table 15. The number of dead fish and PCR-detection of betanodavirus gene in naturally virus infected red tilefish juveniles under different temperature condition

Experimental groups	Tank No. (fish each n=90)	No. dead fish	Detection of betanodavirus in eye (positive/examined)	
			RT-PCR detection in dead fish	RT-PCR (nested PCR) detection in surviving fish
Elevating of water temperature (21.3±0.8[*1])	1	56[*2]	26/51	6/10 (10/10)
	2	54	26/51	2/10 (7/10)
No elevating (14.3±0.5)	3	4	0/4	0/10 (3/10)
	4	7[*4]	0/7	6/10 (4/10)

[*1] SD, standard deviation.

[*2] One fish was dead by accident.

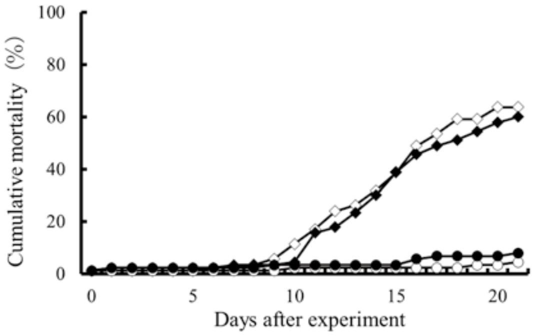

Fig. 13. Cumulative mortalities in juvenile red tilefish without clinical signs of VNN reared at different temperature. Fish were reared at 21 ℃ (◇◆) and at 14℃ （○●）.

Table 16. PCR-based detection of betanodavirus (RGNNV) coat protein gene from red tilefish broodstock and feed animals in Miyazu laboratory

Samples	Length (mm)±S.D.[*1]	Region for examination	No. of positive samples / examined	
			RT−PCR	nested PCR
Japanese horse mackerel *Trachurus japonicus*	221±16	Eye	0/ 8	0/ 8
Golden shrimp *Plesionika semilaevis*	47±61	Eye	0/10	0/10
Opossum shrimp *Neomysis intermedia*	50±6	Eye, Brain	0/ 3[*3]	0/ 3
Copepod *Apocyclops royi*	0.6-0.8	Whole body	0/ 3[*4]	0/ 3
Red tilefish[*2] *Branchiostegus japonicus*	287.7±21.2	Eye	0/ 3	0/ 3

[*1] SD, standard deviation.
[*2] Reared broodstock.
[*3] Three individuals per sample.
[*4] Seven hundred to nine hundred individuals per sample.

かったが，目からは全ての海域の漁獲魚（京都府での4月の検体を除く）からウイルス遺伝子が検出された（3.2～6.7%）。nested PCRでの検出率は，脳で3.2～48.3%，目で22.2～63.3%であった。ウイルス遺伝子の検出率は，漁獲された海域に関わらず脳と比較していずれも目の方が高く，ほとんどの場合，脳でPCR陽性の個体は目においても陽性となった。

4-3-5 VNN防除対策

2004年から2009年におけるVNN防除対策とPCR法により種苗からベータノダウイルスが検出された飼育例数の状況を**Table 18**に示した。種苗生産および放流までの育成期間中の用水にUV処理海水を用いた対策Ⅰでは，RT-PCRにより4飼育例中2例で，nested PCRにより4例すべてでウイルス遺伝子が検出された。PCR陰性の親魚からの受精卵を用い，UV処理海水または電解処理海水で飼育した対策Ⅱでは，2飼育例中1例でRT-PCRおよびnested PCRによりウイルス遺伝子が検出された。nested PCRによる親魚選別，電解オキシダントでの受精卵消毒，電解処理海水により飼育した対策Ⅲでは，7飼育例すべてにおいてウイルス遺伝子は検出されなかった。人工卵巣液で洗浄した未受精卵をnested PCR陰性の精子で人工授精し，電解オキシダントで消毒した受精卵からの仔魚を電解処理海水で飼育した対策Ⅳでは，12飼育例のうち1例でnested PCRでのみウイルス遺伝子が検出された。その1飼育例においてウイルス遺伝子が検出されたのは，稚魚期に検査した105検体のうちの2検体であった。

Table 17. PCR-based detection of betanodavirus (RGNNV) coat protein gene from wild red tilefish captured in 2005

Coastal area	Date	Number of samples (M : F : U)[*1]	Average total length (cm)±S.D.[*2]	Average body weight (g) ±S.D.	Test organ	Detection rate (%)	
						RT-PCR	nested PCR
Kyoto	Apr. 26, 28	54 (0:0:54)	31.6±1.7	359±64	Eye	0	22.2
					Brain	0	14.8
					Gonad	NT[*3]	NT
	Sep. 13	31 (2:24:5)	32.1±3.5	412±172	Eye	3.2	38.7
					Brain	0	3.2
					Gonad	0	0
Shimane	May 14, 26	60 (1:15:44)	30.4±0.9	368±28	Eye	6.7	61.7
					Brain	0	48.3
					Gonad	0	0
Yamaguchi	May 27	60 (0:47:13)	33.7±1.5	496±72	Eye	6.7	51.7
					Brain	0	25.0
					Gonad	0	0
Nagasaki	May 19	60 (0:30:30)	30.9±0.7	360±24	Eye	3.3	63.3
					Brain	0	31.7
					Gonad	0	0
Total		265 (3:116:146)	31.7±2.1	398±93	Eye	4.2	49.1
					Brain	0	27.2
					Gonad	0	0
					Total	4.2	53.2

*1 M, male; F, female; U, unknown.
*2 standard deviation.
*3 not tested.

Table 18. Countermeasures taken against VNN in seed production of red tilefish at Miyazu laboratory in 2004-2009

Counter measure	Selection of broodstock[*1]		Washing of unfertilized eggs[*2]	Disinfection			Detection of betanodavirus in seed production trials	
				Fertilized eggs[*3]	Sea water			
	♀	♂			Larvae	Juvenile	RT-PCR	nested PCR
A	No	No	No	No	UV[*4]	UV	2/ 4[*5]	4/ 4
B	Yes	Yes	No	No	UV	UV/Ele.	1/2	1/2
C	Yes	Yes	No	Oxi.[*6]	Ele.[*7]	Ele.	0/7	0/7
D	No	Yes	Yes	Oxi.	Ele.	Ele.	0/12	1/12

*1 based on PCR detection of the betanodavirus coat protein gene.
*2 Washed 3 times with 9 volume of artificial ovarian fluid before artificial insemination.
*3 Rinsed for 1min in the seawater containing oxidant which were produced by flow electrolyzer.
*4 Ultraviolet irradiation.
*5 Number of betanodavirus (RGNNV)-positive cases / trials in seed production.
*6 Oxidant.
*7 Electrolyzation.

4-4 考　察

2004年に宮津庁舎で種苗生産されたアカアマダイ稚魚の生残魚と死亡魚から，外被タンパク質遺伝子を標的としたRT-PCR法によりベータノダウイルスが検出され，その部分塩基配列を解析した結果，本ウイルスはRGNNVに同定された。病理組織学的検査では，脳に空胞変性が認められ，また免疫染色によりベータノダウイルス特異抗原が検出された。これらのことから，アカアマダイ稚魚の死亡はVNNによると考えられた。これは，アカアマダイにおけるVNNの初めての報告である。なお，アカアマダイから分離されたウイルス株（RTKyo04）の病原性試験については，本来の宿主であるアカアマダイに対しておこなうべきであったが，適切な実験魚が入手できなかったため，RGNNVに感受性をもつマハタをそれに代えた。その結果，接種したマハタ稚魚がVNNに特徴的な症状を呈して死亡したことから，アカアマダイ由来株が病原性を有することが確かめられた。

RGNNVはこれまで暖海性の魚種から検出されており（Nishizawa *et al.*, 1997；Iwamoto *et al.*, 1999；Chi *et al.*, 2003），その増殖至適温度は25～30℃と他のベータノダウイルス（SJNNV，TPNNV，BFNNV）の中で最も高温適応型である（Iwamoto *et al.*, 2000）。RGNNVによるVNNでは，水温が25～30℃の時に頻発して高死亡率をもたらすことが知られており（Mori *et al.*,1991；Chi *et al.*, 1997；Zafran *et al.*, 2000），この高温好性は感染実験により証明されている（Tanaka *et al.*, 1998；Thiéry *et al.*, 1999）。本研究でアカアマダイ稚魚から分離されたウイルスは，マハタ稚魚に対して，既報のRGNNVと同程度の病原性を示した。しかし，RT-PCRでウイルス感染が確認されたアカアマダイ稚魚の飼育群において，約2週間で20％未満の死亡は認められたものの，死亡魚から高頻度にウイルス遺伝子は検出されず，VNNによると考えられる大量死亡は起こらなかった。これは，飼育水温がウイルスの増殖至適温度に比べて16℃と著しく低かったことによると考えられる。このことは，自然感染したアカアマダイ稚魚の飼育水温を21℃と14℃で飼育したところ，21℃区では14℃区に比べてウイルス検出率ならびに死亡魚が急増したことにより裏付けられた。アカアマダイ稚魚の飼育適水温は，17℃付近とされていることから（竹内ら，2004），このような低水温ではRGNNVの不顕性感染はあるとしても発病・致死の可能性は低いものと考えられる。一方，VNN様の症状（回転遊泳や鰾の膨張）を呈して死亡したがPCR検査では陰性であった個体も認められた。これらの異常行動や死亡は何らかの生理的障害によると考えられるが，その原因を解明するためには，今後稚魚で異常行動を伴い死亡が認められた場合，ウイルス検査を実施してVNNの関与を確認するともに，他の感染症や栄養および環境要因による死亡を考慮し，病理組織学検査など総合的な検査を実施することが必要であろう。

天然魚におけるベータノダウイルスの感染について，PCR法を用いた調査では，養殖海域のみならず非養殖海域に生息する多種類の天然魚がウイルスに高率に感染していることが報告されている（Gomez *et al.*, 2004；Sakamoto *et al.*, 2008）。一方，シマアジ，マツカワおよびマハタの種苗生産過程で起こるVNNの主要な感染経路は，親魚からの垂直伝播であることが示されている（Arimoto *et al.*, 1992；Mori *et al.*, 1998；Watanabe *et al.*, 1998；土橋ら，2002）。そこで，宮津庁舎におけるアカアマダイVNNの感染経路を推定するために，PCR法を用いて調査した結果，アカアマダイ養成親魚や餌料生物からウイルス遺伝子は検出されなかったが，種苗生産に使用した親魚からは，漁獲された地域や時期にかかわらず高率にRGNNVが検出された。このことは，アカアマダイ稚魚で発生したVNNは，種苗生産に用いた天然親魚からの垂直伝播によることを強く示唆している。

シマアジではその種苗生産過程におけるVNNの防除方法として，PCR法により親魚の生殖腺を検査し，PCR陰性の親魚からの受精卵を種苗生産に使用することに加えて（Mushiake *et al.*, 1994），オキシダントにより受精卵を消毒することが発生防止に有効であることが報告されている（Mori *et al.*, 1998）。天然アカアマダイの目，脳および生殖腺におけるウイルス遺伝子の検出率の比較から，親魚におけるウイルス感染の有無を判断する組織としては，目が最も適していると判断された。したがって，人工授精に使用する天然親魚の目をnested PCRで検査し，陰性の親からの受精卵を生産に使用することが，VNN防除に有効と考えられる。

これらの調査結果に基づき2004年から2009年の種苗生産において実施した4種の防除対策について，VNNの発生および仔稚魚におけるウイルス遺伝子の検出状況を比較した。その結果，PCR検査による親魚選別をおこない，受精卵を電解オキシダントにより消毒し，電解処理海水で仔稚魚を飼育した場合には，仔稚魚からウイルス遺伝子は全く検出されず，本方法がアカアマダイ種苗生産でのVNN防除に有効であることが立証された。小原ら（2010）は，サケ科魚類の人工採卵の際に実施されている等調液によ

る洗卵が卵表面の細菌およびウイルス量を大幅に減少させることを報告し，また，サケ科魚類においては，未受精卵の消毒が冷水病原因菌（*Flavobacterium psychrophillum*）の垂直感染の防除に有効であることが報告されている（Kumagai and Nawata, 2010）。

今回実施した，人工卵巣液で洗浄した未受精卵を nested PCR 陰性の雄魚から採取した精子で人工授精し，受精卵を電解オキシダントで消毒後，電解処理水で飼育する方法では，ごく一部の稚魚から nested PCR によりウイルス遺伝子が検出されたものの，VNN による死亡は認められなかった。この方法は，ウイルスの不活化効果のある電解オキシダントを洗卵に使用することで，より防除効果が期待され，かつ雌親魚のウイルス検査検体数を削減できる。また PCR 検査結果が判明するまでの卵管理などに要する煩雑な作業や時間を大幅に削減できることから，種苗生産をより効率的に実施することが可能となる。今後は，配偶子のウイルス感染価をさらに低下させる洗浄方法の条件を検討する必要があろう。

第 5 章　クロマグロにおけるウイルス性神経壊死症の防除対策

5-1　はじめに

第 3 章ではキジハタ，第 4 章ではアカアマダイを取り上げ，種苗生産過程の仔稚魚におけるウイルス性神経壊死症（VNN）の発生が親魚からの垂直伝播であると推定し，それに基づく VNN の防除対策について述べた。これらの魚種では，親魚が比較的小型で検査などの取り扱いが容易である。しかし，人為的な取り扱いが困難な大型魚についての VNN 対策については，検討すべき点が多い。そこで，本章ではクロマグロを対象とした VNN 防除対策について述べる。

マグロ類は，スズキ目サバ科マグロ属に分類され地球規模で回遊する魚で，日本ではクロマグロを始め大西洋クロマグロ *Thunnus thynnus*，ミナミマグロ *Thunnus maccoyii*，メバチ *Thunnus obesus*，キハダおよびビンナガ *Thunnus alalunga* の 6 種が消費されている。なかでもクロマグロは，世界中の温帯海域を中心に分布し，美味であるうえに漁獲量が少ないことからマグロ類の中では最高級魚であり経済的に商品価値が極めて高い魚種である（乗田，1999）。マグロ類は世界的にも消費が増加しており，2010 年の全世界における総漁獲量はおよそ 186 万トンであり，最近 30 年間で約 1.7 倍に増加している（FAO, 2015）（**Fig. 14**）。このような漁獲量の増加に伴い，クロマグロの資源について北太平洋まぐろ類国際科学委員会（International Scientific Committee for Tuna and Tuna-like Species in the North Pacific Ocean：ISC）では，親魚資源量が過去最低値に近づいていると報告し（Pacific bluefin tuna working group, 2014），国際自然保護連合（International Union for Conservation of Nature and Natural Resources：IUCN）は，絶滅の恐れがある野生生物を指定するリストで，本種を絶滅危惧種に引き上げた。このようにクロマグロの資源では，喫緊に実効性のある資源管理が求められている。

日本におけるマグロ類の養殖技術の開発は，旧遠洋水産研究所（現水産研究・教育機構国際水産資源研究所）や近畿大学が参加した 1970 年の水産庁プロジェクト「マグロ類養殖技術開発試験」において開始された。近畿大学水産研究所のクロマグロ養殖の研究は，そのプロジェクトにおいて天然幼魚（体重 100 ～ 500 g）を養殖用種苗として利用したのが最初である。その後，親魚養成や自然産卵に関する研究が進められ，1979 年に養成親魚が自然産卵し種苗生産技術の開発が始まった（Kumai, 1997；熊井，1998）。一方，マグロ類の資源管理に関する取り決めをおこなう中西部太平洋まぐろ類委員会（Western and Central Pacific Fisheries Commission : WCPFC）に所属する日本では，クロマグロ資源の維持や増殖を目的とした種苗生産および放流技術の開発が実施されており，奄美庁舎では，1997 年から自然産卵により得た受精卵を使用し，種苗の量産技術開発が開始された（手塚，1998）。このように，複数の機関でクロマグロの種苗生産に関する研究が進められた結果，受精卵の適水温や仔稚魚の餌料系列の情報が蓄積され種苗生産の技術は確立しつつある（宮下，2002；Kumai, 1997；Sawada *et al*., 2005）。しかし，ふ化後 20 日までの飼育初期に仔魚が急激に減耗する飼育事例が認められ（Kumai, 1997；熊井，1998；Sawada *et al*., 2005），本種を安定的に生産するには，飼育初期の死亡を防止することが最も重要な課題である。

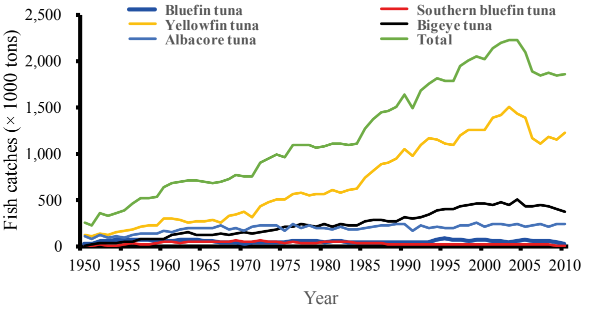

Fig. 14. Global capture production for tunas (FAO Fishery Statistic in 2015).

奄美庁舎では，1997 年～ 1999 年における種苗生産において，ふ化後 10 日頃までの仔魚期に大量死亡する事例が頻繁に認められた。仔稚魚期に死亡する疾病として，ベータノダウイルスが原因の VNN が様々な魚種で報告されていることから，クロマグロ仔魚の大量死亡にも VNN の関与が想定されたため，死亡魚を PCR 検査した結果，ベータノダウイルス遺伝子が検出され VNN の発生が確認された。そこで，本種の種苗を安定的に生産するためには，VNN の防除対策を早急に確立する必要がある。本章では，クロマグロ仔稚魚の死亡と VNN の関係，飼育試験における防除対策および電解オキシダントによるクロマグロ VNN 原因ウイルスの不活化効果について述べる。

5-2　材料および方法

5-2-1　養成親魚

親魚は，1993 年に奄美庁舎地先の湾（仲田湾）を網で仕切った海面（140 × $10^3 m^2$）に放養した 1 群（親魚群 1）と仕切り網の外に設置した円型生簀（直径 40 m）に 1995 年，1996 年および 2004 年に収容した 3 群（親魚群 2 ～ 4 群）の合計 4 親魚群を使用した（**Table 19, Fig. 15**）。仕切り網内や円型生簀内において自然産卵が確認された場合には，卵採集用ネット（目合い 243 μm）を用いて産出卵を採取した。必要に応じて奄美庁舎の親魚群の卵のみではなく，他機関からの受精卵も種苗生産に供した。

5-2-2　仔稚魚の飼育

受精卵はポビドンヨード液（有効ヨウ素濃度 50 ～ 70 mg/L）で 1 ～ 2 分間，電解オキシダントでは海水電解装置（ESF-045 型，（株）荏原製作所製；HSE-100，（株）東和電気製作所製）で作製し電解オキシダントの主成分である次亜塩素酸ナトリウム濃度 50 mg/L を含む海水（以下，電解海水）で 1 分間の消毒をおこなった後，200 L 水槽または 500 L 水槽に収容し，後述する各用水で流水にて管理した。用水には，砂ろ過海水を紫外線殺菌装置（（株）千代田工販社製）で処理した UV 処理海水，海水電解装置で処理した電解海水に残留するオキシダントを除去した電解処理海水を用いた。

飼育試験には 50 kL コンクリート水槽を用い，ふ化仔魚は 0.1 ～ 1.3 万個体 /kL の密度で収容した。開口直後の仔魚にはシオミズツボワムシ（奄美株）を与え，その後，成長に合わせてアルテミア幼生，ハマフエフキ またはイシダイのふ化仔魚，冷凍のカタクチイワシ *Engraulis japonicus* 仔魚の砕片を給餌した。飼育水温は 25 ℃を下回らないように調整した。

Table 19. Broodstock of bluefin tuna used for seed production from 2000 to 2008 in Amami laboratory

Group of spawners	Starting year of rearing	Rearing place	Body weight*1 (kg)	Year of seed production
1	1993	barrier net closed the cove	200–300	2000, 2001, 2002, 2004, 2006
2	1993	circular net cage	200–300	2000, 2001, 2002
3	1996	circular net cage	70–130	2002, 2003
4	2004	circular net cage	60-120	2007, 2008

*1 Estimate value.

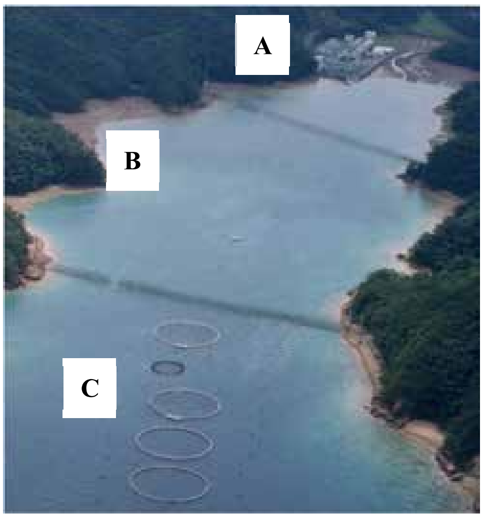

Fig. 15. Layout of facilities and broodstocks in the Amani laboratory of National Research and Development Agency. The rearing tanks in the laboratory (A); Barrier net closed the cove (B); The circular net cages (C).

5-2-3　仔稚魚における VNN の確認

2000 年の大量死亡時に新鮮な死亡魚（ふ化後 19 日）と稚魚（ふ化後 33 日）を採取し，10％中性緩衝ホルマリンで固定後，常法により厚さ約 5 μm のパラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン･エオシン（H&E）染色をおこない，脳，脊髄および眼の網膜組織を中心に光学顕微鏡で観察した。抗 SJNNV ウサギ抗体および FITC 標識抗ウサギ Ig ブタ抗体（Dako 社製）を用い，Nguyen *et al.*（1996）の方法に準じ蛍光抗体法によりウイルス抗原の検出をおこなった。また，PCR 検査のため，2000 年～ 2002 年には瀕死魚や死亡魚を採取

し，2002 ～ 2008 年には明らかに健常な魚を採取した(-80℃で保存)。仔魚では 5 ～ 20 個体の全身を，稚魚では個体別に脳または目を検査部位とした。Nishioka *et al.*（2010）に従って RT-PCR および 4 つの遺伝子型（SJNNV，RGNNV，BFNNV および TPNNV）に特異的なプライマーを用いた nested PCR により遺伝子型を分類した。また E-11 細胞（Iwamoto *et al.*, 2000）を用いたウイルス分離と感染力価の測定をおこなった。

5-2-4　疫学調査

VNN の感染源を推定するために 3 親魚群の死亡した養成親魚 28 個体（雌 14 個体，雄 14 個体），ならびに種苗生産に餌として使用していたシオミズツボワムシ（約 14,000 個体 / 検体，n=3），アルテミア幼生（約 9,000 個体 / 検体，n=2），ハマフエフキのふ化仔魚（約 150 個体 / 検体，n=147）および冷凍カタクチイワシ仔魚（1 個体 / 検体，n=2）を PCR に供した。また，天然クロマグロ幼魚（平均体重 0.5 ± 0.1 kg，n=141）および成体（平均体重 173.0 ± 37.2 kg，n=109）を検査した。PCR 検査にはクロマグロ幼魚および親魚では，目，脳または生殖腺を個体別に供試し，仔魚および餌料生物は体全体を使用した。サンプルは PCR 法により検査をするまで -80℃で保管した。

5-2-5　防除対策試験

防除対策の種類は，卵消毒の有無並びに消毒に使用する薬剤の種類および卵管理水と飼育水の処理方法により **Table 20** のように 5 つに区分した。

すなわち，

対策Ⅰ：卵消毒を実施せず，卵管理および飼育水に UV 処理海水を使用。

対策Ⅱ：卵消毒をヨード液でおこない，卵管理および飼育水に UV 処理海水を使用。

対策Ⅲ：卵消毒を電解海水でおこない，卵管理および飼育水に UV 処理海水を使用。

対策Ⅳ：卵消毒を電解海水でおこない，卵管理に UV 処理海水，飼育水に電解処理海水を使用。

対策Ⅴ：卵消毒を電解海水でおこない，卵管理および飼育水に電解処理海水を使用。

種苗生産の成否の判断については，日齢 30 前後で稚魚を生産できた飼育例を稚魚取り上げ例数とした。そして，取り上げ例数のうち，種苗生産過程で仔稚魚の PCR 検査が陰性であった飼育事例数を種苗生産の成功例数とした。また，稚魚の取り上げ例数に対する成功例数について Fisher の正確検定で検定をおこなった。

5-2-6　次亜塩素酸に対するウイルス感受性試験

試験には，2000 年に VNN で死亡したクロマグロ仔魚から分離し，ウイルス感染力価が $10^{6.9}$ $TCID_{50}$/mL のウイルス液（Bluefin tuna nervous necrosis virus：BTNNV，BTKag00 株）を用いた。ガラスメスシリンダーに，次亜塩素酸濃度を 0.3，0.5，1.0，1.5，2.0 に調整した電解海水を 49.95 mL とり，供試ウイルスを 50 μL ずつ懸濁した後，1，3 および 5 分間反応後に 1mL ずつ試料を採取し，予め所定量のチオ硫酸ナトリウムが入った 1.5 mL チューブに入れ次亜塩素酸の作用を停止した。次に採取した試料のウイルス感染力価を E-11 細胞により測定した。対照には清浄海水を用いて，供試ウイルス 50 μL を同様に処理した後にウイルス感染価を求めた。ウイルス感染力価は，48 ウェルマイクロプレート（IWAKI 社製）を用い，渡邉ら（2013）の方法に準じ，ウイルス感染力価および不活化率を求めた。なお，それぞれの試験において，ウイルス液の懸濁前と所定時間反応後の次亜塩素酸濃度を，水質測定器（Pocket Colorimeter™ Ⅱ，HACH 製）を用いて測定した。

5-3　結　果

5-3-1　VNN の確認

(1) 飼育初期の大量死亡の発生および症状

2000 年から 2008 年の飼育試験において，飼育初期に異常遊泳などは認められず大量死亡する事例が，親魚群の由来に関わらず飼育水温が 23 ～ 29℃の範囲で毎年確認された。稚魚期では，活力が低下し平衡感覚を失い，群れから離れて死亡する個体が認められた。

Table 20. Results of bluefin tuna juvenile production with different countermeasures

Group	Disinfecting methods			Juvenile production		
	Fertilized eggs	Sea water maintained for fertilized eggs	Sea water of seed production	No. of trials	No. of success cases	No. of PCR-negative cases
Ⅰ	ND[*1]	Ultraviolet	Ultraviolet	4	1	0
Ⅱ	Iodine	Ultraviolet	Ultraviolet	24	4	1
Ⅲ	Hypochlorite	Ultraviolet	Ultraviolet	6	0	0
Ⅳ	Hypochlorite	Ultraviolet	Hypochlorite	1	1	0
Ⅴ	Hypochlorite	Hypochlorite	Hypochlorite	80	26	18

[*1] Not done.

(2) 病理組織

2000年と2002年に死亡した仔魚（日齢19，n=5）の病理組織学検査では，中枢神経系や網膜組織に顕著な病理組織学的な変性は認められなかったが，脳と網膜においてIFATにより特異蛍光が観察された。一方，稚魚（日齢33，n=5）では，脳，延髄および網膜において，明らかな空胞変性とIFATによる強い特異蛍光が認められた（**Fig. 16**）。

(3) ウイルス分離

死亡した仔魚（日齢17，n=10）の磨砕ろ液を接種したE-11細胞は，3日目より細胞が球形化する細胞変性効果が観察され（**Fig. 17**），10日目には，ウェル内の全ての細胞が崩壊した。ウイルス力価は$10^{5.3}$～$10^{9.6}$ $TCID_{50}$/gであった。

(4) PCRによる仔稚魚からのウイルス検出

2000年の死亡魚から，RT-PCR法によりベータノダウイルスRNA2遺伝子（T4領域）が検出され，ベータノダウイルスの4遺伝子型にそれぞれ特異的なプライマーセットを用いたnested PCRにより，RGNNV遺伝子型プライマーでのみPCR産物が認められた（**Fig. 18**）。2000年～2002年に衰弱や死亡したクロマグロ仔稚魚におけるPCR検査結果を**Table 21**に，2002年～2008年に外観上の健常魚（日齢0～30）のPCR検査結果を**Table 22**に示した。いずれのサンプルにおいてもnested PCRによる検出率はRT-PCRより高くなり，日齢別の検出率では，発病魚では日齢0～5の仔魚ではウイルス遺伝子は検出されなかったが，日齢6～30の病魚では高率にウイルス遺伝子が

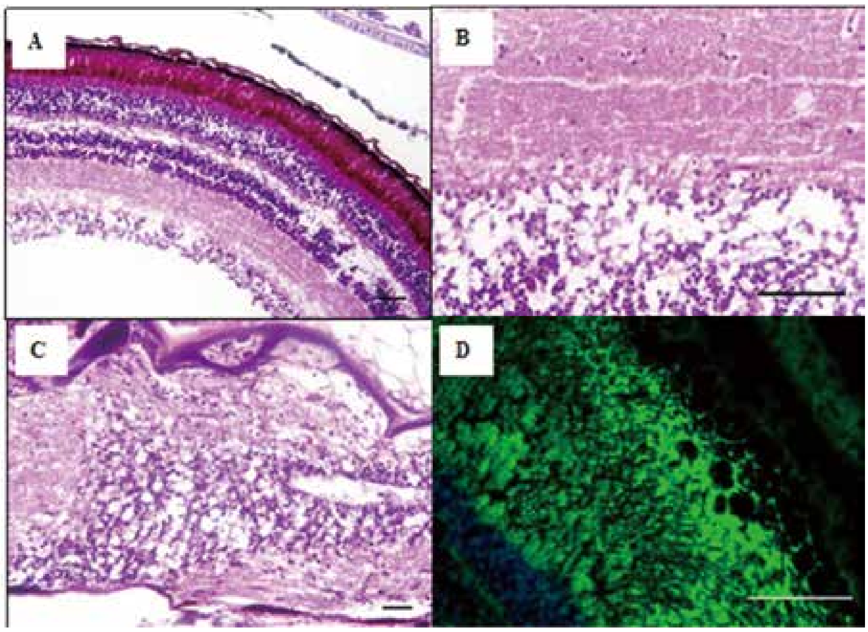

Fig. 16. Histology of naturally diseased a bluefin tuna juvenile from dead 33-day-old juveniles. Light microscopy showing vacuolation in the retina (A), spinal cord (B) and brain (C) (H & E). Specific fluorescence in the retina with IFAT (D). Scale bar = 50 μm.

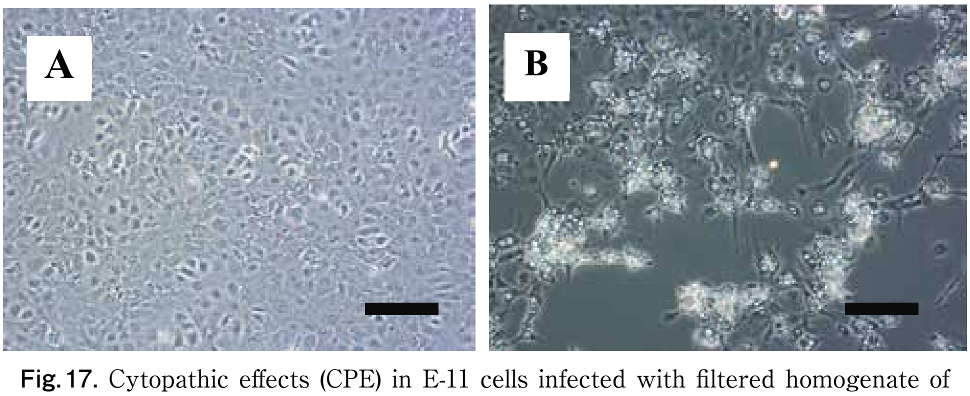

Fig. 17. Cytopathic effects (CPE) in E-11 cells infected with filtered homogenate of Pacific bluefin tuna larvae 5 d culture at 25 ℃. (A): Normal cells, (B): inoculated cells. Scale bar = 100 μm.

検出された。一方，健常魚における nested PCR による検出率は，日齢 0 ～ 5 で 10.5 %，日齢 21 ～ 30 で 11.0 % と低く，日齢 6 ～ 20 では 23.6 ～ 33.0 % の範囲で高くなった。

(5) 養成親魚および天然クロマグロ，餌料生物からのウイルス遺伝子の検出

死亡した養成親魚における，RT-PCR 法の検査では，すべての親魚で目，脳，生殖腺のいずれにおいてもウイルス遺伝子は検出されなかった。しかし，nested PCR により，雌 8 歳魚の生殖腺および雄 9 歳魚の脳から RGNNV 型のウイルス遺伝子が検出された（**Table 23**）。

Table 21. Detection of betanodavirus gene by RT-PCR from trial seed production of bluefin tuna on from 2000 to 2002 at Amami laboratory

Year	Days after hatching				
	0-5	6-10	11-15	16-20	21-30
2000				7/7	3/4
2001			0/6	1/1	
2002	0/1*	6/6	7/8	12/16	12/12
Total	0/1	6/6	7/14	20/24	15/16

* PCR positive number / sample number.

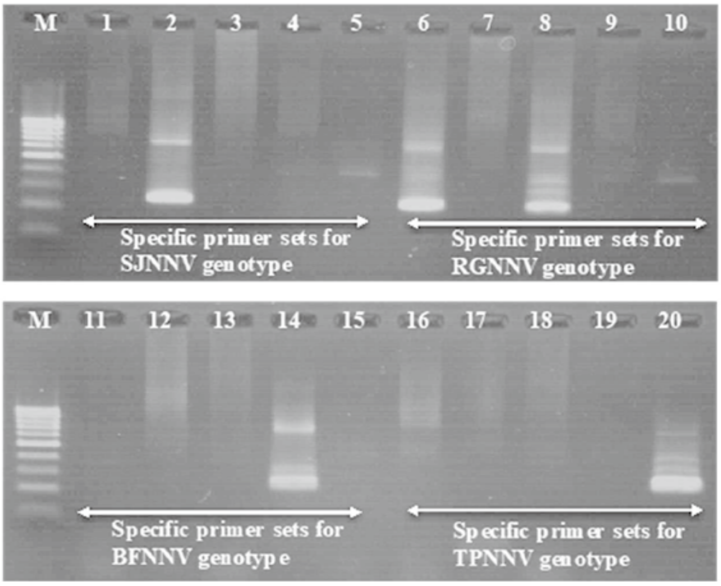

Fig. 18. Nested PCR detection of betanodavirus coat protein gene in the dead larvae of bluefin tuna using specific primer sets of four NNV genotypes.

M: DNA marker 100 bp ladder (Lane M); Nested PCR using the primer set SJ-669f / SJ-926r (Lane 1-5); the primer setRG669f / RG926r (Lane 6-10), the primer set BF669f / BF926r (Lane 11-15) and the primer set TP669f / TP926r (Lane 16-20); dead larvae of bluefin tuna (Lane 1,6,11,16); batenodavirus strain of SJNag93 (Lane 2,7,12,17) ; batenodavirus strain of SGWak97 (Lane 3,8,13,18); betanodavirus strain of PCHok96 (Lane 4,9,14,19); betanodavirus strain of TPKag93 (Lane 5,10,15,20).

Table 22. PCR-detection of betanodavirus in apparently normal larvae and juveniles of Pacific bluefin tuna produced at Amami laboratory in 2002 - 2008

Year	Days after hatching				
	0-5	6-10	11-15	16-20	21-30
2002	2/46 (9/46)*1	19/33 (27/33)	6/11 (7/11)	9/13 (9/13)	5/8 (7/8)
2003	0/12 (12/12)	0/2 (2/2)	1/5 (5/5)	ND*2	ND
2005	0/6 (6/6)	0/8 (0/8)	0/11 (7/11)	0/7 (1/7)	0/70 (0/70)
2007	0/33 (3/33)	17/30 (17/30)	0/1 (0/1)	16/16 (16/16)	0/15 (5/15)
2008	7/228 (7/228)	13/224 (23/224)	12/75 (12/75)	0/70 (9/70)	0/25 (1/25)
Total	9/325 (34/325)	49/297 (70/297)	19/103 (31/103)	25/106 (35/106)	5/118 (13/118)
	2.8% (10.5%)	16.5% (23.6%)	18.4% (30.1%)	23.6% (33.0%)	4.2% (11.0%)

*1 PCR positive number / sample number.

*2 Not done.

Table 23. Detection of betanodavirus from dead broodstock reared at Amami laboratory in 2001, and 2011

Group of spawners	Date of death (m.y)	Age	Sex	RT-PCR (Nested PCR) Tissue: eye	Brain	Gonad
1	Aug. 2001	8	♂	NS	NS	0/1 (0/1)
	Oct. 2001	8	♂	NS	NS	0/1 (0/1)
	Aug. 2002	8	♂	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
		8	♂	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
		9	♀	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
2	Jul..2001	8	♂	NS*2	NS	0/1 (0/1)
	Aug. 2001	8	♀	NS	NS	0/1 (1/1)
		9	♀	NS	NS	0/1 (0/1)*1
		9	♀	NS	NS	0/1 (0/1)
	Sep. 2002	9	♂	0/1 (0/1)	0/1 (1/1)	0/1 (0/1)
3	Feb. 2001	5	♀	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
	Mar. 2001	5	♀	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
	Apr. 2001	5	♀	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
		5	♀	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
		5	♀	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
	May. 2001	5	♀	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
		5	♂	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
		5	♀	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
		5	♀	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
		5	♂	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
		5	♂	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
	Jun. 2001	5	♂	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
		5	♂	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
		5	♂	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
	Apr. 2002	6	♂	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
	Jun. 2002	6	♂	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
	Jul. 2002	6	♀	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)
	Sep. 2002	6	♀	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)	0/1 (0/1)

*1 PCR positive number / sample number
*2 No sample

Table 24. Detection of betanodavirus gene by PCR method from wild bluefin tuna caputered in 2003

Captured area	Individuals	Body weight (kg)	RT-PCR (Nested PCR): Total	Brain	Eye	Gonad
West marine area of Koshikishima Islands	141	0.49±0.12	10 (47)*1	7 (35)	5 (30)	NS*2
Adjacent sea of Nansei Islands	109	173.00±37.22	0 (0)	NS	NS	0 (0)

*1 RT-PCR positive (Nested PCR positive).
*2 No sample.

Table 25. Inactivation of betanodavirus BTNNV at different chlorine concentrations and treatment times

Desired chlorine concentration (mg/L)	Treatment time (min)	Measured chlorine concentration (mg/L): Before treatment	After treatment	Decay rate (%)	Virus infective titer*1 (log10 TCID50/mL)	Inactivation rate (%)
0.3	1	0.37	0.28	24.3	5.9	95.3
	3		0.24	35.1	5.8	96.8
	5		0.18	51.4	5.3	99.0
0.5	1	0.61	0.45	26.2	≦3.9	≧99.9
	3		0.36	41.0	UD*2	≧99.9
	5		0.34	44.3	UD	≧99.9
1.0	1	1.01	0.74	26.7	4.3	99.9
	3		0.74	26.7	UD	≧99.9
	5		0.71	29.7	UD	≧99.9
1.5	1	1.61	1.40	13.0	UD	≧99.9
	3		1.39	13.7	UD	≧99.9
	5		1.34	16.8	UD	≧99.9
2.0	1	2.20	1.95	11.4	UD	≧99.9
	3		2.04	7.3	UD	≧99.9
	5		1.87	15.0	UD	≧99.9

*1 Initial titer was $10^{6.97}$ $TCID_{50}$/mL.
*2 Undetectable (≦$10^{3.80}$ $TCID_{50}$/mL).

天然クロマグロでは，親魚生殖腺からウイルス遺伝子は検出されなかったが，天然クロマグロ幼魚では，脳，目のいずれからもRGNNV遺伝子型のウイルス遺伝子が検出された（**Table 24**）。一方，餌料生物からはウイルス遺伝子は検出されなかった。

5-3-2　VNN防除方法の検討およびその効果

（1）防除対策と稚魚取り上げ例数および成功例数

VNN防除対策の種類とクロマグロ稚魚を取り上げた飼育例数およびPCRで陰性の稚魚を取り上げた成功例数を**Table 20**に示した。合計115例の飼育をおこない，対策Ⅰでは，4飼育例中1例で稚魚を取り上げたが，稚魚からはPCRによりウイルス遺伝子が検出された。対策Ⅱでは，24飼育例中4例で稚魚を取り上げ，このうち1例はPCR陰性の稚魚が生産できた成功例であった。対策Ⅲでは，6例の飼育試験全てで稚魚を取り上げることができなかった。対策Ⅳでは，飼育は1例のみで稚魚を取り上げることはできたが，PCRにより稚魚からウイルス遺伝子が検出された。対策Ⅴでは，80飼育例中26例で稚魚を取り上げ，このうち18例ではPCR陰性の稚魚を生産することができた。防除対策ⅠとⅤについて，取り上げ例数に対する飼育成功例数について，Fisherの正確検定で有意差（$p < 0.05$）はなかった。

（2）電解海水によるウイルス（BTNNV）の不活化

次亜塩素酸濃度が0.3～2.0mg/Lの電解海水で1，3および5分間ウイルスを処理した時のウイルスの不活化率および次亜塩素酸濃度の減衰割合を**Table 25**に示した。次亜塩素酸濃度0.37mg/Lの電解水にウイルス液（$10^{6.9}$ $TCID_{50}$/mL）を1～5分間処理した時の不活化率は99.0％以下であったのに対し，次亜塩素酸濃度0.61～2.20mg/Lの電解水では，ウイルス液を1分間以上処理すると不活化率は99.9％以上であった。次亜塩素酸濃度の減衰率は，0.37mg/Lの5分間処理で最も高く51.4％，2.20mg/Lの3分間処理が最も低く7.3％となった。次亜塩素酸濃度の減衰割合は，いずれの試験区においても処理後1分までの減衰割合が高かった。処理時間が長くなるに従い，次亜塩素酸濃度の減衰割合は高くなる傾向を示した。また，不活化処理に用いた電解海水の残留塩素濃度が低くなるに伴い，

次亜塩素酸濃度の減衰割合は高くなる傾向を示した。

5-4 考 察

2000年のクロマグロ死亡魚からRGNNV遺伝子型のベータノダウイルス遺伝子が検出され，病理組織学的検査では，VNNの特徴である細胞の壊死，融解に伴う空胞形成が網膜，脊髄および脳組織で認められ，免疫染色によりベータノダウイルスの特異抗原が検出された。また，死亡魚からは $10^{5.3}$ ～ $10^{9.6}$ $TCID_{50}$/gのウイルス感染力価が測定された。本研究では分離ウイルスのクロマグロ仔魚に対する病原性は検討しておらず，コッホの条件[1]を満たすかどうかは不明である。さらに，PCR法によりウイルス遺伝子が検出されない事例においても，仔魚の大量死亡があった。本種の種苗生産では飼育初期の減耗を防ぐ飼育技術の開発が必要であることから（Kumai, 1997；熊井, 1998；Sawada *et al*., 2005），これらの死亡がベータノダウイルス感染のみによるとは言い難いが，VNNがクロマグロ仔魚の大量死亡に大きく関わっていることは確かであろう。

一方，健常な仔魚（日齢0-30）のRT-PCRとnested PCRによるウイルス検出率は，日齢0～5の仔魚では2.8％と10.5％，日齢21～30の仔魚では4.2％と11.0％と比較的低かったのに対し，日齢6～20の仔魚ではRT-PCRで16.5～23.6％，nested PCRで23.6～33.0％とやや高い値であった。健常魚におけるこれらの高い感染率は，仔魚の活力や飼育環境の変化などにより，容易にウイルスが増殖しVNNの発病につながる恐れがあることが示された。シマアジでは仔魚期がもっともベータノダウイルスに感受性を示す（有元ら, 1994）。クロマグロにおいて稚魚期に大量死亡例が少ないのは，クロマグロでも仔魚期の方がより本ウイルスに感受性が高いことによると推定される。小規模での本種の仔稚魚の飼育が困難であるため，本研究では感染試験を実施することができず，高感受性時期については今後の課題として残された。

疫学調査の結果では，種苗生産に使用した餌料生物からは，ウイルス遺伝子は検出されず，一部の養成親魚の生殖腺や脳から，ウイルス遺伝子が検出されたことは，クロマグロのVNN感染が親魚から仔魚へ伝播することを示唆している。また，天然クロマグロ幼魚からウイルス遺伝子が検出されており，天然海域で本ウイルスに感染した天然クロマグロ幼魚を育成した養成親魚ではウイルスを保有している確率が高く，養成親魚が種苗生産過程で発生するVNNの要因となることが推察された。したがって，天然由来の養成親魚から得た受精卵を用いた種苗生産では，VNNが発生する可能性が高いと考えられ，積極的にVNNの防除に務めなければならない。本研究では餌料生物のPCR検査でPCR陰性であったものの，日本産のカタクチイワシからはRGNNV遺伝子型のベータノダウイルスが検出されており（Gomez *et al*., 2006），ウイルスの感染リスクを低減する観点から，本種を餌料に用いることは避けるべきである。

卵消毒や用水の処理によるVNN発生の防除効果を検討した結果，ヨード液により卵消毒しUV処理海水を使用した対策Ⅰでは，24例中4例で稚魚を取り上げ，PCR陰性の稚魚が生産できた成功例は1例であったのに対し，電解海水で卵消毒し電解処理海水で飼育した対策Ⅴでは80例中26例で稚魚を取り上げ，このうち成功例は18例であった。それぞれの対策における稚魚取り上げ例数に対する成功例数では，対策Ⅰの取り上げ例数が4例と少なかったため，Fisherの正確検定で有意な差（$p < 0.05$）は認められなかった。しかし，電解オキシダントによる卵消毒を実施した対策Ⅴでは，PCR陰性の稚魚が生産できた成功例数が多いことから，VNN発生の低減に効果があると考えられる。電解海水を用いたBTNNV（$10^{6.9}$ $TCID_{50}$/mL）の不活化試験では0.5 mg/Lの1分以上処理で，不活化率は99.9％以上となり，BTNNVと同じRGNNV遺伝子型であるマハタ病魚由来のNNV（Sevenband grouper nervous necrosis virus：SGNNV）の不活化試験をおこなった報告と一致した（渡邉ら，2013）。これは，同じ遺伝子型であり電解海水に対する感受性が類似することを示したと考えられた。また，クロマグロ受精卵では，ふ化に影響を及ぼさずに次亜塩素酸濃度1.0 mg/L の電解海水で2分以内の処理が実験的には可能であることから（樋口ら, 2015），量産規模において卵消毒の浸漬時間を長くすることにより，さらにVNN不活化効果が高まることが期待される。また，本研究における卵消毒では止水状態で実施しているため，量産規模で卵消毒をおこなうには，樋口ら（2011）が実施したハマフエフキの受精卵の消毒方法を参考に，流水状態で電解海水のかけ流しにより，次亜塩素酸濃度の低下を防ぐことも重要である。本研究結果を基に，2009年度以降奄美庁舎では，200L水槽に受精卵10万粒を収容し，電解海水の流水で次亜塩

1）コッホの4原則：(1) その病原体が同一疾病例で検出される。(2) その病原体が宿主から分離培養される。(3) 分離された病原体を実験的に感染させ，疾患を再現することができる。(4) 実験的に感染させた宿主から，同じ病原体が検出される。

素酸濃度0.5 mg/Lの1分間消毒を実施し，その後に電解処理海水で飼育することにより，種苗生産過程においてVNNは発生していない（久門，私信)。

第6章 ウイルス感染源としての餌料魚の重要性

6-1 はじめに

旧日栽協では，1978年以降シマアジの親魚養成および種苗生産技術の開発に取り組み，1988年には80万個体の種苗(稚魚)を生産することに成功した。しかし，翌年の1989年から1992年にかけて，生産技術開発を担った古満目庁舎，上浦庁舎および五島庁舎において，ウイルス性神経壊死症（VNN）の発生により仔魚が大量に死亡し，安定生産に大きな支障をきたした。これを機に，日栽協，京都大学および広島大学の共同研究が数年間にわたっておこなわれた結果，VNNの診断技法を始め，養成親魚の管理や種苗生産段階における防除技術が開発された。シマアジのVNNは主に仔魚期に発生し，養成親魚から仔魚へSJNNVが垂直伝播することによる（Arimoto *et al.*, 1992；有元ら，1994)。そこで，防除対策として，産卵期の直前に親魚生殖腺中のウイルスをPCR法により検査し，陰性の親魚を選別し産卵に供するとともに，種苗生産には親魚群の産卵回数が10回未満の受精卵を用い，PCR陰性の親魚群から得た受精卵は，オキシダント海水で消毒し生産に用い，飼育用水には砂ろ過海水をオキシダントで処理して用いることが推奨されている（Mori *et al.*, 1998；虫明・有元，2000)。

上浦庁舎ではこの防除対策を実施した1996年以降の量産飼育においてVNNの発生は認められておらず，シマアジのVNNは完全に防除できる疾病と認識されるに至った。ところが，この防除対策を実施したにもかかわらず，2003年におけるシマアジの種苗生産でVNNの発生が8年ぶりに確認された。

本章では，従来の防除対策で防ぐことができなかったシマアジ種苗生産におけるVNNの発生原因を解明するため，養成親魚や飼育施設内の餌料生物についてSJNNVの保有状況を疫学調査し，分子疫学的な手法を用いて感染経路の推定をおこなった。その結果，多獲性魚種で親魚養成用に使用されるマアジが感染源と推定され，この推定結果に基づき，防除対策の再構築をおこなった。また，餌料魚のうちSJNNV遺伝子型のベータノダウイルスが高率に検出されるマアジに着目し，天然マアジのベータノダウイルス感染状況や天然のマアジから分離したウイルスのマアジ，シマアジ仔魚への病原性について検討した。

6-2 材料および方法

6-2-1 シマアジの種苗生産

シマアジの種苗生産には，産卵期前に生殖腺をRT-PCRとnested PCR（SJNNV）で検査し，陰性個体で構成された上浦庁舎の1親魚群（平均体重5.5 ± 1.1 kg）と古満目庁舎の2親魚群（A群：平均体重4.4 ± 0.8 kg；B群：平均体重3.8 ± 0.4 kg）を使用した。養成用の餌料としてマアジ，スルメイカおよびエビ（種不明）を用い産卵期間中も適宜給餌した。自然産卵された受精卵はオゾン発生装置（OZF-30，荏原実業株式会社製）でオキシダント（0.5 mg /L）を含む海水で1分間の消毒後，1 kLポリカーボネイト水槽に収容し，エアーストンで通気し流水下でふ化まで管理した。用水には砂ろ過海水をオキシダント（0.5 mg/L）で3分間反応後，活性炭でオキシダントを除去したオキシダント処理海水を用いた。飼育水温は20℃に調整し，仔魚には成長に合わせて，シオミズツボワムシ（上浦株），アルテミア幼生，配合飼料を適宜給餌した。

仔稚魚は飼育期間中に異常遊泳や大量死亡が認められた時，および取り上げ時に，RT-PCR法によりベータノダウイルスの検査をおこなった。1検体当たりのサンプル量は，仔魚では2～5個体の体全体または頭部，稚魚では1～2個体の頭部または眼球とした。

6-2-2 感染経路推定のための疫学調査

(1) 上浦庁舎周辺での調査

上浦庁舎の産卵親魚群の一部親魚（n=7）と上浦および古満目庁舎の親魚群全個体の生殖腺および，シオミズツボワムシ（n=1)，マアジ（n=65)，マサバ（n=30)，スルメイカ（n=45)，ナンキョクオキアミ *Euphausia superba*（n=5)，アサリ *Ruditapes philippinarum*（n=5）を検査に供した。検査のサンプル量は約50 μLとし，サンプリングした親魚は目，脳，生殖腺を個体別に検査した。餌料生物の検査部位は，シオミズツボワムシでは全体（約14,000個体 / 検体）とし，マアジ，マサバ，スルメイカでは目または脳，ナンキョクオキアミは頭部，アサリは内臓を含む組織を個体別に供した。PCR陽性となったシマアジ（日齢7および日齢12）から検出された9株（03SJ-1～03SJ-9）と上浦庁舎の冷凍マアジから検出された8株（03JJM feed-1～03JJM feed-8）をシークエンス解析に供した（**Table 26, Table 27**)。第4章で述べた方法に従って，ベータノダウイルスRNA2遺伝子（T4領域）のシークエンスをおこない，決定した塩基配列の塩基置換数に基

Table 26. PCR detection of betanodavirus SJNNV gene from frozen fish and shellfish as fish feed

Examined animal	Number of animals or lot examined	Number of PCR positive / examined (Detection rate %)	
		RT-PCR	Nested PCR for SJNNV
Japanese jack mackerel[*1] *Trachurus japonicus*	65	36/65 (55)	38/55 (69)[*3]
Chub mackerel[*1] *Scomber japonicus*	30	0/30 (0)	0/30 (0)
Japanes common flying squid[*1] *Todarodes pacificus*	45	0/45 (0)	12/45 (27)
Antarctic krill[*1] *Euphausia superba*	5	0/5 (0)	0/5 (0)
short-neck clam[*1] *Ruditapes philippinarum*	5	0/5 (0)	0/5 (0)
L-type rotifer[*2] *Brachionus plicatilis*	1[*4]	0/1 (0)	0/1 (0)

[*1] Animals were stored at -20°C.
[*2] Sampled from culture tank.
[*3] Fifty-five fish from 65 fish were applied to nested PCR test.
[*4] One lot consists of about 14 thousand individuals.

Table 27. Samples used for sequencing

No.	Sample designation	Source of samples	Cluster	Reference
1	03SJ-1	Detect from diseased SJ[*1] larva at trial No.1 in Kamiura Laboratory	I	This study
2	03SJ-2	Detect from diseased SJ larva at trial No.1 in Kamiura Laboratory	I	This study
3	03SJ-3	Detect from diseased SJ larva at trial No.1 in Kamiura Laboratory	I	This study
4	03SJ-4	Detect from diseased SJ larva at trial No.1 in Kamiura Laboratory	I	This study
5	03SJ-5	Detect from diseased SJ larva at trial No.2 in Kamiura Laboratory	I	This study
6	03SJ-6	Detect from diseased SJ larva at trial No.2 in Kamiura Laboratory	I	This study
7	03SJ-7	Detect from diseased SJ larva at trial No.2 in Kamiura Laboratory	I	This study
8	03SJ-8	Detect from diseased SJ larva at trial No.2 in Kamiura Laboratory	I	This study
9	03SJ-9	Detect from diseased SJ larva at trial No.2 in Kamiura Laboratory	I	This study
10	03JJMfeed-1	Wild JJM[*2] was stored at -20°C as feed for adult fish	I	This study
11	03JJMfeed-2	Wild JJM was stored at -20°C as feed for adult fish	III	This study
12	03JJMfeed-3	Wild JJM was stored at -20°C as feed for adult fish	I	This study
13	03JJMfeed-4	Wild JJM was stored at -20°C as feed for adult fish	I	This study
14	03JJMfeed-5	Wild JJM was stored at -20°C as feed for adult fish	I	This study
15	03JJMfeed-6	Wild JJM was stored at -20°C as feed for adult fish	I	This study
16	03JJMfeed-7	Wild JJM was stored at -20°C as feed for adult fish	III	This study
17	03JJMfeed-8	Wild JJM was stored at -20°C as feed for adult fish	III	This study
18	SJNNV SJOri	Detect from diseased SJ larva	II	Nishizawa *et al.* 1995
19	SJNNV-NC003449	Detect from diseased SJ larva	II	Iwamoto *et al.* 2001

[*1] striped jack.
[*2] Japanese jack mackerel.

づく近接結合法で作成したデンドログラムにより，遺伝的類縁関係を推定し，各ウイルス株間の相同性を解析し感染経路を推定した。比較対照として，既報のSJNNV SJOri, SJNNV-NC003449, BFNNV（D38635），RGNNV（D38636），および TPNNV（D38637）を供試した。

(2) 日本沿岸域での調査

2003 年 3 月から 2005 年 8 月の間に，岩手県宮古市（A），石川県七尾市（B），福井県小浜市（C），京都府舞鶴市（D），大分県佐伯市（E）および長崎県五島市（F）の合計 6 カ所で水揚げされた魚介類を調査に供した（**Fig. 19**）。調査対象生物は保冷状態で上浦庁舎に輸送後採材し，検査組織は PCR 検査に供するまで -80℃で凍結保存した。検査部位は魚類とイカは目および脳，エビ類は頭部とし，RT-PCR および 4 つの遺伝子型（SJNNV，RGNNV，BFNNV および TPNNV）の nested PCR で検査した。調査に供した対象種は，ウルメイワシ *Etrumeus teres*（体重 98.6 ± 63.6 g，n=90），マイワシ *Sardinops melanostictus*（体重 42.5 ± 5.6 g, n=15），キビナゴ *Spratelloides gracilis*（体重 5.4 ± 1.5 g，n=60），カタクチイワシ（体重 15.0 ± 6.9 g，n=293），チカ *Hypomesus japonicus*（体重 27.9 ± 6.1 g，n=30），スケトウダラ *Theragra chalcogramma*（体重 9.1 ± 2.6 g，n=30），サンマ *Cololabis saira*（体重 172.2 ± 12.6 g，n=30），マアジ（体重 35.5 ± 32.2 g，n=413），イカナゴ *Ammodytes personatus*（体重 15.4 ± 6.6 g，n=30），マサバ（体重 161.5 ± 102.5 g，n=149），トラエビ *Metapenaeopsis acclivis*（体重 4.3 ± 1.1 g，n=65），アカエビ *Metapenaeopsis barbata*（体重 3.4 ± 1.0 g，n=65），サルエビ *Trachypenaeus curvirostris*（体重 7.6 ± 2.2 g，n=6），およびスルメイカ（体重 52.9 ± 17.9 g，n=80）であった。

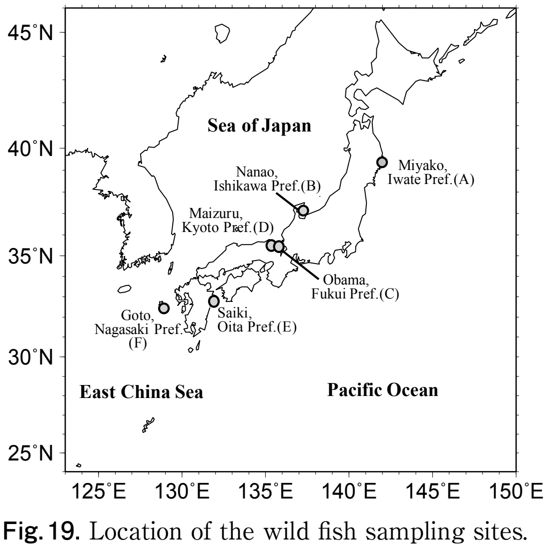

Fig. 19. Location of the wild fish sampling sites.

6-2-3　天然マアジからのウイルス検出・分離

2003年に宮古市に水揚げされた天然マアジ（体重20.8 ± 5.2g，n=62）および2005年に佐伯市に水揚げされた天然マアジ（体重37.4 ± 6.0g，n=92）を検査に供した。それぞれ保冷状態で上浦庁舎に輸送後，目および脳を採材し検査に供するまで -80℃で凍結保存した。

採取したサンプルは1検体当たり約50 mgに調整し，市販の核酸抽出試薬（ISOGEN，ニッポンジーン社製）でRNAを抽出し，RT-PCRおよび2つの遺伝子型のnested PCR（SJNNVおよびRGNNV）によりウイルス遺伝子を検出した（詳細な方法は第4章PCRによるベータノダウイルスの検出を参照されたい)。

RT-PCRおよびnested PCRで陽性となったマアジの目または脳のサンプルにHBSSを加え，磨砕後に孔径0.45 μmのフィルター（Millipore社製）でろ過した（磨砕ろ液)。ウイルスの分離には予め24ウェルプレート（培養液1mL，IWAKI社製）で培養したE-11細胞を用い，ウェルの培養液900 μLを除き，100 μLの磨砕ろ液を接種し1時間E-11細胞と接触させた後に，1,000 μLのHBSSで細胞を3回洗浄後，5%牛胎児血清（Gibco社製）を含むL-15培地（Gibco社製）1,000 μLに置換した。20℃で10日間培養し細胞変性効果の発現を観察した。分離ウイルス株は，E-11細胞で3回の限界希釈法によりクローニングをおこないウイルス株とした。攻撃試験には，ウイルス感染力価を$10^{9.0}$ $TCID_{50}$/mLに調整したウイルス液を用い，試験に供するまで -80℃で保存した。

6-2-4　感染実験

上浦庁舎で養成したシマアジおよびマアジ親魚から自然産卵により受精卵を得，そのふ化仔魚を実験に供した。いずれの仔魚も実験前にRT-PCRおよびSJNNV遺伝子型に特異的なnested PCRで検査し陰性であることを確認した。感染実験には，マアジ由来の5株（05SaiJJM-1 ～ 05SaiJJM-5）と陽性対照としてシマアジ病魚由来のSJNag93株を用い，陰性対照にはHBSSを使用した。500mLガラスビーカーにシマアジ仔魚では70 ～ 110個体，マアジ仔魚では180 ～ 220個体を収容し，$10^{7.0}$ $TCID_{50}$/Lになるようにウイルスを接種して，止水状態で観察した。観察期間はシマアジでは10日間，マアジでは7日間とした。飼育水温はシマアジでは22.6 ± 0.5℃，マアジでは19.5 ± 0.4℃で管理した。毎日観察し死亡魚は1日2回の頻度で取り上げ，冷凍保存または10%中性緩衝ホルマリンで固定し，RT-PCR検査，E-11細胞によるウイルス分離，および免疫組織検査（IFAT蛍光抗体）に供した。

6-2-5　ウイルス遺伝子の塩基配列の解析

天然マアジ由来ウイルス16株（RT-PCR陽性3株，分離株13株）とSJNag93のT4領域の塩基配列を，ABI PRISM3130xl ジェネティックアナライザー（アプライドバイオシステムズ社製）により決定した。ウイルス株間の遺伝的類縁関係は，塩基置換数に基づき近隣結合法によって作成した分子系統樹を用いて検討した。遺伝的類縁関係を比較するために，日本で分離されたSJNNV遺伝子型の代表株であるSJOri，SJNag93，Jp/06/Rpおよびヨーロッパ（スペインおよびポルトガル）で分離された03-160, SpSs-IAusc1974.08，PtSs-IAusc573.04，SpSs-IAusc156.03，PtSa-IAusc61.05の塩基配列をGen Bankのデータベースより取得して用いた（**Table 28**）（Nishizawa *et. al.*, 1995, 1997；Skliris *et al.*, 2001；Thiéry *et al.*, 2004；Olveira *et al.*, 2009)。詳細は第4章のウイルス遺伝子型の決定を参照されたい。

6-3　結　果

6-3-1　シマアジ種苗生産におけるVNNの発生

2003年のVNN防除対策と種苗生産結果を**Table 29**に示した。1回次（上浦庁舎親魚由来）では日齢21に，2回次（古満目庁舎親魚由来）では日齢7に水面付近を異常遊泳する個体が認められ，それらはRT-PCR陽性となりVNNの発生が確認された。ウイルスの遺伝子型については1回次の日齢21の死亡魚についてのみ調べたが，nested PCRによりSJNNV遺伝子型に分類された。

6-3-2　感染経路推定のための疫学調査

(1) 上浦庁舎における疫学調査

VNN発生後に上浦庁舎と古満目庁舎の親魚生殖腺を再度検査したが，ウイルス遺伝子は検出されず，上浦庁舎の親魚7個体の目，脳，延髄および生殖腺もPCR陰性であった。上浦庁舎の餌料生物におけるウイルス遺伝子の検出結果を**Table 26**に示した。マアジではRT-PCRにより65検体中36検体，SJNNV nested PCRで55検体中38検体が陽性となった。ス

Table 28. Samples used for sequencing

No.	Sample designation	Source of samples	Cluster	Reference	Accession no.
1	05SaiJJM-W1	RT-PCR product from JJM[*1] (brain; fish no.8), Saiki, Japan	V	This study	LC180341
2	05SaiJJM-W2	RT-PCR product from JJM (brain; fish no.29), Saiki, Japan	V	This study	LC180342
3	05SaiJJM-W3	RT-PCR product from JJM (brain; fish no.31), Saiki, Japan	IV	This study	LC180343
4	03MiyaJJM-1	Isolate from JJM (brain; fish no.44), Miyako, Japan	V	This study	LC180344
5	05SaiJJM-1	Isolate from JJM (brain; fish no.8), Saiki, Japan	V	This study	LC180345
6	05SaiJJM-2	Isolate from JJM (brain; fish no.29), Saiki, Japan	V	This study	LC180346
7	05SaiJJM-3	Isolate from JJM (brain; fish no.31), Saiki, Japan	V	This study	LC180347
8	05SaiJJM-4	Isolate from JJM (eye; fish no.8), Saiki, Japan	V	This study	LC180348
9	05SaiJJM-5	Isolate from JJM (eye; fish no.41), Saiki, Japan	V	This study	LC180349
10	05SaiJJM-6	Isolate from JJM (brain; fish no.17), Saiki, Japan	V	This study	LC180350
11	05SaiJJM-7	Isolate from JJM (eye; fish no.43), Saiki, Japan	IV	This study	LC180351
12	05SaiJJM-8	Isolate from JJM (eye; fish no.68), Saiki, Japan	V	This study	LC180352
13	05SaiJJM-9	Isolate from JJM (brain; fish no.73), Saiki, Japan	IV	This study	LC180353
14	05SaiJJM-10	Isolate from JJM (brain; fish no.77), Saiki, Japan	V	This study	LC180354
15	05SaiJJM-11	Isolate from JJM (brain; fish no.81), Saiki, Japan	V	This study	LC180355
16	05SaiJJM-12	Isolate from JJM (brain; fish no.91), Saiki, Japan	IV	This study	LC180356
17	SJNag93	Isolate from diseased SJ[*2] larvae, Japan	III	Nishizawa et al. 1997	AB056572
18	SJOri	Isolate from diseased SJ larvae, Japan	III	Nishizawa et al. 1995	D30814
19	Jp/06/Rp	Isolate from diseased SJ larvae, Japan	III	Skliris et al. 2001	AF175519
20	03-160	Isolate from diseased Senegalese sole, Spain	I	Thiéry et al. 2004	AJ698113
21	SpSs-IAusc 1974.08	Isolate from diseased Senegalese sole, Spain	I	Olveira et al. 2009	FJ803922
22	PtSs-IAusc 573.04	Isolate from diseased Senegalese sole, Portugal	II	Olveira et al. 2009	FJ803920
23	SpSs-IAusc 156.03	Isolate from diseased Gilthead sea bream Spain	II	Olveira et al. 2009	FJ803921
24	PtSa-IAusc 61.05	Isolate from diseased Gilthead sea bream, Portugal	II	Olveira et al. 2009	FJ803918

[*1] Japanese jack mackerel.
[*2] striped jack.

ルメイカではSJNNV nested PCRで45検体中12検体が陽性となった。マサバ，ナンキョクオキアミ，アサリ，シオミズツボワムシ（上浦株）からはウイルス遺伝子は検出されなかった。

上浦庁舎の2回次のシマアジ仔魚および上浦庁舎の冷凍マアジから検出されたベータノダウイルス（T4領域）のシークエンスに用いたサンプルを**Table 27**に，シークエンスに基づき解析した類縁関係を**Fig. 20**に示した。マアジから検出されたウイルスは，RGNNV遺伝子型，BFNNV遺伝子型およびTPNNV遺伝子型とは異なり，SJOriやSJNNV-NC003449とともに1つの大きなクラスターを形成するSJNNV遺伝子型に分類された。さらに，SJNNV遺伝子型はⅠ～Ⅲの3つのクラスターに再分類された。クラスターⅠでは，シマアジ仔魚から検出された9株（03SJ-1～03SJ-9）と冷凍マアジから検出された5株（03JJM feed-1，-3，-4，-5，-6）で構成され，このうち，シマアジ仔魚由来7株（03SJ-1，-2，-4，-5，-6，-7，-8）と冷凍マアジ由来5株（03JJM feed-1，-3，-4，-5，-6）は，塩基配列が一致した。シマアジ病魚由来のSJOri株とSJNNV-NC003449がクラスターⅡ，冷凍マアジ由来の3株（03JJM feed-2, -7, -8）がクラスターⅢに分類された。

Table 29. Seed production of striped jack at two laboratories of National Research Institute of Aquaculture in 2003

Trial no.	Brood stock		Disinfection method		RT-PCR (nested PCR)		
	Rearing place	PCR test on gonad[*1]	Fertilized eggs	Rearing seawater	5 dph[*4]	7 dph	21 dph
1	Komame Laboratry	Negative	Rinsed with oxidant[*2]	Treated with oxidant[*3]	ND[*5]	ND	4/4 (1/1)[*6]
2	Kamiura Laboratry	Negative	Rinsed with oxidant	Treated with oxidant	0/1	5/5	ND

[*1] Selecton of broodstock based on the RT-PCR and nested PCR detection of the betanodavirus gene from gonad before spawning season.
[*2] Fertilized eggs were washed one minute with seawater contained 0.5 mg/L oxidant.
[*3] Sea water was treated with oxidant (0.5 mg/L) for five minutes, and oxidant was removed through the activated charcoal.
[*4] Days post hatching.
[*5] No data.
[*6] Only SJNNV genotype was detected. Number of SJNNV-positive cases / examined.

(2) 日本沿岸域での疫学調査

天然魚介類からのPCR法によるベータノダウイルス遺伝子の検出結果を**Table 30**に示した。RT-PCRにより検出されたのはマアジのみで検出率は5.8%であった。nested PCRによる検出率は，SJNNV遺伝子型はウルメイワシが2.2%，マアジが20.3%，マサバが0.7%，トラエビが1.7%であった。RGNNV遺伝子型は，ウルメイワシが2.2%，マアジが5.8%，マサバが18.1%，スルメイカが1.3%であった。BFNNV遺伝子型はマアジからのみ検出され0.2%であった。TPNNV遺伝子型は検出されなかった。マイワシ，キビナゴ，カタクチイワシ，チカ，スケトウダラ，サンマ，イカナゴ，アカエビ，サルエビでは，ウイルス遺伝子は検出されなかった。

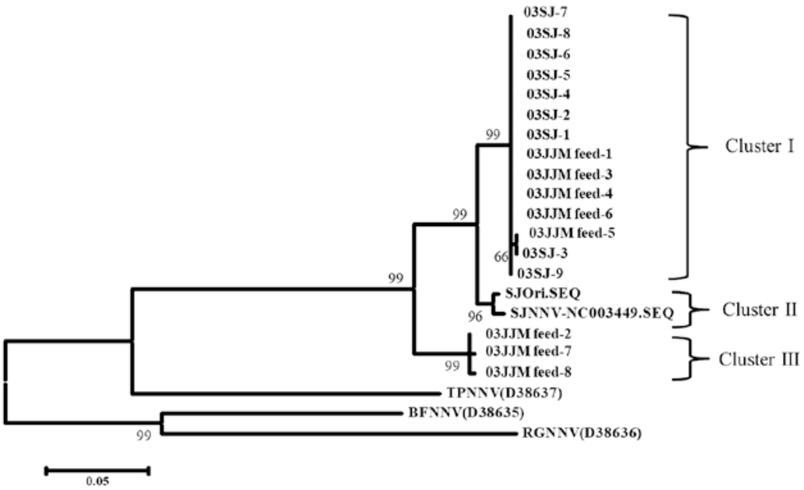

Fig. 20. A neighbor joining tree showing the phylogenetic relationships between the isolates from diseased larvae of Japanese jack mackerel and frozen Japanese jack mackerel as feed and genetic type strains of betanodavirus. The genetic group types are shown in parenthesis and bootstrap values >50 % are indicated.

Table 30. PCR detection of betanodavirus genes from feed creatures

Examined fish	Location (year)	No.of fish (mean body weight ± SD g)	Detection rate (%)				
			RT-PCR	Nested PCR for			
				SJNNV	RGNNV	BFNNV	TPNNV
Red-eye round herring *Etrumeus teres*	B, E (2003,2005)	90 (98.6± 63.6)	0	2.2	2.2	0	0
Japanese sardine *Sardinops melanostictus*	E (2005)	15 (42.5± 5.6)	0	0	0	0	0
Silver-stripe round herring *Spratelloides gracilis*	E (2005)	60 (5.4± 1.5)	0	0	0	0	0
Japanese anchovy *Engraulis japonicus*	A, B, D,E (2004, 2005)	293 (15.0± 6.9)	0	0	0	0	0
Japanese smelt *Hypomesus japonicus*	A (2004)	30 (27.9± 6.1)	0	0	0	0	0
Alaska pollock *Theragra chalcogramma*	A (2004)	30 (9.1± 2.6)	0	0	0	0	0
Pacific saury *Cololabis saira*	A (2004)	30 (172.2± 12.6)	0	0	0	0	0
Japanese Jack mackerel *Trachurus japonicus*	A, C, D, E, F (2003, 2004, 2005)	413 (35.5± 32.2)	5.8	20.3	5.8	0.2	0
Japanese sand lance *Ammodytes personatus*	A (2004)	30 (15.4± 6.6)	0	0	0	0	0
Chub mackerel *Scomber japonicus*	A, B, D (2004, 2005)	149 (161.5± 102.5)	0	0.7	18.1	0	0
Tora Velvet Shrimp *Metapenaeopsis acclivis*	E (2005)	65 (4.3± 1.1)	0	1.7	0	0	0
Whiskered Velvet Shrimp *Metapenaeopsis barbata*	E (2005)	65 (3.4± 1.0)	0	0	0	0	0
Hardback Shrimp *Trachypenaeus curvirostris*	E (2005)	6 (7.6± 2.2)	0	0	0	0	0
Japanese common flying squid *Todarodes pacificus*	B, D (2004,2005)	80 (52.9± 17.9)	0	0	1.3	0	0

A: Miyako city, Iwate Prefecture; B: Nanao city, Ishikawa Prefecture; C: Obama city, Fukui prefecture; D: Maizuru city, Kyoto Prefecture; E: Saiki city, Oita Prefecture; F: Goto city, Nagasaki prefecture.

6-3-3　天然マアジ由来ウイルスの解析

(1) 検出・分離

岩手県宮古市のマアジでは，62 個体のうち RT-PCR では 1 検体，nested PCR では SJNNV 遺伝子型が 4 検体，RGNNV 型が 2 検体から検出され，このうち 1 検体は 2 つの遺伝子型が検出された。これら PCR 陽性の 5 検体から SJNNV 遺伝子型が 1 株分離された。大分県佐伯市のマアジでは，92 個体のうち RT-PCR で 10 検体，nested PCR で 44 検体から SJNNV 遺伝子型が検出されたが，RGNNV 遺伝子型は検出されなかった。PCR 陽性の 44 検体から，SJNNV 遺伝子型

が12株分離された（**Table 31**）。

（2）病原性

浸漬感染実験におけるシマアジ仔魚およびマアジ仔魚の累積死亡率の変化を **Fig. 21** に示した。05SaiJJM-3株とSJOri株で攻撃したシマアジ仔魚では3日後に死亡し始め，5日目に全滅した。その他の株では，死亡が3，4日伸びて9日目に死亡率90%に達した。対照区は8日後までほとんど死亡せず，11日後に全滅した。マアジ仔魚ではいずれのウイルス株を用いた試験区においても死亡状況に大きな違いはなく，3日後から7日後にかけて死亡し，対照区では，わずかに全滅までの日数が延びた。いずれの死亡魚もRT-PCRで陽性となり，ウイルス感染力価は，シマアジ仔魚では$10^{6.0}$～$10^{10.3}$ $TCID_{50}$/g（平均$10^{9.0}$ $TCID_{50}$/g），マアジ仔魚では$10^{4.0}$～$10^{7.6}$ $TCID_{50}$/g（平均$10^{6.3}$ $TCID_{50}$/g）であった（**Table 32**）。また，組織標本のIFAT染色により，いずれの仔魚も網膜および脳組織に特異蛍光が認められた（**Fig. 22**）。対照区の死亡魚からは，PCRによりウイルス遺伝子は検出されず，組織標本のIFATで特異蛍光は認められず，培養細胞によりウイルスは分離されなかった。

（3）遺伝子解析

天然マアジ由来ウイルス株とシマアジ病魚由来のベータノダウイルス株のT4領域の遺伝子配列を比較

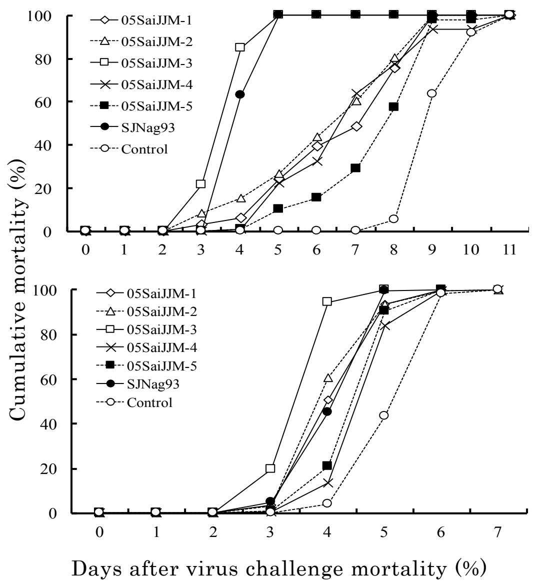

Fig. 21. Cumulative mortality of fish challenged with SJNNV isolated from wild Japanese jack mackerel. Fish (n = 70 – 220) were exposed to the virus ($10^{7.0}$ $TCID_{50}$/L) at 20° C in a 1-L beaker of seawater. A: striped jack larvae B: Japanese jack mackerel larvae.

Table 31. PCR-based detection and isolation of betanodavirus from wild Japanese jack mackerel

Location (year)	No. of fish (mean body weight±SD g)	No. of positive fish				
		RT-PCR	Nested PCR*1		Cell culture isolation	
			SJNNV	RGNNV	SJNNV	RGNNV
Miyako (2003)	62 (20.8±5.2)	1	4*2	2*3	1*2	0
Saiki (2005)	92 (37.4±6.0)	10	44*2	0	12*4	0

*1 with specific primers.
*2 include RT-PCR-positive fish.
*3 One of 2 was also Nested PCR-positive for SJNNV.
*4 include 10 RT-PCR-positive and 2 nested PCR-positive fish.

Table 32. PCR-based detection and isolation of betanodavirus from wild Japanese jack mackerel

Test fish larvae	Bath-challenged with virus isolate (source)	Detection of virus in dead larvae			
		No. of positive fish/ no. of examined fish		Virus titers (Log_{10} $TCID_{50}$/g) n=5	
		RT-PCR	FAT	Range (average)	Average in total
Striped jack (SJ)	05SaiJJM-1 (Brain of JJM)	5/5	5/5	6.7-8.8 (8.5)	9.4
	05SaiJJM-2(Brain of JJM)	5/5	5/5	6.0-7.0 (7.6)	
	05SaiJJM-3(Brain of JJM)	5/5	5/5	9.3-10.3 (9.9)	
	05SaiJJM-4 (Eye of JJM)	5/5	5/5	6.0-8.3 (7.9)	
	05SaiJJM-5 (Eye of JJM)	5/5	5/5	7.8-9.3 (8.8)	
	SJNag93 (Whole SJ larvae)	5/5	5/5	9.3-10.0 (9.7)	
	PBS (Control)	0/5	0/5	<2.8	
Japanese jack mackerel (JJM)	05SaiJJM-1 (Brain of JJM)	5/5	5/5	4.3-5.8 (5.4)	6.3
	05SaiJJM-2 (Brain of JJM)	5/5	5/5	4.0-5.8 (5.4)	
	05SaiJJM-3 (Brain of JJM)	5/5	5/5	4.8-6.6 (5.6)	
	05SaiJJM-4 (Eye of JJM)	5/5	5/5	4.0-5.6 (5.0)	
	05SaiJJM-5 (Eye of JJM)	5/5	5/5	4.0-4.8 (4.4)	
	SJNag93 (Whole SJ larvae)	5/5	5/5	5.6-7.6 (7.0)	
	PBS (Control)	0/5	0/5	<2.8	

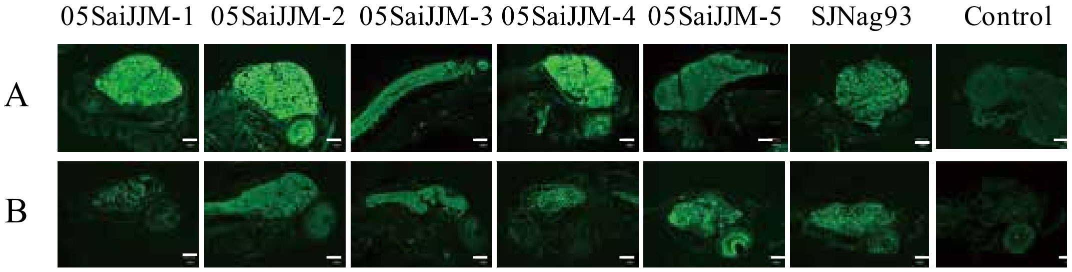

Fig. 22. Specific fluorescence in the central nervous systems and eyes of fish infected with the SJNNV isolates in FAT test. A: striped jack larvae B: Japanese jack mackerel larvae. Scale bar = 50 μm.

したところ，シマアジ病魚由来の SJOri 株と SJNag93 株では 3 ヵ所，Jp/06/Rp 株では 8 ヵ所の変異が認められた。天然マアジ由来ウイルス株では，それらの変異以外にも変異が認められ，非同義置換を含めて合計 35 ヵ所で変異が確認された（**Fig. 23**）。同一個体の脳から PCR で検出された配列と分離されたウイルスの配列は同一であった。また，同一個体で目と脳から分離されたウイルスの配列も同一であった。アミノ酸配列の比較では，SJOri 株に比べて，SJNag93 株では 2 ヵ所，Jp/06/Rp 株では 5 ヵ所，マアジ由来株では合計 16 ヵ所で違いが認められた（**Fig. 24**）。アミノ酸配列に基づき類縁関係を解析した結果，大きく 5 つのクラスターに分けられた。天然マアジ由来ウイルス株は，日本，スペインおよびポルトガルの病魚から分離されたウイルスとは異なり，クラスターⅣとⅤに分類された（**Table 28，Fig. 25**）。

6-4 考　察

シマアジの VNN 防除では，親魚からのウイルス伝播を遮断する対策が有効である（Mori *et al.*, 1998；虫明・有元，2000）。しかし，既報の防除対策を実施した生産において VNN が発生したため，親魚養成や種

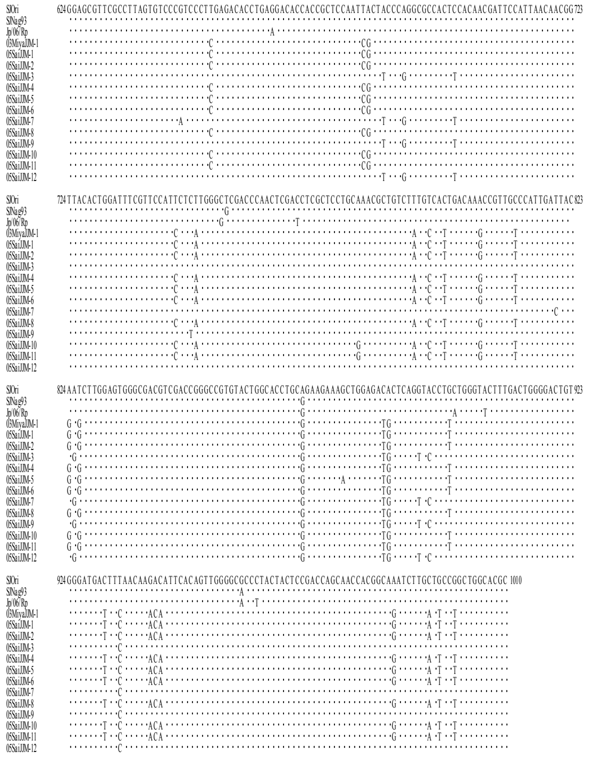

Fig. 23. Multiple alignment of the determined nucleotide sequences of PCR products (T4 region of RNA2) from SJNNV isolates.

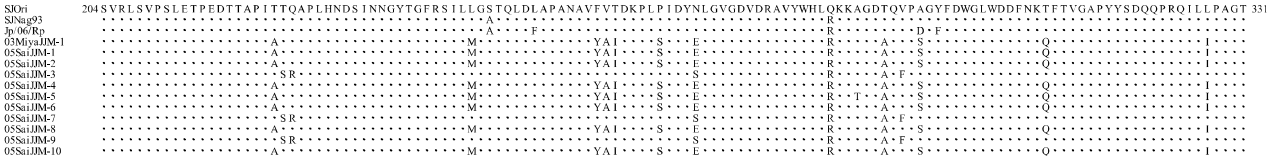

Fig. 24. Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of PCR products (T4 region of RNA2) from SJNNV isolates.

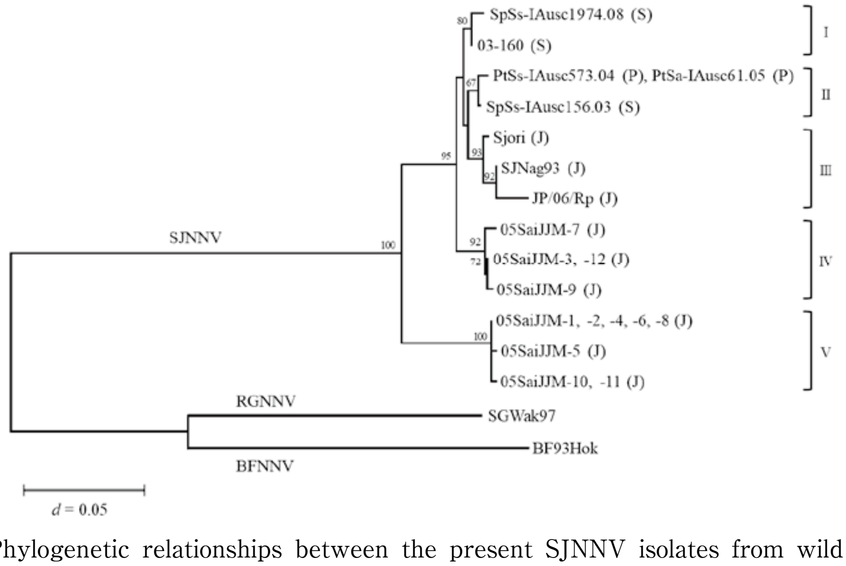

Fig. 25. Phylogenetic relationships between the present SJNNV isolates from wild Japanese jack mackerel and SJNNV sequences obtained from GenBank. Letters in parenthesis indicate the country from which SJNNV was isolated; (S) Spain, (P)Portugal, (J)Japan. The bootstrap values >65% are indicated. d: number of nucleotide substitutions per site.

苗生産に関わる生物についてベータノダウイルス感染の有無を調査した結果，親魚養成用の餌料である冷凍マアジが高率にSJNNV遺伝子型のベータノダウイルスに感染していることがわかった。検出されたウイルスの遺伝子配列（T4領域）の比較により，VNNにより死亡したシマアジ仔魚から検出されたウイルス株と冷凍マアジ由来のウイルス株の塩基配列が一致したことから，シマアジ種苗生産におけるVNNの発生は，冷凍マアジに感染していたウイルスが，何らかの経路を経てシマアジ種苗生産水槽に持ち込まれ，仔魚に感染したと推定された。冷凍マアジはシマアジ親魚には切り身にして給餌され，クエ親魚のモイストペレットの原料として使用されていた。VNN発生時には，マアジ等の天然魚におけるベータノダウイルス感染状況は不明であったため，餌料の冷凍マアジからシマアジ仔魚にウイルス感染が起こることは，想定されていなかった。このため，飼育担当者がモイストペレット作製後にシマアジの飼育に携わる機会も多かった。そこで，強度にウイルス感染した冷凍マアジの細断作業やモイストペレット作製に携わった担当者の手指や長靴などに付着したウイルスが，飼育管理の作業に伴いシマアジ飼育水槽内へ持ち込まれ仔魚に感染したものと想定された。一方，ウイルスに感染したマアジを摂餌したシマアジ親魚にウイルスが感染し，親魚からの垂直伝播により仔魚でVNNが発生した可能性が考えられた。しかし，種苗生産の産卵前とVNN発病後に2群のすべての親魚生殖腺をPCR検査したがウイルス遺伝子は検出されず，上浦庁舎でサンプリングした親魚7個体の目，脳，延髄および生殖腺からもウイルス遺伝子は検出されなかったことから，マアジ由来のウイルスがシマアジ親魚に感染し垂直感染により仔魚で発病したとする証拠は得られなかった。また，親魚水槽中には親魚が摂餌しなかった冷凍マアジが存在し，それらから排出されたウイルスが受精卵にとともに飼育水槽へ持ち込まれた可能性もあるが，受精卵はオキシダント海水で消毒されており，マアジ由来のウイルスが受精卵に付着するなどによりシマアジでVNNが発症した可能性は極めて低いと推定された。餌料生物のスルメイカからもSJNNV遺伝子型のウイルスが検出されたが，検出はnested PCRに限られており微量なウイルスが感染している状態といえる。また，検出率はマアジに比べて著しく低く，シマアジ仔魚への感染源となる可能性は冷凍マアジに比べると低いと思われる。これらの疫学情報を元に，従来の防除対策に加えて，担当者の飼育作業と調餌作業を完全に区分し，冷凍マアジからのウイルス感染を遮断して種苗生産した結果，VNNの発生はなく2回の生産で18万個体のシマアジ稚魚を生産することができた。

我が国周辺における天然魚のPCR検査によるベータノダウイルス感染の調査では，種々の魚介類からウイルス遺伝子が検出されている（Gomez *et al.*, 2004；Sakamoto *et al.*, 2008；Gomez *et al.*, 2010）。本研究の調査では天然マアジのRT-PCRとSJNNV型遺伝子を検出するnested PCRによる検出率は55％と69％と高くなっている。その他，SJNNV遺伝子型がウルメイワシとトラエビから，BFNNV遺伝子型がマアジから初めて検出され，魚類やイカ類だけではなく，ベータノダウイルスがエビ類にも感染している可能性が示された。ただし，これらは全てウイルス遺伝子の一部を検出したものである。自然界の生物群集内には生物の補食や被食による食物網の関係があるため，ウイルスのキャリアである生物やウイルス感染した生物を体内に取り込んだ生物を検査しているかも知れない。したがって，これらの生物種においてウイルス分離をおこない分離ウイルスを用いた感染実験等により，ベータノダウイルスに対する感受性を明確にする必要がある。

Sakamoto *et al.*（2008）は天然マアジ（n=110）のベータノダウイルス感染状況を調査し，RT-PCRとnested PCR（SJNNVおよびRGNNV）の検出率が0％と30％で，それらからウイルス分離を試みたが，ウイルスは分離されていない。その原因として，天然魚に不顕性感染しているウイルスは宿主に対する病原性や細胞への浸潤性が低いことが予想された。しかし，本研究において，特に佐伯市の天然マアジではRT-PCRとnested PCR（SJNNV）の検出率が11％と48％と高く，それらのうちRT-PCRで陽性の検体から12株のウイルスが分離された。RT-PCRの検出限界は，約$10^{3.5}$ $TCID_{50}$/gであることを考慮すると，これらの検体におけるウイルス感染力価は高いと推定され，高い感染力価が分離に成功した要因と考えられる。マアジにおけるSJNNV遺伝子型のベータノダウイルス感染は最初にPCRで検出され，同様な疫学調査によりマアジを含め30種の魚からRGNNV遺伝子が検出されている（Gomez *et al.*, 2004）。SJNNVはシマアジに対して宿主特異性を示すが，マアジにおける特性は確認されてはいない。しかし，同じアジ科であることから，SJNNVに対して親和性があるのかもしれない。

感染実験により天然マアジ由来ウイルスはシマアジおよびマアジ仔魚に対して病原性を示した。一般に，海産魚の仔魚は，ふ化後に外部栄養を摂取できない場合には，速やかに死亡に至るため，仔魚を用いた無給餌でのベータノダウイルスの感染実験では，対照区の仔魚も死亡するため，死亡率のみでウイルスの病原

性を評価するのは妥当とは言えない（Arimoto *et al*., 1992）。そこで，死亡率とともにIFATや死亡魚のウイルス感染力価を測定し病原性を検討した。その結果，IFATではいずれの魚種においても，脳および目において強い特異蛍光が認められ，ウイルスが強度に感染していることが確認された。一方，ウイルス感染力価の平均値は，シマアジが$10^{9.4}$ $TCID_{50}$/gであったのに対し，マアジでは$10^{6.3}$ $TCID_{50}$/gとなり，シマアジでは高い感染力価を示しSJNNV遺伝子型ウイルスに感受性が高いことが示された。このことはシマアジのVNN発生のほとんどが，日齢10までの仔魚期である（有元ら, 1994）ことと良く一致する。しかし，SJNNV型遺伝子のウイルス感受性が高いシマアジにおいても，発育段階によりウイルスの感受性が異なることから，シマアジよりもウイルス感受性が低いマアジでは，成長段階や加齢に伴いよりウイルス感受性に抵抗性を示し，不顕性感染の状態になっていることが考えられる（Arimoto *et al*., 1993）。

シマアジの感染実験では，05SaiJJM-3株と他の天然マアジ由来ウイルス株とでは，全滅までの日数が明らかに異なり，05SaiJJM-3株はシマアジ病魚由来のSJNag93株とほぼ同じ日数で全滅した。また，死亡魚におけるウイルス感染力価も05SaiJJM-3株はSJNag93株とほぼ同じ感染力価を示し，他のウイルス株より高くなった。このことから，05SaiJJM-3株はシマアジ仔魚に対してSJNag93株と同等の強い病原性を有すると推定された。マアジ仔魚に対しても05SaiJJM-3株は，他のマアジ由来株より若干早く全滅までの日数が短く，病原性が強いことが示唆された。このことから，マアジ由来のウイルスが種苗生産場に持ち込まれた場合には，容易に仔魚に感染することが推定される。これまで，種苗生産場で発生するVNNでは，親魚からの垂直伝播を中心に防除対策がなされてきた（Mori *et al*., 1998；虫明・有元, 2000；Watanabe *et al*., 1998）。しかし，種苗生産場で餌料生物として使用する天然の水産生物が，種苗生産対象種に病原性を有するウイルスに感染していることから，ベータノダウイルス感染が疑われる天然の餌料魚を使用することは，種苗生産場でのVNN発生の可能性を高める要因となることが示された。したがって，天然餌料魚に変えて配合飼料の使用を進める対策が必要である。加えて，天然海水中にもウイルスが存在すると推定されることから，VNNに感受性の高い仔稚魚を飼育する種苗生産場では，使用する用水の殺菌や消毒処理を施すことが重要である。

ベータノダウイルスの構造タンパク質をコードしているRNA2のT4領域は，塩基の変異が多様であり，ウイルス感染の宿主特異性や病原性に関与するとされている（Iwamoto *et al*., 2004；Ito *et al*., 2008）。また，日本ではSJNNV遺伝子型のベータノダウイルスによるVNNは，シマアジ仔魚においてのみ報告されている（Mori *et al*., 1992）。一方，南ヨーロッパでは，ヨーロッパスズキ *Dicentrarchus labrax*，ヨーロッパヘダイ *Sparus aurata* やササウシノシタ科の1種 *Solea senegalensis* においてSJNNV遺伝子型ベータノダウイルスによるVNNが発生している。これらの病魚から分離されたウイルスのT4領域における遺伝子配列の解析結果から，日本のシマアジ病魚由来のSJNNV遺伝子型ウイルスとヨーロッパで分離されたウイルスでは，系統発生学的に異なることが報告されている（Thiéry *et al*., 2004；Cutrin *et al*., 2007；Toffolo *et al*., 2007；Olveira *et al*., 2009；Cherif *et al*., 2011；Panzarin *et al*., 2012）。本研究におけるT4領域の遺伝子配列解析の結果，天然マアジから分離されたSJNNV型ウイルスは，上記のヨーロッパのどのSJNNV型ウイルスのクラスター（Ⅰ，Ⅱ）とも異なる別のクラスター（Ⅲ）に分類され，日本のウイルス株はさらに二つのクラスターを形成した（Ⅳ，Ⅴ）。クラスターⅣとⅤのウイルスではシマアジ仔魚に対する病原性に違いがあると思われるが，分離ウイルスのT4領域の変異と病原性との関連性について，本研究の感染実験では明確にすることはできなかった。今後，SJNNV型ウイルス株の病原性や宿主特異性に関する情報では，病原性発現の機序について，さらなる分子生物学的な解析が求められている。

第7章　総合考察

日本沿岸の水産資源を有効にかつ持続的に利用する栽培漁業や養殖業は，水産業を担う重要な業種である。これらの業種において種苗放流や養殖を行うためには人工種苗が必要であり，対象とする生物の種苗生産の安定性が求められる。しかし，海産魚の仔稚魚期に発生するVNNは，種苗の大量生産や安定生産の大きな阻害要因となっており，防除対策が求められている（第1章，第2章）。本研究は海産魚の種苗生産過程で発生するVNNの感染経路を推定し感染の防除を目的に実施した。種苗生産過程におけるVNNの感染経路については，シマアジにおいて調べられ，産卵親魚の生殖巣中にベータノダウイルス遺伝子が検出されることから，不顕性感染した親魚から仔魚へウイルスが垂直伝播することが明らかにされた（Arimoto *et al*., 1992）。本研究で材料としたキジハタ，アカアマダイおよびクロマグロでは，産卵親魚となる天然の親魚

候補からウイルス遺伝子が検出され，キジハタとアカアマダイではウイルスが分離された。また，分離したウイルスの病原性を感染実験により検討し，天然魚から分離したウイルス株が種苗生産場で問題となったウイルスと同等の病原性があることを示した。このことから，これらの魚種におけるVNNの感染経路も，シマアジと同様に親魚からの垂直伝播が主な感染経路と推定された。栽培漁業では遺伝子の多様性を保持する観点から，放流種苗に用いる親魚は天然魚を使用することから，親魚候補として導入する天然魚は，本ウイルスに感染していることを考慮し，養成や飼育管理を行うことは必然とも言え，VNN防除のために親魚のウイルス検査は必要である。また，受精卵の消毒や飼育水からの水平感染を防除するためにオキシダント処理した用水で飼育することも重要で，アカアマダイではシマアジと同じ防除対策が有効であることを改めて示した事例である（第4章）。一方，魚体が小さく生殖巣の採取が困難で親魚検査ができないキジハタでは，親魚の養成期間を3年程度とし，ヨード液による受精卵消毒，UV処理海水を用いた飼育で仔魚期のVNNの発生を防止できた。しかし，育成中の稚魚期にVNNが発生する場合がある（第3章）。魚体が巨大でキジハタ同様に親魚検査ができないクロマグロでは，電解オキシダントによる卵消毒と用水処理により，VNNの発生がなくなっており（第5章），キジハタの種苗生産においても，電解オキシダントの利用や親魚検査のために，非破壊的方法で養成親魚から効率的にウイルスを検出できる組織の検討とその採取法などの技術開発が必要である。また，受精卵を人工授精で得ることとし，ハタ類のVNN防除で開発された未受精卵や精子を洗浄する配偶子洗浄法（森ら，2015）の導入も考慮すべきである。配偶子洗浄法では，精子に関してウイルス排除効率が高い洗浄技術の開発が必要である。これらの技術は，稚魚の育成段階でVNNが発生し問題となっているクエやヤイトハタを始め他のハタ科魚類においても活用できると考えられる。一方，シマアジでは産卵行動のストレスによりPCR陰性個体が陽性に転ずることから，親魚の産卵回数を制御しVNNの発生を低減している（虫明，2000）。クロマグロも水族館の展示水槽や大型陸上水槽での自然産卵事例があり（Mimori *et al.*, 2008；岡ら，2015 [2)]），西海区水産研究所くろまぐろ増養殖研究センターの大型陸上水槽では，水温や日長の制御が可能なことから，環境要因が成熟や産卵に及ぼすメカニズムを解明し，産卵誘発や制御技術を開発しVNN防除技術の高度化が期待される。

シマアジ種苗生産において上述したVNN防除対策の実施，すなわち，PCR検査による親魚選別，オキシダントによる受精卵消毒と用水処理を行ったにも関わらずシマアジ仔魚でVNNが発生したことを契機とし，感染源の探索を行った結果，親魚の餌として使用する冷凍の天然マアジがPCR検査で陽性となり，冷凍マアジから検出されたウイルスとシマアジ病魚のウイルスの塩基配列が同じであったことから感染源であることを示した（第6章）。ベータノダウイルスのRNA2を標的としたRT-PCR法およびnested PCR法では，微量ウイルスの検出や遺伝型別を迅速に解析できるが，ウイルス遺伝子のみの検出では，擬似反応による不確定要素も含んでいる。そこで，本研究では，天然マアジからSJNNVを分離し，その病原性をシマアジとマアジの仔魚を用いた感染実験により検討し，シマアジの種苗生産でVNNの原因となったSJNNVと同等の病原性であることを明らかにした。一方，天然の甲殻類や頭足類においてもPCR法によりベータノダウイルス遺伝子の存在が示され，本研究によりSJNNV遺伝子が検出されたスルメイカでは，感染実験による病原性の確認はなされていないもののベータノダイルスが分離されており，これらの生物によるウイルス感染の危険性も指摘されている（Gomez *et al.*, 2006, 2010）。このことから，親魚や育成魚の餌に天然魚やイカ類などを用いることはVNN感染の機会を増やすこととなる。そこで，餌料として用いる天然魚のウイルス感染調査を行い感染のない魚種を使用する。また，一般に養魚用飼料にはイワシ類，アジ類やサバ類が用いられるが，その作製過程で高温高圧によって造粒される。SJNNVは60℃では30分間の処理で不活化されることから（Arimoto *et al.*, 1996），配合飼料中に存在するベータノダウイルスも不活化されると想定される。したがって，親魚養成には配合飼料を使用することが肝要であり，魚種の栄養要求に合わせた親魚用飼料の開発が望まれる。

天然の不顕性感染魚はウイルスのベクターになることが指摘されており（Curtis *et al.*, 2001；Barker *et al.*, 2002），遊泳魚のマアジは北海道から南シナ海まで分布し，日本のどの養殖場海域にも回遊し分布することから，ウイルスのベクターになり得る。一方，天然キジハタでは網膜や脳だけでなく心臓，肝臓，脾臓や生殖腺の主要臓器からウイルス遺伝子が検出され

2）岡　雅一・玄　浩一郎・高志利宣・樋口健太郎・澤口小有美・門田立・塩澤　聡・二階堂英城・西　明文・久門一紀・田中庸介・江場岳史・樋口理人・辻田明子・鈴木絢子・小西淳平・虫明敬一（2015）：持続的養殖プロ研マグロ－16：大型陸上水槽でのクロマグロ人工3歳魚の産卵．平成27年度日本水産学会春季大会．529, pp. 73.

感染が進行している状態の魚の存在や，VNN の病徴を示す個体（Gomez *et al*., 2009）が認められたことから，ウイルス感染したマアジも自然界において VNN により死亡することが容易に想像される。VNN の発生により不顕性感染魚から水中に排出されたベータノダウイルスは，感受性のある魚が高密度に飼育されている養殖場では，容易に感染し VNN による死亡が起こると推定される。そして，VNN の発生により大量の高病原性のウイルスが再び環境水中に拡散し水平感染の感染源となると予想される。日本では SJNNV が原因のシマアジの VNN では陸上水槽の仔魚期においてのみ確認されているが，南ヨーロッパの海産魚養殖における SJNNV による VNN の発生には，このような感染環により成立していると思われる。また，陸上水槽で種苗生産されたマハタ人工魚では，海面生簀に移動し育成すると VNN が発生することが知られており，同様の感染様式が想定される。いずれにせよ，天然の海水中には感染魚から排出されたウイルスが存在していると推定される。そこで，天然海水を用水として使用している種苗生産施設では，用水を介した水平感染の危険性が，より明確に示されることとなり，改めて用水殺菌の必要性が認識されることとなった。SJNNV の宿主特異性や自然環境におけるウイルスの伝播様式については，不明な点がたくさんある。これに関連して，海水から培養細胞を用いたウイルスの分離方法が最近になって報告されており（Nishi *et al*., 2016），VNN やベータノダウイルスの疫学研究の有効な手段となろう。

VNN の防除においてワクチンは魚のウイルス感染を防ぐ最も有効的な生物製剤である。上記した仮説に基づくと天然魚から継続的に感染性のあるベータノダウイルが排出されていることとなり，ワクチンは海面養殖魚における VNN 防除の唯一の防除法である。しかしながら，現在，日本では市販されている VNN 防除のワクチンは，マハタの RGNNV 感染に対するものだけである（黒田・中井，2012）。今後は，様々な養殖対象種において，他の遺伝子型の VNN ワクチンの開発が望まれる。また，ゲノム情報を利用した選抜育種技術の発展により，ヒラメではリンホシスチス病，太平洋サケでは伝染性膵臓壊死症（Infectious pancreatic necrosis）に対する形質連鎖マーカーの開発（Fuji *et al*., 2007；Moen *et al*., 2015）により，これらの魚種で耐病性を有する品種が作出されていることから，VNN に耐性を有する品種の開発も検討すべきである。

一方，天然キジハタではほぼ全身の組織からウイルスが検出され病的な状態と考えられる個体が存在することや，天然マアジ分離株ではシマアジやマアジ仔魚に高い病原性を示すことから，それぞれの魚種においてウイルスの感染が天然資源に少なからぬ影響を与えている可能性が示された。今後, 天然仔稚におけるベータノダウイルス感染の疫学調査により，天然資源に与える影響についても検討されることが望まれる。

種苗期疾病情報事業や種苗期連絡協議会において，参画機関と種苗期の疾病発生について情報交換を行うことにより，種苗生産過程では飼育管理以外の死亡要因として VNN が関与することを多くの種苗生産関係者が認識することとなり，VNN の防除意識を高めたのは本事業の功績の一つである。各機関において種苗生産に際しては仔魚の発育に合わせて継続的にウイルス感染をモニターし，感染が認められた場合には速やかに処分などの対処を行い，飼育施設内での 2 次感染を防ぐことも，種苗生産を安定的させる上で必要な処置である。

本論文では，種苗生産場において防除を必要とする疾病として VNN が最も重要であることを示し，キジハタ，アカアマダイ，クロマグロの VNN のウイルス感染の機序が，これまでに報告された親魚からの垂直伝播であることを述べ，合わせて天然のキジハタ，アカマダイ，マアジが病原性を有するウイルスを保有していることから，水平伝播の危険性についても改めて指摘した。さらに, それらのウイルス伝播経路以外に, 種苗生産場で親魚や養成魚の餌料として使用されている天然魚が VNN の感染源になり得ることから，VNN の発生防除に向けて新たな対策を提示した。これらのことが，海産魚類の今後の種苗生産における VNN 防除の一助となり，種苗の安定生産に繋がれば幸いである。

謝　辞

本研究を行う契機となったのは，1991 年に著者が旧社団法人日本栽培漁業協会神戸支部に赴任し，日栽協各事業場と都道府県の栽培漁業関係機関との間で種苗期の疾病や大量死亡に関する情報交換を行う，種苗期疾病情報事業の事務局として情報収集と取りまとめを担当したことです。当時，日栽協の上浦事業場，古満目事業場，五島事業場においてシマアジの VNN が発生し，広島大学と京都大学および日栽協において，共同研究により診断法や防除対策技術の開発がなされており，いち早く最新の情報を関係機関に提供することができました。VNN 発生の当初から研究者として広島大学においてウイルス学の基礎研究のみならず種苗生産現場に足を運んで頂き，本研究の全般にわたり

終始懇切な御指導と御助言を賜り，現場レベルの防除対策の構築に御尽力頂くとともに，本論文の御校閲を頂いた　広島大学大学院生物圏科学研究科　中井　敏博 教授に謹んで深謝の意を表します。また，広島大学生物圏科学研究科　河合　幸一郎　教授，大塚　攻　教授，坂井　陽一　教授，長沼　毅　教授ならびに東京海洋大学　佐野　元彦　教授には本論文をお読み頂き種々の有益なご助言を賜わった。これらの御厚情に対して感謝の意を表します。

旧日栽協の古澤　徹　常務理事，水田　洋之介　技術部長，中田　雅子　業務課長には，種苗期の疾病発生情報に関する情報収集や整理方法について御助言を賜った。また，広島大学の室賀　清邦　名誉教授，北海道大学の吉水　守　名誉教授，長崎大学の吉越　一馬　名誉教授，元日本海区水産研究所　反町　稔所長には，得られた種苗期の疾病情報の内容および記述方法について，魚病の専門家の立場より御指導と有益な御助言を頂き，心より感謝致します。さらに，種苗期の疾病発生状況を明らかにできたのは，全国の種苗生産機関の担当者の方々から，生産現場で発生している疾病情報の提供を頂いたことであり，謹んでお礼申し上げます。

水産研究・教育機構増養殖研究所魚病研究センター長の森　広一郎　博士（現　水産研究・教育機構付，東南アジア漁業開発センター派遣）には，VNN 防除技術を進める上で研究内容について終始にわたり御指導を賜り，魚病研究センター主任研究員の佐藤　純博士には，種苗生産現場で使用可能な VNN 防除技術の開発と高度化に御指導を賜った。京都大学の古澤　巖　名誉教授には，ウイルス学の基礎および応用知識を御教授頂き，増養殖研究所特任部長の有元　操　博士（現　一般社団法人日本漁場藻場研究所業務部長）には，VNN 診断法や実験手法の基礎をお教え頂いた。西海区水産研究所業務推進部主幹研究員の虫明　敬一博士には，疾病防除に関する技術開発の進め方について御指導を頂き，まぐろ増養殖研究センター長の岡　雅一　博士には，世界的なマグロ養殖に関する動向について有益な御助言を頂きました。瀬戸内海区水産研究所無脊椎研究センター主任研究員の菅谷　琢磨　博士には，遺伝子解析について御指導を頂きました。これらの方々の御厚情に対して，それぞれ感謝の意を表します。

親魚養成や種苗生産技術および生産現場での防除技術の開発について，キジハタでは岡山理科大学専門学校の津村　誠一　学科長，アカアマダイでは，日本海区水産研究所資源生産部の竹内　宏行　主任研究員，クロマグロでは日栽協奄美事業場場長の升間　主計　博士（現　近畿大学水産研究所所長　教授），西海区水産研究所まぐろ増養殖研究センターの塩澤　聡　種苗量産グループ長，今泉　均　主任研究員（現　増養殖研究所ウナギ種苗量産研究センター主任研究員）二階堂　英城　主任研究員（現　東北区水産研究所沿岸漁業資源研究センター資源増養殖グループ長），主任技術員の武部　孝行　博士（現　水産庁栽培養殖課養殖国際専門官），久門　一紀　主任研究員，シマアジでは養殖研究所栽培技術開発センターの堀田　卓朗　主任研究員，餌料に使用される天然魚の採集では，東北区水産研究所沿岸漁業資源研究センターの藤浪　祐一郎　主任研究員（現　西海区水産研究所資源生産部魚介類生産グループ長），日本海区水産研究所資源生産部の手塚　信弘　主任研究員（現　資源生産部初期餌料グループ長），に御尽力頂いた。また，多数のサンプルからウイルス遺伝子を検出する疫学調査では，増養殖研究所上浦庁舎の吉岡　康美氏，上甲　美保氏，増井美和氏，今津　佐智美氏に多大な協力を頂いた。また，本研究では，増養殖研究所上浦庁舎，瀬戸内海区水産研究所玉野庁舎，日本海区水産研究所宮津庁舎および西海区水産研究所奄美庁舎の職員の方々に御協力頂いた。ここに記して感謝申し上げる。

引用文献

Athanassopoulou F., Billinis C., Psychas V. and Karipoglou K., 2003：Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* (L.) farmed in fresh water in Greece. *J. Fish Dis.*, **26**, 361－365.

Athanassopoulou F., Billinis C. and Prapas Th., 2004：Important diseases conditions of newly cultured species in intensive freshwater farms in Greece: first incidence of nodavirus infection in *Acipenser* sp. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 247－252.

Arimoto M., Mushiake K., Mizuta Y., Nakai T., Muroge K. and Furusawa I., 1992：Detection of Striped Jack Nervous Necrosis Virus (SJNNV) by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *GyobyoKenkyu*, **27**, 191－195.

Arimoto M., Mori K., Nakai T., Muroge K. and Furusawa I., 1993：Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider). *J. Fish Dis.*, **16**, 461－469.

Arimoto M., Sato J., Maruyama K., Mimura G. and Furusawa I., 1996：Effect of chemical and

physical treatments on the inactivation of striped jack necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture*, **143**, 15－22.

有元　操・丸山敬悟・古澤　巖，1994：シマアジのウイルス性神経壊死症の発生状況．魚病研究，**29**, 19－24.

有元　操，1995：シマアジのウイルス性神経壊死症に関する研究．京都大学博士学位論文．

Arimoto M., Sato J., Maruyama K., Mimura G. and Furusawa I., 1996： Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture*, **143**, 15－22.

有元　操，2000：防疫的な見地からみた放流用種苗．日水誌，**66**, 156－157.

Azad I. S., Shekhar M. S., Thirunavukkarasu A. R., Poornima M., Kailasam M., Rajan J. J. S., Ali S. A., Abraham M. and Ravichandran P., 2005：Nodavirus infection causes mortalities in hatchery-produced larvae of Lates calcarifer: first report from India. *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 113－118.

Barker D. E., MacKinnon A. M., Boston L., Burt M. D. B., Cone D. K., Speare D. J., Griffiths S., Cook M., Ritchie R. and Olivier G., 2002： First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Dis. Aquat. Org.*, **49**, 99－105.

Bigarre L., Cabon J., Baud M., Heimann M., Body A., Lieffrig F. and Castric J., 2009：Outbreak of betanodavirus infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in fresh water. *J. Fish Dis.*, **32**, 667－673.

Bloch B., Gravningen K. and Larsen J. L., 1991：Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Dis Aquat. Org.*, **10**, 65－70.

Boonyaratpalin S., Supamattaya K., Kasornchandra J. and Hoffmann R. W., 1996：Picorna-like virus associated with mortality and a spongious encephalopathy in grouper *Epinephelus malabaricus*. *Dis. Aquat. Org.*, **26**, 75－80.

Bovo G., Nishizawa T., Maltese C., Borghesan F., Mutinelli F., Montesi F. and De Mas S., 1999：Viralencephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy. *Virus Res.* **63**, 143－146.

Breuil G., Bonami J. R., Pepin J. F. and Pichot Y., 1991：Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, **97**, 109－116.

Cherif N., Lopez-Jimena B., Garcia-Rosado E., Cano I., Castro D., Borrego J. J., Alonso M. C. and Hammami S., 2011：Detection of SJNNV and RGNNV genotypes using a relative quantification RT-PCR assay. *J. Appl. Ichthyol.*, **27**, 805－812.

Chew-Lim M., Chong S. Y. and Yoshimizu M., 1998：A nodavirus isolated from grouper (*Epinephelus tauvina*) and seabass (*Lates calcarifer*). *Fish Pathol.*, **33**, 447－448.

Chi S. C., Lo C. F., Kou G. H., Chang P. S., Peng S. E. and Chen S. N., 1997：Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, **20**, 185－193.

Chi S. C., Lo C. F. and Lin S. C., 2001：Characterization of grouper nervous necrosis virus. *J. Fish Dis.*, **24**, 3－13.

Chi S. C., Shieh J. R. and Lin S. J. 2003：Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 221－228.

Chua F. H. C., Loo J. J. and Wee J. Y., 1995：Mass mortality in juvenile greasy grouper, *Epinephelus tauvina*, associated with vacuolating encephalopathy and retinopathy, in "Diseases in Asian Aquaculture Ⅱ" (ed. by Shariff, M. J. R. Arthur and R. P. Subasinghe), Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Philippines, pp.235－241.

中国四国農政局統計情報部，2001,：平成 11 年岡山県漁業の動き，岡山農林統計協会，岡山，pp.47.

中国四国農政局統計情報部，2005：平成 15 年岡山県漁業の動き，岡山農林統計協会，岡山，pp.41.

中国四国農政局統計情報部，2010：平成 20 年岡山県漁業の動き，岡山農林統計協会，岡山，pp.29.

Curtis P. A., Drawbridge M., Iwamoto T., Nakai T., Hedrick R. P. and Gendron A. P., 2001：Nodavirus infection of juvenile white seabass, *Atractoscion nobilis*, cultured in southern

California: first record of viral nervous necrosis (VNN) in North America. *J. Fish Dis.*, **24**, 263－271.

Cutrin J. M., Dopazo C. P., Thiéry R., Leao P., Olveira J. G., Barja J. L. and Bandin I., 2007：Emergence of pathogenic betanodaviruses belonging to the SJNNV genogroup in farmed fish species from the Iberian Peninsula. *J. Fish Dis.*, **30**, 225－232.

Danayadol Y. and Direkbusarakom S., 1995：Viral nervous necrosis in brownspotted grouper, *Epinephelus malabaricus*, cultured in Thailand, in "Diseases in Asian Aquaculture" (ed by Shariff M., J. R. Arthur and R. P. Subasinghe), Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Philippines, pp. 227－233.

FAO, 2015：Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department, Global Tuna Catches by Stock (online query). http://www.fao.org/fishery/statistics/tuna-catches/query/en.

Felsenstein J., 1989：PHYLIP-Phylogeny Inference Package (version 3.2). *Cladistics*, **5**, 164－166.

Frerichs G. N., Rodger H. D. and Peric Z., 1996：Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Gen. Virol.*, **77**, 2067－2071.

Fuji K., Hasegawa O., Honda K., Kumasaki K., Sakamoto T. and Okamoto N., 2007：Marker-assisted breeding of a lymphocystis diseases-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, **272**, 291－295.

藤田矢郎，1962：トラフグの人工授精と仔魚飼育．水産増殖，**10**, 15－22.

Fukuda Y., Nguyen H. D., Furuhashi M. and Nakai T., 1996：Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathol.*, **31**, 165－170.

福永恭平・野上欣也・吉田儀弘・浜崎活幸・丸山敬悟，1990：日本栽培漁業協会・玉野事業場における最近のキジハタ種苗生産量の増大と問題点について．栽培技研，**19**, 33－40.

Gagné N., Johnson S. C., Cook-Versloot M., MacKinnon A. M. and Olivier G., 2004：Molecular detection and characterization of nodavirus in several marine fish species from the northeastern Atlantic. *Dis. Aqua. Org.*, **62**, 181－189.

Glazebrook J. S., Heasman M. P. and De Beer S. W., 1990：Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *J. Fish Dis.*, **13**, 245－249.

Gomez D. K., Sato J., Mushiake K., Isshiki T., Okinaka Y. and Nakai T., 2004：PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *J. Fish Dis.*, **27**, 603－608.

Gomez D. K., Lin D. J., Baeck G. W., Youn H. J., Shin N. S., Youn H. Y., Hwang C. Y., Park J. H. and Park S. C., 2006：Detection of betanodavirus in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates. *J. Vet. Sci.*, **7**, 369－374.

Gomez D. K., Matsuoka S., Mori K., Okinaka Y., Park S. C. and Nakai T., 2009：Genetic analysis and pathogenicity of betanodavirus isolated from wild redspotted grouper *Epinephelus akaara* with clinical signs. *Arch. Virol.*, **154**, 343－346.

Gomez D. K., Mori K., Okinaka Y., Nakai T. and Park S. C., 2010：Trash fish can be a source of betanodaviruses for cultured marine fish. *Aquaculture,* **302**, 158－163.

Grotmol S., Totland G. K., Kvellestad A., Fjell K. and Olsen A. B., 1995：Mass mortality of larval and juvenile hatchery-reared halibut (*Hippoglossus hippoglosus*) associated with the presence of virus-like particles in vacuolated lesions in the central nervous system and retina. *Bull. Euro. Assoc. Fish Pathol.*, **15**, 176－180.

Grotmol S., Totland G. K. and Kryvi H., 1997：Detection of a nodavirus-like agent in heart tissue from reared Atlantic salmon *Salmo salar* suffering from cardiac myopathy syndrome (CMS). *Dis. Aquat.* Org., **29**, 79－84.

浜崎活幸，1997：ガザミ種苗生産技術の理論と実践（ガザミ種苗生産研究会編），（社）日本栽培漁業協会，東京，pp.138.

浜崎活幸，2002：(2) アミメノコギリガザミの種苗生産試験．平成12年度日本栽培漁業協会年報，362－366.

畑井喜司雄，1998：甲殻類種苗生産における真菌病．月刊海洋号外 総特集魚類防疫，**14**, 37－41.

樋口健太郎・江場岳史・田中庸介・久門一紀・西　明文・二階堂英樹・塩澤　聡，2011：クロマグロ種苗生産におけるウイルス性神経壊死症防除のため

のハマフエフキ受精卵の大量消毒法. 水産技術, **4**, 15－20.

樋口健太郎・小西淳平・高志利宜・田中庸介・鈴木絢子・辻田明子・澤口小有美・玄　浩一郎・岡　雅一・虫明敬一, 2015：電解海水がクロマグロ *Thunnus orientalis* 受精卵のふ化に及ぼす影響. 水産増殖, **63**, 333－341.

日野明徳, 2004：種苗生産,「現代の水産学」(日本水産学会出版委員会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.124－131.

Hudinaga M., 1942：Reproduction, development and rearing of *Penaeus japonicus* Bate. *Japan. J. Zool.*, **10**, 305－393.

福所邦彦, 1986：飼育技術の問題点,「マダイの資源培養技術」(田中克・松宮義晴編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.9－25.

本間守男, 1997：1. ウイルス学 1.3 人間,「ウイルス学」, 朝倉書店, 東京, pp.22－29.

本藤　靖・村上直人・渡辺　税・竹内宏行・藤浪祐一郎・津崎龍雄, 2001：人工授精によるアカアマダイの種苗生産. 栽培技研, **28**, 73－79.

今井丈夫・稲葉傳三郎・佐藤 隆平・畑中 正吉, 1950：無色鞭毛虫に依るナマコ (*Stichopus japonicus Selenka*) の人工飼育. 東北大学農学部研究所報告, **2**, 219－277.

稲葉伝三郎・吉牟田長生, 1980：栽培漁業,「水産百科事典」(水産百科事典編集委員会編), 海文堂, 東京, pp.210.

Ito Y., Okinaka Y., Mori K., Sugaya T., Nishioka T., Oka M. and Nakai T., 2008：Variable region of betanodavirus RNA2 is sufficient to determine host specificity. *Dis. Aquat. Org.*, **79**, 199－205.

伊藤　隆, 1960：三重県立大学水産学部研究報告 .3, 708－740.

Iwamoto T., Mori K., Arimoto M. and Nakai T., 1999：Highpermissivity of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Org.*, **39**, 37－47.

Iwamoto T., Nakai T., Mori K., Arimoto M. and Furusawa I., 2000：Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat., Org.*, **43**, 81－89.

Iwamoto T., Okinaka Y., Mise K., Mori K., Arimoto M., Okuno T. and Nakai T., 2004：Identification of host-specificity determinants in betanodaviruses by using reassortants between striped jack nervous necrosis virus and sevenband grouper nervous necrosis virus. *J. Virol.* **78**, 1256－1262.

Johansen R., Sommerset I., TØrud B., Korsnes K., Hjortaas M. J., Nilsen F., Nerland A. H. and Dannevig B. H., 2004：Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J. Fish Dis.*, **27**, 591－601.

Johnson S. C., Sperker S. A., Leggiadro C. T., Groman D. B., Griffiths S. G., Richie R. J., Cook M. D. and Cusack R. R., 2002：Identification and characterization of a piscine neuropathy and nodavirus from juvenile Atlantic cod from the Atlantic coast of North America. *J. Aqua. Anim. Health*, **14**, 124－133.

Jung S. L., Miyazaki T., Miyata M. and Oishi T., 1996：Histopathological studies on viral nervous necrosis in a new host, Japanese sea bass *Lateolabrax japonicas*. *Bulletin of the Faculty of Bioresources, Mie University*, **16**, 9－16.

笠原正五郎・平野礼次郎・大島泰雄, 1960：クロダイ人工孵化仔魚の飼育とその成長について. 日水誌, **6**, 9－243.

Kamaishi T., Miwa S., Goto E., Matsuyama T., Oseko N., 2010： Mass mortality of giant abalone Haliotis gigantea caused by a Francisella sp. Bacterium. *Dis. Aquqt. Org.*, **89**, 145－154.

鴨志田正晃・高橋　誠・水田洋之介, 2005：種苗生産過程の海産魚介類における疾病発生状況 (1994 ～ 1999). 栽培技研, **32**, 15－24.

狩野　峻, 1952：邦産アワビ属の増殖に関する生物学的研究. 東海区水研報, **5**, 1－102.

狩野　峻, 1966：アワビとその増養殖. 水産増養殖叢書, 日本水産資源保護協会, **11**, 99.

菊池省吾・浮　永久, 1974：アワビ属の採卵技術に関する研究 第 2 報紫外線照射海水の産卵誘発効果. 東北水研報, **33**, 79－86.

小林一彦, 2006：特集　栽培漁業技術開発の最前線 - Ⅰ　第 5 次水産動物の種苗の生産及び放流並びに水産動物の育成に関する基本方針の概説. 日水誌, **72**, 242－245.

小原昌和・小川　慈・笠井久会・吉水　守, 2010：養殖サケ科魚類の人工採卵における等調液洗卵法の除菌効果. 水産増殖, **58**, 37－43.

Kumagai A. and Nawata A., 2010：Prevention of *Flavobacterium psychrophilum* vertical transmission by iodophor treatment of unfertilized eggs in salmonids. *Fish Pathol.*, **45**,

164－168.

熊谷　明・杉本晃一・伊藤大介・釜石　隆・三輪　理・飯田貴次，2006：マコガレイ稚魚に発生した非定型*Aeromonas salmonicida* 感染症．魚病研究，**41**, 7－12.

Kumai H., 1997：Present state of bluefin tuna aquaculture in Japan. *Aquaculture Science,* **45**, 93－297.

熊井英水，1998：クロマグロの人工ふ化飼育とその再生産に関する研究－総説－．日水誌，**64**, 601－605.

倉田　博，1959：ニシン稚魚の飼育について．北海道区水産研究所報告，**20**, 117－138.

黒田　丹・中井敏博，2012：海産魚のウイルス性神経壊死症のワクチン開発．日生研たより，**58**, 54－64.

Lai Y. S., Murali S., Chiu H. C., Ju H. Y., Lin Y. S., Chen S. C., Guo I. C., Fang K. and Chang C. Y., 2001：Propagation of yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) in a new nodavirus-susceptible cell line from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), brain tissue. *J. Fish Dis.*, **24**, 299－309.

Le Breton A., Grisez L. and Olievier F., 1997：Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Fish Dis.*, **20**, 145－151.

Lin C.S., Lu M. W., Tang L., Liu W., Chao C. B., Lin C. J., Krishna N. K., Johnson J. E. and Schneemann A., 2001：Characterization of virus-like particles assembled in a recombinant baculovirus system expressing the capsid protein of a fish nodavirus. *Virology,* **290**, 50－58.

前川兼佑，1961：瀬戸内海，特に山口県沿岸における漁業の調整管理と資源培養に関する研究．山口県内海水産試験場研究業績，**11**, 1－483.

Maeno Y., Penã de la L. D. and Cruz-lacierda E. R., 2002：Nodavirus infection in hatchery-reared orange spotted grouper *Epinephelus coioides*: first record of viral nervous necrosis in the Philippines. *Fish Pathol.*, **37**, 87－89.

Maeno Y., Penã de la L. D. and Cruz-lacierda E. R., 2007：Susceptibility of fish species cultured in mangrove brackish area to piscine nodavirus. *Japan Agri. Res. Quart.*, **41**, 95－99.

真崎邦彦，1994：棘抜け症（仮称）に罹病したアカウニ稚ウニの病変部位から観察された細菌について．佐栽セ研報，**3**, 105－106.

Matsuoka T., 1989：Current state of affairs and problems facing sea-farming with emphasis placed on technical problems of fingerling production. *Int. J. Aquacult. Fish. Technol.*, **1**, 324－332.

Mimori R., Tada S. and Arai H., 2008：Overview of husbandry and spawning of bluefin tuna in the aquarium at Tokyo sea life park, 7th International Aquarium Congress, Shanghai, pp.130－135.

三村　元・長光貴子・長瀬俊哉・難波憲二，1998：海水中の残留オキシダントの定性分析とヒラメ *Paralichthys olivaceus* 卵への影響．水産増殖，**46**, 579－587.

宮下　盛，2002：クロマグロの種苗生産に関する研究．近大水研報，**8**, 1－172.

Moen T., Torgersen J., Santi N., Davidson W. S., Baranski M., Ødegårds J., Kjøglum S., Velle B., Kent M., Lubieniecki K. P., Isdal E. and Lien S., 2015：Epithelial cadherin determines resistance to infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon. *Genetics,* **200**, 1313－1326.

Mori K., Nakai T., Nagahara M., Muroga K., Mekuchi T. and Kanno T., 1991：A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Fish Pathol.*, **26**, 209－210.

Mori K., Nakai T., Muroga K., Arimoto M., Mushiake K. and Furusawa I., 1992：Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Vilology,* **187**, 368－371.

Mori K., Mushiake K., and Arimoto M., 1998：Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. *Fish Pathol.*, **33**, 443－444.

Mori K., Mangyoku T., Iwamoto T., Arimoto M., Tanaka S. and Nakai T., 2003：Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 19－26.

Mori K., Yamamoto K., Teruya K., Shiozawa S., Yoseda K., Sugaya T., Shirakashi S., Itoh N. and Ogawa K., 2007：Endoparasitic dinoflagellate of the genus Ichthyodinium infecting fertilized eggs and hatched larvae observed in the seed production of leopard coral grouper *Plectropomus leopardus*. *Fish Pathol.*, **42**. 49－57.

森　広一郎・佐藤　純・米加田　徹，2015：ハタ科魚類におけるウイルス疾病の科学，「ハタ科魚類の

水産研究最前線」(征矢野清，照屋和久，中田久編)，恒星社厚生閣，東京，pp.65－80.

Morisawa M., 1985：Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool. Sci.*, **2**, 605－615.

Munday B. L., Langdon J. S., Hyatt A. and Humphrey J. D., 1992：Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Aquaculture*, **103**, 197－211.

Munday B. L. and Nakai T., 1997：Special topic review: nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 375－381.

Munday B. L., Kwang J. and Moody N., 2002：Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, **25**, 127－142.

室賀清邦，1995：海産魚介類の仔稚魚におけるウイルス性および細菌性疾病．魚病研究，**30**, 71－85.

室賀清邦，1998：海産無脊椎動物の種苗生産における疾病．月刊海洋号外 総特集魚類防疫，**14**, 31－36.

室賀清邦・古澤 徹・古澤 巖，1998：総説：シマアジのウイルス性神経壊死症．水産増殖，**46**, 473－480.

Muroga K., 2001：Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries. *Aquaculture*, **202**, 23－44.

Mushiake, K., Arimoto M., Furusawa T., Furusawa I., Nakai T. and Muroga K., 1992：Detection of antibodies against striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) from brood stocks of striped jack. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 2351－2356.

Mushiake K., Nishizawa T., Nakai T., Furusawa I. and Muroga K., 1994：Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.*, **29**, 177－182.

虫明敬一，1994：シマアジおよびブリの親魚養成技術の開発に関する研究．広島大学博士学位論文．

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．*Fish Pathol.*, **33**, 503－509.

虫明敬一・有元 操，2000：「総説」シマアジのウイルス性神経壊死症（VNN）に関する防除対策．栽培技研，**28**, 47－55.

虫明敬一，2000：シマアジ親魚の産卵に伴って増殖するウイルス性神経壊死症（VNN）原因ウイルス（SJNNV）とその抑制対策．水産増殖，**48**, 109－115.

中井敏博・Nguyen H. D.・西澤豊彦・室賀清邦・有元 操・大槻観三，1994：クエおよびトラフグにおけるウイルス性神経壊死症の発生．魚病研究，**29**, 211－212.

中田雅子，1990：種苗期疾病情報事業について．さいばい，**55**, 1－2.

Nguyen H. D., Mekuchi T., Imura K., Nakai T., Nishizawa T. and Muroga K., 1994：Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.*, **60**, 551－554.

Nguyen D., Nakai T. and Muroga K., 1996：Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, **24**, 99－105.

新村 巖・豊田正雄・光塚茂一，1960：マベ *Pteria pengin*（RODING）の増殖に関する基礎的研究 幼生の飼育と後期発生．昭和33年度鹿児島県水試事報（大島分場），10～12ノ10.

日本魚病学会，2015：選定された魚病名 (2015年改訂)．魚病研究，**50**, 218－230.

日本栽培漁業協会，1983：Ⅱ栽培漁業技術の開発（3）ガザミ，「日本栽培漁業協会20年史」（日本栽培漁業協会編），東京，pp.38－39.

日本栽培漁業協会，2003a：Ⅰ協会の組織と体制，「日本栽培漁業協会40年史」（日本栽培漁業協会編），東京，pp.5－17.

日本栽培漁業協会，2003b：Ⅱ栽培漁業技術開発の歩み（3）種苗生産技術開発 9）クルマエビ，「日本栽培漁業協会40年史」（日本栽培漁業協会編），東京，pp.58－59.

Nishi S., Yamashita H., Kawato Y. and Nakai T., 2016：Cell culture isolation of piscine nodavirus (*Betanodavirus*) in fish-rearing seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 2537－2544.

西岡豊弘・古澤 徹・水田洋之介，1997：種苗生産過程の海産魚介類における疾病発生状況（1989～1994年）．水産増殖，**45**, 285－290.

西岡豊弘・森 広一郎・菅谷琢磨・竹内宏行・津崎龍雄・升間主計・岡 雅一・中井敏博，2011：アカアマダイ種苗におけるウイルス性神経壊死症の発

生とその防除対策．水産増殖 , **59**, 275－282.

Nishioka T., Mori K., Sugaya T., Tezuka N., Takebe T., Imaizumi H., Kumon K., Masuma S. and Nakai T., 2010：Involvement of viral nervous necrosis in larval mortality of hatchery-reared Pacific bluefin tuna *Thunnus olientalis*. *Fish Pathol.*, **45**, 69－72.

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

Nishizawa T., Mori K., Furuhashi M., Nakai T., Furusawa I. and Muroga K., 1995：Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *J. Gen. Virol.*, **76**, 1563－1569.

Nishizawa T., Furuhashi M., Nagai T., Nakai T. and Muroga K., 1997： Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1633－1636.

野上欣也 , 1994：成体の確保と採卵 , キジハタ．日本栽培漁業協会事業年報平成 4 年度 , 28－29.

乗田孝雄 , 1999：スペインのクロマグロ蓄養事業．アクアネット , **2**, 22－27.

農林省岡山統計調査事務所 , 1956：昭和 30 年岡山県農林水産統計年報（水産編）. 漁業別魚種別漁獲量（年計）, 37.

農林水産省大臣官房統計部 , 2015a：長期累年統計表一覧 , http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?bid=000001024930&cycode=0

農林水産省大臣官房統計部 , 2015b：平成 25 年漁業・養殖業生産統計 , http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001129478

奥村重信 , 1999：アカアマダイの親魚養成と種苗生産に関する研究．九州大学博士学位論文 .

奥村重信・萱野泰久・草加耕司・津村誠一・丸山敬悟 , 2003：ホタテガイ貝殻を利用した人工魚礁へのキジハタ幼魚の放流実験．日水誌 , **69**, 917－925.

Olveira J. G., Souto S., Dopazo C. P., Tiéry R., Barja J. L. and Bandín I., 2009：Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *J. Gen. Virol.*, **90**, 2940－2951.

Pacific bluefin tuna working group, 2014：Stock Assessment of Bluefin Tuna in the Pacific Ocean in 2014, Report of the Pacific bluefin tuna working group. *International scientific committee for tuna and tuna-like species in Northern Pacific Ocean,* 1－61.

Panzarin V., Fusaro A., Monne I., Cappellozza E., Patarnello P., Bovo G., Capua I., Holmes E. C. and Cattoli G., 2012：Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. *Infect. Genet. Evol.*, **12**, 63－70.

Patel S., Korsnes K., Bergh Ø., Vik-Mo F., Pedersen J. and Nerland A. H., 2007：Nodavirus in farmed Atlantic cod *Gadus morhua* in Norway. *Dis., Aqua., Org.*, **77**, 169－173.

Renault T., Haffner P., Baudin-Laurencin F., Breuil G. and Bonami J. R., 1991：Mass mortalities in hatchery-reared sea bass (*Lates calcarifer*) larvae associated with the presence in the brain and retina of virus-like particles. *Bull., Europ. Associ. Fish Pathol.*, **11**, 68－73.

栽培漁業技術開発推進事業全国協議会 , 1999：防疫的見地からみた放流種苗に関する申し合わせ事項（Ⅰ）, 6－9.

Sakamoto T., Okinaka Y., Mori K., Sugaya T., Nishioka T., Oka M., Yamashita H. and Nakai T., 2008：Phylogenetic analysis of betanodavirus RNA2 identified from wild marine fish in oceanic regions. *Fish Pathol.*, **43**, 19－27.

Sano M., Nakai T. and Fijan N., 2011：Viral diseases and agents of warm water fish, in "Fish Diseases and Disorders: Volume 3" (ed. by Woo P.T. K. and Bruno D. W.), CABI, Oxfordshire, pp.166－244.

Sawada Y., Okada T., Miyashita S., Murata O. and Kumai H., 2005： Completion of the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck et Schlegel) life cycle. *Aquacult. Res.*, **36**, 413－421.

Skliris, G. P., Krondiris J. V., Sideris D. C., Shinn A. P., Starkey W. G. and Richards R. H., 2001：Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia. *Virus Res.*, **75**, 59－67.

Sohn S. G., Park M. A., Lee S. D. and Chun S. K., 1991：Studies on the mass mortality of the cultured grouper, *Ephinephelus septemfasciatus*. *J. Fish. Dis.*, **4**, 87－94.

Song Z. R., Kanai K., Yoshikoshi K., Niiyama H.,

Honda A. and Ura K., 1997：Mass mortalities of hatchery-reared larvae and juveniles of bartail flathead, *Platycephalus indicus* associated with viral nervous necrosis. *Suisanzosyoku*, **45**, 241－246.

Spark A. K., 1985：Synopsis of invertebrate pathology, *Elsevier,* Amsterdam, pp.219－230.

Starkey W. G., Ireland J. H., Muir K. F., Jenkins M. E., Roy W. J., Richards R. H. and Ferguson H. W., 2001：Nodavirus infection in Atlantic cod and Dover sole in the UK. *Vet. Rec.*, **149**, 179－181.

(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，2015：平成25年度栽培漁業・海面養殖用種苗の生産・入手・放流実績（全国）～総括編・動向編～，8－10.

水産庁・(社)日本栽培漁業協会，1986～2003：昭和59年度～平成13年度栽培漁業種苗生産、入手・放流実績（全国），7－11.

水産庁・(独)水産総合研究センター，2004：平成14年度栽培漁業種苗生産、入手・放流実績（全国），7－11.

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，2005～2012：平成15年度～平成22年度栽培漁業種苗生産、入手・放流実績（全国），8－11.

水産庁・(独)水産総合研究センター・㈳全国豊かな海づくり推進協会，2009：平成19年度栽培漁業種苗生産、入手・放流実績（全国）～資料編～，12.

Suzuki M., Nakagawa Y., Harayama S. and Yamamoto S., 2001：Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. Int. *J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1639－1652.

竹内宏行・本藤　靖・渡辺　税・村上直人，2004：アカアマダイの中間育成における適正水温の把握について．栽培漁業センター技報，**2**, 80－82.

Tanaka S., Aoki H. and Nakai T., 1998：Pathogenicity of the nodavirus detected from diseased sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus. Fish Pathol.* **33**, 31－36.

Taniguchi R., Sawabe T. and Tajima K., 2006：Adhesion of *Tenacibaculum* sp. to short-spined sea urchin *Strogylocentroutus intermedius* and control of spotting disease by inhibiting adhesion using carbohydrate. *Fish Pathol.*, **41**, 13－17.

手塚信弘，1998：種苗生産技術の開発．クロマグロ，日本栽培漁業協会事業年報（平成8年度），186－196.

Thiéry R., Raymond J.C. and Castric J., 1999：Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Virus Res.*, **63**, 11－17.

Thiéry R., Cozien J., De Boisseson C., Kerbart-Boscher S. and Nevarez L., 2004：Genomic classification of new betanodabvirus isolated by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggests a low host-fish species specificity. *J. Gen. Virol.*, **85**, 3079－3087.

Thiéry R., Johnson K. L., Nakai T., Schneemann A., Bobami J. R. and lightner D. V., 2012：Family Nodaviridae, in "Virus Taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses" (ed. by King A.M. Q., Adams M.J., Carstens E.B. and Lefkowitz E. J.), Elsevier Academic Press, London, pp.1061－1067.

Toffolo V., Negrisolo E., Maltese C., Bovo G., Belvedere P., Colombo L. and Dalla Valle L., 2007：Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **43**, 298－308.

津村誠一，2001：種苗生産技術の開発，キジハタ．日本栽培漁業協会事業年報平成11年度，159－160.

津村誠一，2002：平成12年度技術開発結果，地域型底層性魚類の種苗生産技術の開発（キジハタ）．日本栽培漁業協会事業年報平成12年度，157－159.

土橋靖史・栗山　功・黒宮香美・柏木正章・吉岡　基，2002：マハタ種苗生産におけるウイルス性神経壊死症（VNN）の防除対策の検討．水産増殖，**50**, 355－361.

Ucko M., Colorni A. and Diamant A., 2004：Nodavirus infections in Israeli mariculture. *J. Fish Dis.*, **27**, 459－469.

Waples R. S. and Deake J., 2004：Risk/benefit considerations for marine stock enhancement: a Pacific salmon perspective, in "Stock Enhancement and Sea Ranching, 2nd edn", (ed. by Leber K. M., Kitada S., Blankenship H.L. and

Svåsand T), Blackwell Publishing, Oxford, pp.260－306.

Watanabe K., Suzuki S., Nishizawa T., Suzuki K., Yoshimizu M. and Ezura Y., 1998：Control strategy for viral nervous necrosis of barfin flounder. *Fish Pathol.*, **33**, 445－446.

渡辺研一・石間正浩・川真田憲治・吉水　守・絵面良男, 1999：マツカワにおけるウイルス性神経壊死症の発生．北大水産彙報, **50**, 101－103.

渡邉研一・井手健太郎・岩崎隆志・佐藤　純・森　広一郎・米加田徹, 2013：ウイルス性神経壊死症の防除を目的とした電解海水によるクエおよびマハタ受精卵の消毒条件の検討．魚病研究, **48**, 5－8.

Yamamoto G., 1955：On rearing of the scallop spats in tank and pool. *Bull. Mar. Biol. St. Asamushi*, **7**, 69－73.

山下貴次, 2000：種苗生産技術の開発, キジハタ．日本栽培漁業協会事業年報平成 10 年度, 178－179.

山下金義, 1963：マダイ養殖の基礎的研究．水産増殖, **11**, 189－206.

八塚　剛, 1963：ガザミの種苗生産についての研究．水産増養殖の種苗生産技術に関する基礎研究, 昭和 38 年度農林漁業試験研究費補助金による研究報告書, 45－47.

吉田義弘, 1994：種苗生産技術の開発, キジハタ．日本栽培漁業協会事業年報平成 4 年度, 145.

Yoshikoshi K. and Inoue K., 1990：Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, **13**, 69－77.

Zafran, Harada T., Koesharyani I., Yuasa K. and Hatai K., 1998： Indonesian hatchery reared seabass larvae (*Lates calcarifer*), associated with viral nervous necrosis (VNN). *Indonesian Fish. Res. J.*, **4**, 19－22.

Zafran, Koesharyani I., Johnny F., Yuasa K., Harada T. and Hatai K., 2000：Viral nervous necrosis in humpback grouper *Cromileptes altivelis* larvae and juveniles in Indonesia. *Fish Pathol.*, **35**, 95－96.

全国豊かな海づくり推進協会, 2013：全国栽培漁業関係施設綜覧, 東京, pp.1－2.

全国豊かな海づくり推進協会・海域栽培漁業推進協議会, 2014：種苗放流による資源造成事業共同種苗生産・放流体制構築支援事業（平成 23 ～ 25 年度）中間報告書, 東京, pp.330－333.

Appendix table 1. Reported occurrence of viral diseases in marine fish and shellfish at hatcheries in Japan (2000 – 2006 fiscal year)

Name of diseases [*1]	Affected species	Year	Size or stage[*2] (mm)	Number of reported cases[*3]	Mortality (%)
Viral Hemorrhagic	Oblong rockfish	2004	TL50～60	1	64
Septicemia	Spotted halibut	2002	TL15～25	1	97
Viral nervous	Japanese flounder	2002～2004, 2005, 2007	TL10～75	10	7～89
necrosis	Kelp grouper	2000～2003, 2005, 2006	TL4～160	10	<1～100
	Sevenbanded grouper	2000～2003, 2006	TL4～150	7	7～100
	Striped jack	2000～2004	TL4～9	6	5～100
	Bluefin tuna	2001～2003, 2005, 2006	TL4～68	5	30～100
	Japanese croaker	2002～2004	TL20～120	3	6～33
	Red tilefish	2003, 2004, 2006	TL45～50	4	<1～4
	Blackspot tuskfish	2005, 2006	TL38～130	3	<1～18
	Redspotted grouper	2001, 2002	TL8～60	2	10～100
	Pacific cod	2001, 2003	TL10～50	2	29～65
	Red seabream	2003, 2007	TL16	2	31～100
	Orange-spotted grouper	2006	TL23～39	1	–
	Spotted parrot fish	2002	TL4～9	1	100
	Flathead	2002	TL12～20	1	95
	Marbled sole	2001	TL20～40	1	42
	Chub mackerel	2006	TL8～9	1	80
	Malabar grouper	2006	FL77	1	–
Viral epidermal	Japanese flounder	2000, 2002, 2006	TL6～25	5	29～100
hyperplasia	Spotted halibut	2002	TL6～8	1	100
	Ridged-eye flounder	2004	TL8～12	1	5
Viral ascites	Yellowtail	2000～2002	TL30～120	4	11～70
Birnaviral disease	Japanese flounder	2000	TL30～45	1	15
Red sea bream	Red seabream	2000～2003, 2005	TL20～130	5	<1～70
iridoviral disease	Malabar grouper	2005	FL38～64	3	–
	Spangled emperor	2006	TL40～45	1	–
Penaeid acute viremia	Kuruma prawn	2001～2003, 2005	P15～90	13	<1～100
	Greasyback shrimp	2001, 2004	P44～63	2	5～100
Amyotrophia	Japanese abalone	2000～2004	SL5～40	13	1～50
	Giant abalone	2004	SL7	1	80
Total				112	

[*1] The diseases name and rank were conformed to the list of standardized names of fish diseases in Japan (revised in 2004) by the Japanese society of Fish pathology.

[*2] TL: Totallength, FL: Forklength, SL: Shelllength, Shelldiameter, E: Egg, N: Nauplius, Z: Zoea, M: Megalops; Mysis, P: Post larva.

[*3] A: Reported numbers of disease were counted as one which occurred in single species, single disease and single facility or organization, B: Reported number of disease in each seed production trials.

[*4] Report number of disease in each seed production trials / Total seed production trials x 100.

[*5] – : Unknown.

Appendix table 2. Reported occurrence of bacterial diseases in marine fish and shellfish at hatcheries in Japan (2000 − 2006 fiscal year)

Name of diseases [*1]	Affected species	Year	Size or stage[*2] (mm)	Number of reported cases[*3]	Mortality (%)
Epitheliocystis like disease	Devil stinger	2006	TL35～50	1	20～30
	Malabar grouper	2006	TL14～15	1	76
	Cobia	2005	TL12～17	1	−
Gliding bacterial disease	Japanese flounder	2001～2005	TL10～100	17	<1～100
	Red seabream	2000～2006	TL20～60	15	3～56
	Marbled sole	2003, 2004, 2006	TL15～80	3	20～30
	Japanese pufferfish	2001, 2002, 04	TL15～31	3	5～80
	Black seabream	2001, 2002	TL20～40	2	5
	Leopard coral grouper	2000, 2001	TL17～295	2	11～74
	Devil stinger	2000	TL10～21	1	9
	Spangled emperor	2005	TL30	1	57～93
Bacterial enteritis	Japanese flounder	2000～2004	TL5～18	17	2～99
	Devil stinger	2002	TL4～6	1	100
Bscterial abdominal swelling	Japanese flounder	2000～2005	TL5～13	22	1～99
	Black seabream	2001, 2002, 2004, 2005	TL4～12	6	15～100
	Red seabream	2003～2005	TL6～20	3	35～100
	Spotted halibut	2001	TL8	1	45
	Goldeye rock fish	2004	TL30	1	80
	Marbled sole	2002	TL7～8	1	50
Pseudomonas infection	Japanese flounder	2001	TL70	1	25
	Marbled rockfish	2005	TL30～40	1	50
Pasteurellosis	Cobia	2004～2006	TL 85～140	3	100
	Spotted parrot fish	2001	TL40～45	1	20～30
Atypical *Aeromonas salimonicida* infection	Marbled sole	2003, 2004	TL 40～56	2	50～100
	Japanese flounder	2004	TL20～30	1	−
Vibriosis	Japanese flounder	2002～2006	TL7～92	8	1～93
	Schlegel's black rockfish	2001, 2002	TL15～44	4	6～60
	Japanese pufferfish	2002	TL10～17	2	50
	Red seabream	2000, 2001	TL4～40	2	42～75
	Goldeye rock fish	2000	TL40～60	1	90
	Oblong Rockfish	2004	TL20～60	1	7
	Black seabream	2002	TL33～35	1	12
	Striped jack	2002	TL12	1	10～15
	Japanese seabass	2002	TL30～55	1	2
	Devil stinger	2002	TL20～25	1	50
	Marbled sole	2005	TL80～90	1	5
	Blackspot tuskfish	2005	TL14～24	1	−
	Spangled emperor	2006	TL40～50	1	−
	Kuruma prawn	2002, 2006	P5～55	2	20～66
	Greasyback shrimp	2001	P6	1	50
	Japanese abalone	2003	SL15～25	1	65
	Giant abalone	2005	SL20～28	1	14～33
"Eshisho"	Giant mud Crab	2001, 2002	Z2～M	3	99～100
	Swimming crab	2005, 2006	Z2～3	2	100
Actinomycosis	Kuruma prawn	2001	TL20	1	15
"Togenukesho"	Red sea urchin	2000, 2001, 2003～2005	SD2～15	5	15～100
	Japanese green sea urchin	2000, 2001	SD2～5	2	60～70
Spotting disease	Collector urchin	2000	SD2～15	1	90
Other bacterial disease	Red seabream	2002	TL5～6	1	50
	Kuruma prawn	2000～2006	Z3～P20	7	1～100
	Green tiger prawn	2002	−	1	90
	Swimming crab	2003	Z4～M	1	75
Total				162	

[*1] The diseases name and rank were conformed to the list of standardized names of fish diseases in Japan (revised in 2004) by the Japanese society of Fish pathology.

[*2] TL: Total length, FL: Fork length, SL: Shell length, Shell diameter, E: Egg, N: Nauplius, Z: Zoea, M: Megalops; Mysis, P: Post larva.

[*3] A: Reported numbers of disease were counted as one which occurred in single species, single disease and single facility or organization, B: Reported number of disease in each seed production trials.

[*4] Report number of disease in each seed production trials / Total seed production trials x 100.

[*5] − : Unknown.

Appendix table 3. Reported occurrence of parasitic diseases and fingal diseases and other diseases in marine fish and shellfish at hatcheries in Japan (2000 − 2006 fiscal year)

Name of diseases *1	Affected species	Year	Size or stage*2 (mm)	Number of reported cases*3	Mortality (%)
Ochroconis infection	Red seabream	2004	TL30	1	10
	Striped jack	2004	TL60～100	1	20
Sprolegniasis	Red seabream	2004	TL22～66	1	56
	Devil stinger	2004	TL20～25	1	20～30
Oomycetes infection	Devil stinger	2001, 2002	TL11～44	2	7～14
	Kuruma prawn	2000～2006	N2～P21	18	1～100
	Greasyback shrimp	2000, 2001, 2003	N2～P7	5	1～100
	Swimming crab	2000～2005	Z1～4	9	50～100
	Giant mud Crab	2001, 2002	Z1～3	2	52～100
Ichthyobodosis	Japanese flounder	2001, 2002, 2004	TL15～70	4	24～95
	Schlegel's black rockfish	2002	−	1	12
	Willowy flounder	2000	TL20～30	1	32
	Dark banded rockfish	2000	TL10～19	1	80
	Oblong Rockfish	2007	TL17～22	1	2～100
	Goldeye rock fish	2004	TL10～20	1	30
Oodiniosis	Japanese pufferfish	2002, 2004	TL63～102	2	15
	Devil stinger	2003	TL30～40	1	1
Parasitic turbellarianosis	Devil stinger	2000, 2006	TL50～70	2	Several～100
Cryptobia infection	Marbled rockfish	2000, 2006	TL9～12	2	4～50
Scuticociliatidosis	Japanese flounder	2000～2002, 2004～2006	TL25～100	12	<1～75
	Red seabream	2002, 2004	TL30～50	3	10～50
	Devil stinger	2004	TL13～15	1	100
	Ridged-eye flounder	2004	TL8～30	1	Several～100
	Schlegel's black rockfish	2001	TL10～15	1	30
	Oblong Rockfish	2004	TL20～40	1	5～10
Trichodinosis	Pacific cod	2005	TL110～160	1	14
Neobenedeniosis	Greater amberjack	2002	TL97～123	1	10
	Redspotted grouper	2000	TL70～90	1	25
White spot disease	Redspotted grouper	2000, 2006	TL25～50	2	70～100
	Devil stinger	2000	TL9～14	1	30
	Red seabream	2000	TL12～20	1	5
	Cobia	2004	TL30～50	1	100
	Japanese pufferfish	2004	TL15～40	1	10
Bivaginosis	Red seabream	2002, 2003	TL80～120	3	5～50
Broklynella infection	Schlegel's black rockfish	2001, 2002	TL13～16	2	6～12
Flagellate disease	Leopard coralgrouper	2001	E～TL3	1	10～50
Parasitic vorticella	Greasyback shrimp	2002	−	1	50
	Green tiger prawn	2002	−	1	96
Other parasite	Japanese flounder	2005	TL50	1	60
infection	Schlegel's black rockfish	2002	−	1	21
	Devil stinger	2002	−	1	20
"Licmophora infection"	Swimming crab	2000	Z3～4	1	50
Unknown diseases	21 species			74	
Subtotal				170	
Total*6				444	

*1 The diseases name and rank were conformed to the list of standardized names of fish diseases in Japan (revised in 2004) by the Japanese society of Fish pathology.

*2 TL: Total length, FL: Fork length, SL: Shell length, Shell diameter, E: Egg, N: Nauplius, Z: Zoea, M: Megalops; Mysis, P: Post larva.

*3 A: Reported numbers of disease were counted as one which occurred in single species, single disease and single facility or organization, B: Reported number of disease in each seed production trials.

*4 Report number of disease in each seed production trials / Total seed production trials x 100.

*5 −: Unknown.

*6 Total number of all reported cases.

Appendix table 4. Reported occurrence of diseases in marine fish and shellfish at hatcheries in Japan (2007 − 2009 fiscal year)

Cause Number of reported cases (%)	Name of diseases *1	Affected species	Year	Size or stages*2	Number of reported cases*3	Mortality (%)
Viruses 11(33)	Viral nervous necrosis	Redspotted grouper, Malabar grouper, Orange-spotted grouper, Kelp grouper, Blackspot tuskfish, Bluefin tuna, Japanese flounder	2007～2009	L, J	43	<1～100
	Viral epidermal hyperplasia	Japanese flounder	2007	L	1	80～97
	Aquareovirus infection disease	Marbled sole	2007～2009	J	12	1～70
	Amyotrophia	Giant abalone, Japanese abalone	2008	J	2	65～99
Bacteria 14 (39)	Gliding bacterial disease	Leopard coralgrouper, Malabar grouper, Japanese flounder	2007, 2008	J	4	1, 20
	Vibriosis	Malabar grouper, Tiger puffer, Kuruma prawn	2007, 2008	J	1	20, 45
	Bscterial abdominal swelling	Red seabream, Japanese flounder	2008, 2009	L	2	40～90
	Bacterial enteritis	Japanese flounder	2009	L	1	50
	Epitheliocystis like disease	Sevenbanded grouper	2008	L	1	100
	Mycosis	Redspotted grouper	2008	L	1	60～70
	"Eshisyo" *4	Giant mud Crab, Swimming crab	2009	L	1	54～100
Parasites 3(8)	Francisella like infection disease	Japanese ivory shell	2009	J	7	5～60
	Scuticociliatidosis	Japanese flounder	2007, 2009	L, J	2	10～30
	Microcotyle infection	Marbled rockfish	2009	J	1	1
	Other parasite infection	Schlegel's black rockfish	2009	L, J	1	50
Others 7(19)	Unknown diseases	Red seabream, Japanese flounder, Chicken grunt, Spotted halibut, Kuruma prawn, Swimming crab, Japanese abalone	2007～2009	L, J	4	2, 80～100
Total					84	

*1 The diseases name and rank were conformed to the list of standardized names of fish diseases in Japan (revised in 2015) by the Japanese society of Fish pathology.

*2 F: larval stage, J: Juvenile stage.

*3 Reported numbers of disease were counted as one which occurred in single species, single disease and single facility or organization.

*4 The disease includes complications.

" " : Tentative nama.

要　約

日本の水産業における漁獲量は1984年の1,261万トンをピークに減少し，2013年では470万トンになった。このような漁獲量の減少を踏まえ，我が国では水産資源の持続的利用を施策とし，水産資源の維持培養を図る栽培漁業が実施されている。栽培漁業では放流用の種苗を確保するために，海産魚介類の仔稚を飼育する種苗生産が実施されており，生産された種苗は養殖業へも提供されている。しかし，この種苗生産過程では仔稚が大量死亡する事例が頻繁に認められ，中でも疾病の発生は種苗の安定生産に大きな支障となっている。

本研究では，種苗生産過程で発生する疾病のうち，最も被害が大きいベータノダウイルスを原因とするウイルス性神経壊死症（viral nervous necrosis：VNN）を取りあげ，栽培漁業や養殖業の新規対象魚種として注目されているキジハタ，アカアマダイ，クロマグロについて本疾病の防除法を検討した。加えて餌料として使用される天然魚のウイルス感染源としての重要性を論議した。

第1章では研究の背景となる栽培漁業と養殖業について詳述し，それらの種苗生産において多発する疾病が種苗の安定供給に支障を来していることを示した。特に，魚類ではVNNの発生が大きな問題であることを指摘し，本病についての既報の知見を整理した。

第2章では種苗生産過程で問題となっている疾病について把握するために，まず，1984年から2009年までの「栽培漁業種苗生産，入手・放流実績（全国）」資料を基に，種苗生産対象種について調査した。この間，2000年以降に総種苗生産数は減少したが，魚類16種，甲殻類8種，介類18種で100万個体以上の種苗が生産され対象種の種類数に大きな変化はなかった。次に，種苗期疾病情報事業および種苗期疾病連絡協議会での報告資料を基に，疾病や大量死亡の発生状況について2000～2009年度の内容を取りまとめた結果，ウイルス病が26%，細菌病が37%，真菌病が8%，寄生虫病が12%，不明が17%であった。不明を除く各原因別の発生状況を1989～1999年度の発生状況と比べると，ウイルス病と真菌病がやや減少した一方で，新たな魚種での発生が報告された細菌病と寄生虫病が増加した。複数年で報告された疾病は，VNN，マダイイリドウイルス病（RSIVD），筋萎縮症，滑走細菌症，棘抜け症（仮称），細菌性腹部膨満症，ビブリオ病，細菌性腸管白濁症，スクーチカ症，甲殻類の真菌症があり，疾病の種類も2000年以前と大きな変化はなかった。しかし，VNNでは1989～2009年度までに，5目21魚種で発生があり，キジハタ，クエ，シマアジ，ヒラメでは10年以上の期間で発生が継続していたことから，種苗の安定生産を妨げる最も重要な疾病であると位置付けた。

第3章では移動範囲が限定的であることから栽培漁業の対象種として重要なキジハタを対象としVNN防除対策を検討した。本種ではVNNの発生が11年間にわたって報告されている（第2章）。防除対策としてヨード剤による受精卵消毒や用水の紫外線処理により仔魚期のVNNの発生は少なくなったが，放流までの育成期間中にVNNが発生し，親魚生殖腺からウイルスが検出されないため，その感染経路は解明されていない。

本研究において，VNNに感染耐過したキジハタ稚魚からは3年後もPCRによりベータノダウイルス（RGNNV）遺伝子が検出されることから，これらの耐過魚は不顕性感染の状態にあることが明らかとなった。また，日本近海4海域で採取した132個体の天然キジハタを検査した結果，RT-PCRで4.5%，nested PCRで33.3%の魚がRGNNV陽性となり，親魚候補となる天然キジハタのウイルス感染を確認した。分離した天然キジハタ由来RGNNVをキジハタ稚魚に対して注射感染させたところ，それらはキジハタ病魚由来ウイルスと同等の病原性を示した。これらの結果から，キジハタのVNNは不顕性感染した親魚からの垂直伝播によって起こると考えられた。これらの天然キジハタの組織別の検査では，網膜と脳からの検出率は31.1%であったが，生殖腺は0%であったことから，親魚選別を行うための検査組織として生殖腺は適当でないと考えられた。瀬戸内海の4ヵ所で漁獲された天然キジハタのnested PCRによるウイルス検出率は5.6%～72.9%と漁獲海域により差が認められた。以上の結果から，防除対策として，感染率が低い海域から親魚を搬入し，養成期間が短い親魚群から受精卵を得て卵消毒には電解海水を用いることを提案した。合わせて親魚に与えるストレスを低減する産卵誘発法の開発の必要性を示した。

第4章では沿岸漁業の重要な水産資源で商品価値が高いアカアマダイを対象としVNN防除対策を検討した。2004年冬季に種苗生産した稚魚が，水面付近や水底で回転遊泳する異常行動を示して死亡する個体が認められた。病魚の脳に空胞が認められ，PCR法でRGNNV遺伝子型のウイルス，また抗ベータノダウイルス血清を用いた蛍光抗体法でベータノダウイルス抗原が検出されたことから，VNNによる死亡であると判断した。疫学調査において，親魚として用いる天然アカアマダイがPCR陽性となり，一部の個体からウ

イルスが分離されたことから，VNN の発生は垂直伝播によると推定した。自然感染したアカアマダイ稚魚を異なる 2 水温で飼育した結果，死亡率と PCR 検出率は 14℃飼育が 6.1％と 35％であったのに対し，21℃飼育では 60％と 85％と高かった。また，分離したウイルスをマハタ稚魚に注射感染したところ，マハタ病魚由来ウイルスと同等の死亡率を示し，天然アカアマダイ由来ウイルスの病原性が確認された。防除対策として nested PCR 陰性の親魚を用い，受精卵を電解海水で消毒し，かつ電解処理海水を用いて飼育することが有効であることを明らかにした。また，人工卵巣腔液で未受精卵を洗浄し nested PCR 陰性の雄精子で人工授精することにより，VNN の発生を大幅に低減できることを示した。

第 5 章では養殖種として世界的に注目されているクロマグロを対象とし VNN 防除対策を検討した。本種では種苗生産技術が未だ確立されていないため，仔稚魚期の減耗が大きい。大量死亡事例について検討した結果，死亡魚（稚魚）に VNN に特徴的な脳や網膜の空胞変性が認められ，抗ベータノダウイルス血清を用いた蛍光抗体法により病変部に特異蛍光が確認された。E-11 細胞により，死亡魚 1 個体当たり $10^{5.3}$ $TCID_{50}$/g ～ $10^{9.6}$ $TCID_{50}$/g のウイルスが分離され，RGNNV 遺伝子型のウイルスが PCR 法により検出されたことから，VNN が大量死亡の一要因であると推定した。PCR 法を用いた疫学調査では，天然幼魚や養成親魚，受精卵およびふ化仔魚からベータノダウイルスが検出されたことから，VNN は親魚からの垂直伝播によると結論づけた。本種の養成親魚は巨大で人為的な取り扱いが不可能なため，既報の防除対策である PCR 検査による親魚の選別ができない。そこで，受精卵消毒の有無や使用薬剤および用水の処理方法について検討した結果，電解海水で卵消毒し電解処理海水で卵管理や仔魚飼育を行うと，VNN 発生数は低下して稚魚の生産数が増加した。これらの方法はクロマグロの VNN 防除法として有効であると考えられた。今後は，親魚からのウイルス伝播を低減するため，産卵制御技術を開発する必要がある。

第 6 章では既報の VNN 防除対策を実施したシマアジ種苗生産において，ベータノダウイルス（SJNNV）による VNN が発生したことから，感染源を推定するために，種苗生産に使用した親魚ならびに生産に使用された餌料生物について PCR 検査による疫学調査を行った。その結果，養成親魚の餌料用に冷凍保管していた天然マアジの 55％からウイルスが検出され（RT-PCR），シマアジ病仔魚から検出されたものと RNA2 の塩基配列（T4 領域）が一致した。このことから，天然マアジがシマアジ仔魚のウイルス感染源であると推定した。そこで，既報の防除対策に加え，天然魚を養成親魚の餌料として使用せずに種苗生産を行ったところ，VNN は発生せず稚魚を生産することができた。また，日本沿岸の天然マアジを PCR 検査した結果，SJNNV が検出された（nested PCR 陽性率：20％）。さらに，天然マアジから分離したウイルスをマアジ仔魚およびシマアジ仔魚に浸漬感染させた結果，シマアジ病魚由来 SJNNV と同等の強い病原性を示す株が確認された。日本とヨーロッパの病魚および天然マアジ由来の SJNNV についてそれらの RNA2 T4 領域の塩基配列を比較した結果，強い病原性を示す株は，病魚由来株の配列に近いクラスターに分類された。以上のことから，従来の対策に加えて，餌料用魚を介した感染にも注意をはらう必要がある。

第 7 章では第 1 章から第 6 章において得られた主要な知見に基づき，種苗期の VNN 防除法について総合的に考察した。