

シマアジのウイルス性神経壊死症（VNN）に関する 防除対策

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2025-04-24
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 虫明, 敬一, 有元, 操
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014507

This work is licensed under a Creative Commons
Attribution 4.0 International License.



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

虫 明 敬 一*・有 元 操*

Control of Viral Nervous Necrosis (VNN) of
Striped Jack in Hatcheries

Keiichi MUSHIAKE, and Misao ARIMOTO

2000年6月2日受理

シマアジ *Pseudocaranx dentex* は、わが国の本州中部以南から小笠原にかけて主に黒潮流域の太平洋沿岸に多く分布する回遊魚である。アジ科魚類の中でも最も美味とされ、その市場価値も極めて高いことから、養殖業および栽培漁業の対象種として重要視されている魚種である。

日本栽培漁業協会（以下日裁協）では1978年に古満目事業場（高知県）においてシマアジの親魚養成技術開発に着手し、親魚の適正飼育管理法や産卵誘発方法を検討することにより、養成親魚から長期間にわたる安定した大量採卵技術の開発に成功した^{1,2)}。これらの成果を受けて、五島事業場（長崎県）と上浦事業場（大分県）において人工種苗生産の回数の増加や仔魚の飼育技術の向上と相まって1988年には沖出しサイズ（全長22.5～31.1 mm）の稚魚を約83万尾生産することに成功した。しかし、その一方で1984年頃から原因不明の大量死が発生するようになり、1989年および1990年には日裁協のシマアジ種苗生産は不調に終わった³⁾。特に1990年には仔魚の飼育密度や水温、塩分および照度など飼育環境条件について検討を行い、日裁協上浦および五島の両事業場で合計51例の種苗生産試験を行ったが、すべての飼育事例で仔魚期に原因不明の大量死が発生し、種苗生産は全くできなかった³⁻⁵⁾。

1990年に大量に死亡した仔魚の一部を長崎大学水産学部吉越一馬教授の協力を得て病理組織学的および電子

顕微鏡観察に供した結果、仔魚の脳の中樞神経組織（神経冠）や網膜に空胞の形成が認められ、その周囲の神経細胞中におびただしい数のウイルス粒子が確認され、インダイで報告されているウイルス性神経壊死症 (viral nervous necrosis: VNN)⁶⁾ に極めて類似した疾病に冒されていることが判明した⁷⁾。なお、諸外国では本病は脳脊髄炎 (encephalomyelitis)⁸⁾ あるいは脳・網膜症 (encephalopathy and retinopathy)⁹⁾ と呼ばれており、現在国際的にはウイルス性脳・網膜症およびウイルス性神経壊死症の両方の病名が使用されている¹⁰⁾。仔稚魚期に同様の症状を呈し VNN による死亡事例は、海外での事例も含めてこれまでに5目11科22種で報告されている¹¹⁾。

日裁協では1990年のシマアジ種苗生産で VNN の発生により多大な被害を受けたことから³⁾、早急な VNN 防除対策の確立が必要となった。そこで、シマアジにおける本病の防除を図ることを目的に、京都大学および広島大学との共同研究が開始された。まず、ウイルスに感染したシマアジ仔魚を材料として分画遠心法などによりウイルスの純化に成功し、ウイルスの核酸および外被タンパクなどの生化学的性状を検査した結果、VNN 原因ウイルスはノダウイルス科に属するウイルスであることが判明し、striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) と名付けられた⁷⁾。また、感染実験によりコッホの4原則が満たされることから、SJNNV がシマアジ VNN 原因ウイルスであることも確定した¹²⁾。さらに、純化ウイル

* 日本栽培漁業協会上浦事業場 〒879-2602 大分県南海部郡上浦町津井浦 (Kamiura Station of Japan Sea-Farming Association, Kamiura, Minamiamabe, Oita 879-2602, Japan).

スに対するウサギ抗血清を作製し、SJNNV の検出系として間接 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) が確立されるとともに¹³⁾、親魚の血漿中の SJNNV に対する抗体検出のための間接 ELISA も確立された¹⁴⁾。その後、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) 法を用いた SJNNV の遺伝子レベルでの検出系が確立された¹⁵⁾。

日裁協では、これらの手法を用いて種苗生産現場におけるシマアジの VNN 防除対策を講じた結果、過去 5 年間 (平成 8 年～12 年) 本種の種苗生産において VNN は全く発生していない。これらの研究については既に総説としてまとめられているが¹¹⁾、本稿ではこれらの共同研究成果に基づいて確立されたシマアジの VNN 防除対策について主に述べる。

1. 原因ウイルスと診断方法

本病の原因ウイルス (SJNNV) は、当初電子顕微鏡観察によりその大きさが 30 nm 前後で、核酸が RNA であることから、諸外国の研究者によりピコルナウイルス科に分類されるのではないかと考えられた^{8, 9, 16-18)}。しかし、シマアジ病魚から精製したウイルス粒子を用いてウイルス学的な検討を行った結果、原因ウイルス SJNNV は大きさ約 25 nm の正 20 面体でエンベロップを持たず (図 1)、核酸は 3' 末端にポリ A 構造を持たないプラス

センスの 2 分節 1 本鎖 RNA からなり、ノダウイルス科に分類された⁷⁾。その後、本病に罹ったパラマンディー (タヒチ) とシーバス (フランス) から得られたウイルスについても同様の検討が行われ、原因ウイルスは SJNNV とほぼ同じ性状でノダウイルス科に分類されることが明らかにされた¹⁹⁾。従来、ノダウイルス科には昆虫由来のウイルスのみが含まれていたが、この発見により本科に魚類病原ノダウイルス (SJNNV) が含まれるよ

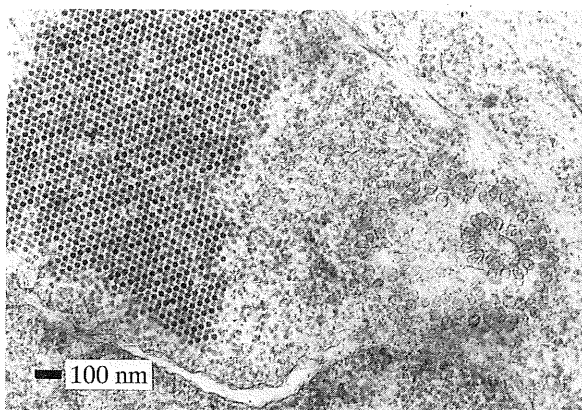


図 1. シマアジ仔魚の網膜に感染した SJNNV* の電子顕微鏡写真

*SJNNV (striped jack nervous necrosis virus) は、大きさ約 25 nm の正 20 面体でエンベロップを持たず、分類学的にはノダウイルス科に属する。

表 1. VNN 原因ウイルスのタイプ

(NISHIZAWA *et al.*²⁰⁾ を改変)

ウイルスのタイプ	VNN 発生		
	魚 種 名	学 名	場 所
トラフグ株 (TPNNV)	トラフグ	<i>Takifugu rubripes</i>	香 川 県
	ヒ ラ メ	<i>Paralichthys olivaceus</i>	北 海 道
シマアジ株 (SJNNV)	シマアジ	<i>Pseudocaranx dentex</i>	長 崎 県
	マ ダ イ	<i>Pagrus major</i>	広 島 県
	ヒ ラ メ	<i>P. olivaceus</i>	高 知 県
マツカワ株 (BFNNV)	マ ツ カ ワ	<i>Verasper moseri</i>	北 海 道
	マ ダ ラ	<i>Gadus macrocephalus</i>	北 海 道
	〃	〃	富 山 県
	ヒ ラ メ	<i>P. olivaceus</i>	岩 手 県
キジハタ株 (RGNNV)	ハリバット	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	ノルウェー
	キ ジ ハ タ	<i>Epinephelus akaara</i>	徳 島 県
	ヒ ラ メ	<i>P. olivaceus</i>	広 島 県
	〃	〃	和 歌 山 県
	〃	〃	徳 島 県
	〃	〃	大 分 県
	〃	〃	佐 賀 県
	マ ハ タ	<i>E. septemfasciatus</i>	愛 媛 県
	〃	〃	大 分 県
	ス ズ キ	<i>Lateolabrax japonicus</i>	静 岡 県
	ク エ	<i>E. moara</i>	大 分 県
	〃	〃	長 崎 県
	コ チ	<i>Platycephalus indicus</i>	大 分 県
チャイロマルハタ	〃	<i>E. malabaricus</i>	タ イ
	シーバス	<i>Dicentrarchus labrax</i>	イ タ リ ア

うになった。その後、外国由来のウイルス株も含めた VNN 原因ウイルスについて比較した結果、トラフグ株 (TPNNV)、シマアジ株 (SJNNV)、マツカワ株 (BFNNV) およびキジハタ株 (RGNNV) の4グループに細分されることが判明している²⁰⁾。今のところ、BFNNV は飼育水温が比較的低い魚種で報告されているのに対し、RGNNV は比較的高い水温で飼育されている魚種で多く報告されている (表 1)。また最近、ストライプドスネークヘッド由来のノダウイルスが分離可能な SSN-1 細胞²¹⁾を用いて詳細にウイルス分離株を比較した結果、RGNNV、SJNNV および TPNNV は 20 および 25℃ のいずれでも増殖するが、BFNNV は 20℃ でしか増殖しないことが明らかにされている²²⁾。

SJNNV に感染したふ化仔魚は、摂餌不良となり目が青色に輝き浮上して死亡することが病徴として報告されている³⁾。一方、親魚の場合には SJNNV に感染していても VNN が直接の原因となって死亡することはもちろん、病徴さえも全く観察されず外観上は健康そのものである。しかし、次の項で述べるように、シマアジにおいては産卵親魚が本病の感染源となっていることから、採卵を行うに当たっては親魚の選別が必要となる。表 2 に VNN の診断法を示したが、親魚の選別を行うに当たっては、親魚を生かしたまま検査する必要があること、微量のサンプルで検査可能なこと、および不顕性感染している微量のウイルスを高感度で検出可能なことが必要条件である。現段階では親魚からの SJNNV を検出するのに一般的には PCR 法が用いられている。しかし、VNN 罹病魚の診断に PCR 法のみを用いるのは危険がある。なぜなら、本法は感度が高いために魚体内にたまたま少量存在したにすぎない病原性が低下あるいは不活化したウイルスをも検出し得るため、本来の死亡原因を見誤る可能性が高いからである。そのため、やはり病理組織学的な病徴の確認や原因ウイルスの増殖を確認する必要がある。また、遺伝子検出による診断を行う場合には、病変部位の存在場所とその部位におけるウイルス遺伝子発現量の増殖の確認が可能な *in situ* ハイブリダイゼーション²³⁾の方が PCR 法よりもむしろ診断には適していると言える。前述した SSN-1 細胞を用いた分離・培養法と蛍光抗体法を組み合わせた方法は、検出感度と得られた結果の信頼性が高いことから、優れた診断法となり得

ることが明らかにされている²²⁾。

2. 感染経路

一般にウイルス病の伝播様式には垂直伝播と水平伝播とがあるが、シマアジの VNN においてもその両方が関与している。われわれが行った実験では、産卵直前の親魚の卵巣サンプルから間接 ELISA によりウイルス抗原が検出され¹³⁾、親魚の血漿中から抗 SJNNV 抗体 (以下単に抗体と記す) が検出される¹⁴⁾。また、親魚の卵巣および精巣サンプルからの PCR 法によるウイルスの検出結果とそれらの親魚から得られた仔魚におけるウイルス感染との間に相関性が認められることから²⁴⁾、原因ウイルス SJNNV が親魚から受精卵を経て仔魚に垂直伝播するものと判断された。さらに、PCR 陽性および陰性と判定された親魚について、蛍光抗体法および PCR 法を用いて各組織における SJNNV の存在を調べた結果、PCR 陽性魚の生殖腺、腸管、胃、腎臓および肝臓に SJNNV が存在することが報告されている²⁵⁾。したがって、種苗生産過程においては産卵期間中の親魚の腸管および生殖腺に存在する SJNNV が本病の最初の感染源になるものと判断された (図 2)。

垂直伝播もしくは水平伝播によりウイルスに感染した仔魚の体内では、SJNNV が急速に増殖してその個体を死亡させる。その結果、死亡個体からおびただしい数のウイルス粒子が飼育水中に放出され、健康な仔魚への新たな感染が繰り返されるため、仔魚の一部にひとたび VNN が発生すると、瞬く間に同一水槽中の仔魚に伝染して大量の死亡が発生する。シマアジの場合には仔魚期で全滅に至る事例が大半であるが、稀に生残する個体が出現する事例もある。このような生残個体は今のところ日齢 130 以降には PCR 法ではウイルスが検出されなくなることが確認されている²⁶⁾。このような感染耐過魚は、その後 VNN により死亡することもなく、ウイルスを保有しない健康魚と何ら遜色もなく成長することが判明している。

3. 垂直伝播の防除対策

1) 親魚の選別

上述したように産卵親魚が本種の VNN の感染源になっていると判断されたため、産卵直前の親魚を検査して選別し、ウイルスを保有していない親魚から得られた卵やふ化仔魚のみを種苗生産に供することが、本病の防除対策になり得ると考えられた。しかし、産卵直前の親魚から例え微量とはいえ生殖腺の一部をサンプリングするのは、その後の産卵行動等に悪影響を及ぼすと考えられた。

そこで、産卵に悪影響を及ぼさず親魚を生かしたまま検査可能な手法として、親魚の血漿中における SJNNV

表 2. VNN の診断方法

診断方法	参考文献
病理組織学的手法	YOSHIKOSHI and INOUE ⁶⁾
蛍光抗体法	NGUYEN <i>et al.</i> ²³⁾
免疫病理組織学的手法	OIE ¹⁰⁾
酵素結合抗体法	ARIMOTO <i>et al.</i> ¹³⁾
電子顕微鏡観察	MORI <i>et al.</i> ⁷⁾
分離・培養法	IWAMOTO <i>et al.</i> ²²⁾
ポリメラーゼ連鎖反応	NISHIZAWA <i>et al.</i> ¹⁵⁾
<i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	COMPS <i>et al.</i> ²¹⁾

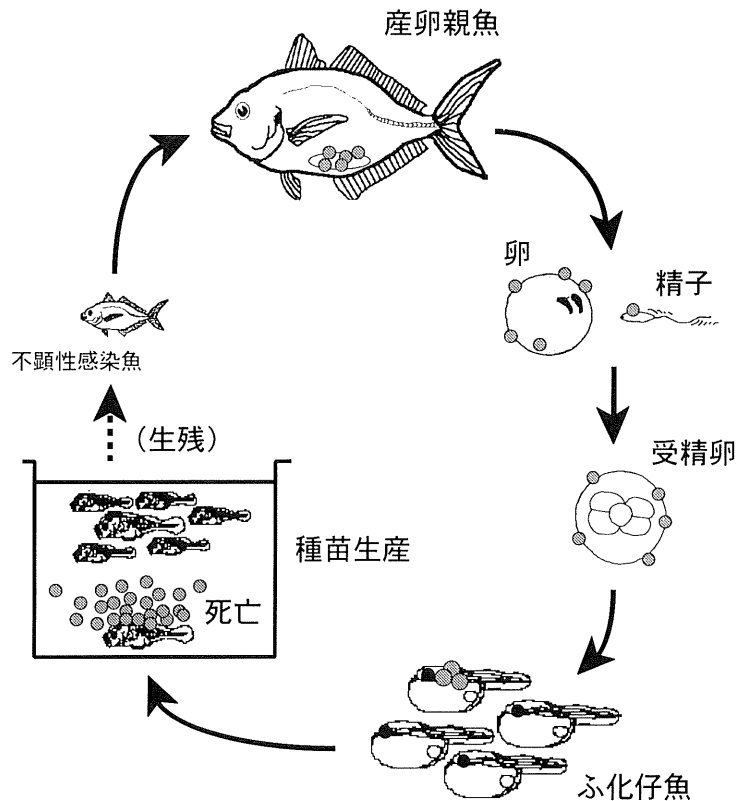


図 2. SJNNV 感染環
図中の ● は SJNNV を示す。

に対する抗体の有無を調べ、その結果に基づいて親魚を選別することをまず考えた。

(1) 間接 ELISA を用いた抗体検出に基づく親魚選別

原因ウイルス SJNNV に対するウサギ抗体¹³⁾を用いて、間接 ELISA によりシマアジ親魚からの抗体の検出¹⁴⁾を行い、親魚を抗体陰性と陽性に選別した。そして、抗体陰性および陽性の各親魚群をそれぞれ連続的に産卵させ、得られた卵あるいはふ化仔魚を用いて飼育試験を行った結果、抗体陰性あるいは陽性のいずれの親魚群から得られた仔魚においても VNN が発生した。しかし、断続的に産卵させた事例では VNN は発生しなかった²⁷⁾。また、親魚における血漿中の抗体の存在と生殖腺における SJNNV の存在とは必ずしも一致しないことが報告されている¹⁴⁾。元々、抗体検査の結果は必ずしもその時点における SJNNV の存在を示すとは限らないので当然の結果ともいえる。したがって、やはり直接ウイルスを検出する必要があると考えられた。しかし、間接 ELISA では微量のウイルスを検出することは困難である。シマアジの VNN 防除では、種苗生産現場に持ち込まれるウイルスのポテンシャルを下げるという観点から、親魚の検査では不顕性感染している微量のウイルス検出が重要な意味を持つ。そのため、次のステップとして PCR 法などのより感度の高い検出方法を導入する必要があると考えられた。現在シマアジにおける抗体検査は、親魚選別における PCR 検査の補助的手段として、

抗体価の上昇あるいは下降から宿主におけるウイルスの増減を推察することを目的に成熟期から産卵直前にかけて 2~3 回行う、あるいは親魚候補群（未成魚あるいは成魚）を新規に搬入する際のウイルス感染歴の有無を把握する手段として用いられている。しかし、マツカワにおいては VNN 防除対策のかなり有力な親魚の選別手段となることが報告されている^{28, 29)}。

(2) PCR 法を用いたウイルス検出に基づく親魚選別

NISHIZAWA *et al.*¹⁵⁾ により、SJNNV の外被タンパク遺伝子 (RNA2) のシーケンス解析結果を基に PCR 法による RNA2 遺伝子の一部を増幅してウイルスを検出する方法が開発された。MUSHIAKE *et al.*²⁴⁾ はこの PCR 法を用いてシマアジ親魚の生殖腺から SJNNV 遺伝子 (T4 領域¹⁵⁾) を検出し、その結果に基づいて選別された PCR 陰性親魚群を産卵させて得られた仔魚の飼育過程における VNN 発生の有無について検討している。その結果、SJNNV 陰性親魚群からの仔魚には VNN は発生しなかったが、陽性魚を含む親魚群の仔魚では VNN が発生した。その後、この親魚群から SJNNV 陽性魚を除去して産卵させて得られた仔魚においては VNN は発生しなかったことを報告している。これらの結果から、PCR 法による親魚の判定結果とそれらの親魚から得られた仔魚における VNN 発生との間には高い相関関係があり、シマアジの VNN 防除における本方法の有効性が示されている²⁴⁾。しかし、PCR 陰性と判定された親魚において

も、後述するように多回産卵により PCR 陽性に転じる個体があることから、検出限界以下の微量の SJNNV が不顕性感染している可能性は残されている。NISHIZAWA *et al.*³⁰⁾ は小型水槽 (0.5 m³) 14 面を用いた飼育実験を行い、本種の VNN 防除における PCR 法を用いた親魚選別の有効性を再確認しているが、まれに PCR 陰性の親魚から得られた仔魚の一部 (使用した水槽による) に、確率は低いものの VNN が発生した事例があったことを報告している。そのため、ふ化仔魚をできるだけ小分けして飼育することが VNN の発生を最小限に食い止めるための危険分散になると考えられている¹¹⁾。

ここで、実際のシマアジ親魚からの生殖腺のサンプリング方法について述べる。親魚には個体識別が可能なように背部筋肉内に予め Pit tag (Identification Devices Inc.) を埋め込んでおく。そして、エチレングリコール・モノフェニルエーテル (400 mg/l) を含む淡水中で親魚が横たわり鰓蓋運動が不活発になるまで麻酔する。麻酔の時間は水温により異なるが、おおむね 5~7 分程度を要する。また、淡水を使用するのは、養成期間中に親魚体側面に寄生する寄生性カイアシ類 *Caligus longipedis*³¹⁾ のカリムス期幼生の駆除も兼ねて行うためである。麻酔した親魚を取り上げた後、予め煮沸滅菌したカニューレを個体別に親魚の生殖孔に挿入し、生殖腺 (精巣あるいは卵巣) の一部 (約 0.1 g) を採取する。採取したサンプルは滅菌マイクロチューブに個体別に入れて保管し、PCR 検査を行うまで冷凍保存 (-80℃) する。PCR 検査用の生殖腺のサンプリングは、一シーズン中に産卵直前、産卵盛期および産卵後期に行い、PCR 検査の結果、陽性に転じた個体が出現した場合にはその時点で陽性個体を親魚群から除去する。また、生殖腺のサンプリングをこのような頻度で行っても、シマアジの最終成熟および産卵には悪影響がないことが判明している²⁴⁾。

上述したように、シマアジの親魚選別のためのウイルス検査にはこの PCR 法が有効であるが、近年種苗生産過程で VNN が発生して問題となっているヒラメやクエなどのハタ科魚類においては、PCR 法により親魚の生殖腺から必ずしも効率良く VNN 原因ウイルスの遺伝子が検出されないケースがある。これは、生殖腺サンプルからの核酸抽出操作あるいは PCR 法に用いるプライマーの不適合などの方法論上の問題なのか、あるいはこれらの魚種においては実際には垂直感染がさほど重要な感染経路ではないのか、現段階では不明である。

2) 親魚の適正飼育管理

種苗の量産を前提として親魚からの採卵を行う場合には、一度に 100 万粒程度のまとまった量の卵を得る必要がある。そのために、従来シマアジでは卵巣卵が第三次卵黄球期に達した親魚群に対して、産卵を誘発させるためにホルモン (human chorionic gonadotropin: HCG) を注射したり、飼育水温を産卵適水温 (22℃) に維持する方法が多く用いられてきた^{1, 2)}。その結果、この両処理を

組み合わせることにより、親魚は一シーズン中に一産卵群として 30~40 回の産卵を繰り返すことが報告されている³²⁾。一方、産卵直前のウイルス検査では PCR 陰性であった親魚も、このような多回産卵により産卵後期 (一産卵群の産卵回数として 15 回以上) になると PCR 陽性に転じる個体が出現するようになる²⁴⁾。

一般に、感染症にはさまざまなストレスが深く関与していることはよく知られており、魚類でも同様の現象が認められている³³⁻³⁷⁾。シマアジにおいては、親魚が産卵を繰り返すことによってウイルス陰性から陽性に転じるという現象は、多回産卵期間中の親魚血液中のストレスの指標となるステロイドホルモン (コルチゾール) の上昇に裏付けられるように親魚がストレス状態に置かれていることに起因していると考えられる³⁸⁾。その結果、この水槽内での多回産卵がストレスとなってストレスの二次反応 (免疫応答の低下等) をもたらし、最終的に産卵後期に親魚体内に不顕性感染している SJNNV の増殖が誘発されるためと考えられている^{24, 38)}。そのため、一シーズン中の一産卵群の産卵回数を 10 回程度に留めることも一つの防除対策になり得ると考えられている²⁴⁾。

産卵期間中のシマアジ親魚に対してストレスとなり得る要因として、多回産卵の他に HCG 注射や収容密度といった産卵誘発や飼育管理に関する要因も報告されている³⁸⁾。これらの要因以外にも、産卵期間中の給餌方法 (餌の種類や給餌頻度)、水槽内の水質環境あるいは親魚の体力を高めるような飼餌料への有効な添加物質や免疫賦活剤などとウイルスの増減との関連についても、今後の検討課題として残されている。

3) 受精卵の消毒

SJNNV は受精卵の表面に付着しているだけなのか、あるいは卵の中に侵入しているのかは、現在のところ不明である。SJNNV の不活化に有効な化学的、物理的条件については ARIMOTO *et al.*³⁹⁾ により表 3 のように報告されている。これらの結果を水槽等の消毒にそのまま応用できることもあるが、卵の消毒に応用するためには *in vivo* で生体への影響について確認する必要がある。

虫明³²⁾は、ウイルス陽性親魚から得られた卵をヨード剤で消毒した場合 (有効ヨウ素濃度 80 mg/l で 15 分間)

表 3. 各種薬剤等の SJNNV に対する不活化濃度

薬剤等の名称	有効濃度 (μg/ml)	作用時間 (分)
次亜塩素酸ナトリウム	50	10
次亜塩素酸カルシウム	50	10
塩化ベンザルコニウム	50	10
ヨード剤	50	10
逆性石鹼	10,000	10
熱	60℃	10
pH	12	10
紫外線	410 μw/cm ²	4
オゾン	0.1 (残留オキシダント)	2.5

としない場合では、卵消毒したふ化仔魚の方に延命効果が認められたことを報告している。この結果から判断すると、SJNNV は単にシマアジの卵表面に付着している可能性が高いように思われる。卵消毒による VNN の防除は単独では抜本的な対策とはならないが、卵を介して種苗生産現場に持ち込まれる SJNNV のポテンシャルを下げるという観点からすれば、決して無意味な対策ではない。

近年、種苗生産現場では残留オキシダント (0.5 mg/l) を含む海水 (以下オキシダント海水) を用いた卵消毒が実施されているが^{28, 40)}、現在日裁協で実施されているシマアジ受精卵の消毒方法について述べる (図 3)。卵消毒を行う時の受精卵の発生段階としては、桑実期 (受精後約 6 時間以上) から発眼期 (同約 35 時間以前) の間が望ましい³²⁾。その理由は、桑実期以前の卵は、取り上げなどのハンドリングにより受精膜に受けた物理的損傷が原因となって発生が停止しやすいためである。また、卵比重の増加に伴う沈下³²⁾がみられる発眼期以降の卵でも、ハンドリングによる損傷を受け発生が停止しやすいことが経験的に知られている。そのため、シマアジでは受精卵の消毒に最も適した発生段階は桑実期から胚環期 (受精後約 10 時間) と考えている³²⁾。採卵した後にふ化容器

に収容された卵の発育段階がこの時点に達した段階で卵を取り上げる。その際、採卵時に混入したゴミや卵管理中に発生が停止した沈下卵は、卵消毒時のオキシダント海水の力価の急激な減衰を招くため可能な限り除去しておくことが望ましい。取り上げた卵は、予めゴースネット等の柔らかい生地で作製したタモ網 (容量 20 l) に消毒 1 回当たり最大 30 万粒 (1.5 万粒/l) を目安に収容する。そして、オキシダント海水を入れた 70 l 容器 (実容量 50 l) 3 面にそれぞれ 10, 20 および 30 秒 (合計で 1 分間) となるように卵を収容した状態でタモ網を移動して消毒を行う。最後に、活性炭層でオキシダントを吸着させて除去した海水 (以下オキシダント処理海水) 中で卵の表面に付着したオキシダントを除去するために約 1 分間の洗浄を行った後、別のふ化容器に収容する。30 万粒以上の卵を消毒する際には、この操作を繰り返す。また、卵消毒中は卵とオキシダントとの接触を助けるために受精膜を傷つけない程度にタモ網を緩やかに揺らすことも必要である。なお、オキシダント海水に含まれるオゾンガスおよびオキシダントは人体に有害であるため、消毒時には必ずゴム手袋やマスクを着用するとともに、消毒後のオキシダント海水はチオ硫酸ナトリウムによる中和を確認した上での廃棄が必要である。

このように、種苗生産現場ではオキシダント海水を用いた卵消毒が実施されているが、この他にもオキシダント海水を用いた飼育器具類の消毒の有効性も報告されている⁴¹⁾。しかし、シマアジにおけるその実際の消毒効果に関してはまだ証明されていないが、最近ハリバットにおいてオキシダント海水を用いた卵消毒の有効性が報告されている⁴²⁾。

4. 水平伝播の防除対策

海上生簀や陸上水槽におけるシマアジの天然養成親魚間で水平感染が起こっているのか否かに関しては、今のところ明確な結論は得られていない。外観上健康に見える養成親魚 (天然魚を漁獲した後に養成) で平均 65% もの割合で SJNNV に対する抗体を保有していたという調査事例がある¹⁴⁾。これは、親魚養成期間中に水平感染を受けて感染率が高くなった可能性もあるが、もともと天然魚が SJNNV に感染歴を有していた可能性もある。前者、すなわち親魚間で容易に水平感染が成立しているとすれば、今後、親魚への感染の防除を図るためにワクチン (後述) 処理技術の開発が必要である。また、陸上水槽においては、飼育用水からのウイルスの混入を未然に防ぐためにオキシダント処理海水を使用することも有効と考えられる。さらに、水槽内に放出されたウイルスを飼育排水とともにそのまま地先海面に流すのはその海面のウイルスのポテンシャルを高める結果を招き、ひいては種苗生産現場全体の環境中のウイルス量を増やす結果になると考えられる。そのため、オゾン処理装置は飼育

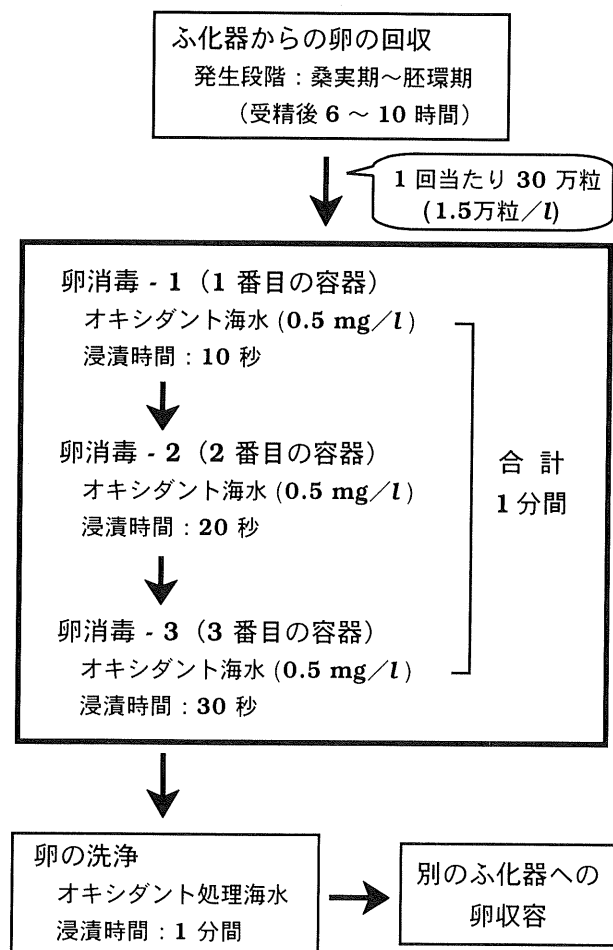


図 3. 日裁協におけるシマアジ受精卵の消毒方法

用水の殺菌のためだけではなく飼育排水の殺菌にも用いられるべきであろう。ちなみに、上浦事業場では、飼育用水にはオキシダント処理海水を使用している。また、飼育排水はオキシダント (0.5 mg/l) で殺菌し、残留しているオキシダントはチオ硫酸ナトリウムで中和した後に海面に放出している。

上述したような産卵親魚の選別や卵の消毒を行って、例えばウイルスフリーあるいはそれに近い卵が得られたとしても、何らかの要因で飼育している仔魚の一部でひとたび VNN が発生すると、瞬く間に同一水槽中の仔魚に伝染して大量の死亡が発生することは前に述べた。事実、同居感染により水平感染が容易に成立することが実験的にも確かめられている¹²⁾。種苗生産段階における SJNNV の水平伝播を防除するには、各種薬剤の適正な使用による水槽や飼育器具の消毒、紫外線・オゾン処理装置による飼育用水の消毒、オキシダント処理海水を用いた餌料生物の洗浄、飼育排水の処理、飼育施設の隔離、および死亡魚と病魚の早期処分が重要な項目として挙げられている⁴³⁾。また、実際の取り組み事例として、種苗生産水槽への仔魚の収容密度を下げたり、換水率を高めることが種苗生産過程の仔魚間における SJNNV の水平感染の防除に有効であることが経験的に知られている⁴³⁾。

5. そ の 他

VNN の積極的な防除の試みとして、大腸菌に発現させたウイルス組換えタンパクを用いた親魚あるいは稚魚への免疫の試みが行われている。シマアジでは、ホルマリンで不活化させた病魚磨砕液を接種することによりウイルスを中和する抗体が産生されることが判明している⁴⁴⁾。大腸菌発現タンパクを利用することにより親魚あるいは稚魚の免疫への応用も期待されるが、今のところ、その実際的な効果は証明されていない。この可能性については、シマアジ親魚間の水平感染の防除を始め、現在のところまだ有効な VNN 防除対策が確立されていないヒラメやハタ科魚類においても親魚や稚魚への応用が期待されている。

6. お わ り に

以上、シマアジの VNN に関する垂直伝播および水平伝播の防除対策に関して述べたが、これらの対策の一部だけを実施しただけでは不十分である。これらの各対策を総合的に講じて始めて有効な対策となり得る。そして、種苗生産施設の基本である常日頃からの種苗生産環境の衛生管理こそが最も重要と言える。ウイルスや細菌などの目に見えない病原微生物は、いつ如何なる時も我々の種苗生産現場への侵入を虎視眈々と狙っていることを忘れないように心がけるべきである。

謝 辞

稿を終えるに当たり、共同研究者として幾多の御指導と貴重な御助言を賜りました京都大学大学院の古澤 巖教授、広島大学の室賀清邦教授、中井敏博助教授ならびに西澤豊彦助手に厚く御礼申し上げます。また、室賀清邦教授には本稿の御校閲を頂くとともに有益な御助言を賜りましたことに感謝申し上げます。さらに、共同研究がより良い環境で円滑に行えるよう御配慮頂くとともに叱咤激励頂きました日裁協の現・旧役員の皆様と種苗生産現場で本病の防除対策の確立を目指して日々御尽力と御協力頂きました関係職員の皆様に感謝致します。

引用文献

- 1) 松本 淳・河野一利 (1985) シマアジの採卵について、栽培技研, **14**, 35-42.
- 2) 虫明敬一・河野一利・長谷川 泉 (1989) シマアジの採卵について—II、栽培技研, **18**, 15-24.
- 3) 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.
- 4) 関谷幸生 (1992) シマアジの種苗生産技術の開発。平成2年度飼付け型栽培漁業技術開発報告書 (2)。日本栽培漁業協会, 東京, pp. 10-14.
- 5) 塩澤 聡 (1992) シマアジの種苗生産技術の開発。平成2年度飼付け型栽培漁業技術開発報告書 (2)。日本栽培漁業協会, 東京, pp. 15-16.
- 6) YOSHIKOSHI, K., and K. INOUE (1990) Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, **13**, 69-77.
- 7) MORI, K., T. NAKAI, K. MUROGA, M. ARIMOTO, K. MUSHIAKE, and I. FURUSAWA (1992) Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, **187**, 368-371.
- 8) BLOCH, B., K. GRAVNINGEN, and J. L. LARSEN (1991) Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Dis. Aquat. Org.*, **10**, 65-70.
- 9) MUNDAY, B. L., J. S. LANGDON, A. HYATT, and J. D. HUMPHREY (1992) Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Aquaculture*, **103**, 197-211.
- 10) OIE (1997) Viral encephalopathy and retinopathy or Viral nervous necrosis, in "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. 2nd ed.", Office International des Epizooties, Paris, pp. 99-107.
- 11) 室賀清邦・古澤 徹・古澤 巖 (1998) シマアジのウイルス性神経壊死症 (総説)。水産増殖, **46**, 473-480.
- 12) ARIMOTO, M., K. MORI, T. NAKAI, K. MUROGA, and I. FURUSAWA (1993) Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider). *J. Fish Dis.*, **16**, 461-469.

- 13) ARIMOTO, M., K. MUSHIAKE, Y. MIZUTA, I. FURUSAWA, T. NAKAI, and K. MUROGA (1992) Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) from striped jack by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathol.*, **27**, 191-195.
- 14) MUSHIAKE, K., M. ARIMOTO, T. FURUSAWA, I. FURUSAWA, T. NAKAI, and K. MUROGA (1992) Detection of antibodies against striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) from brood stocks of striped jack. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 2351-2356.
- 15) NISHIZAWA, T., K. MORI, T. NAKAI, I. FURUSAWA, and K. MUROGA (1994) Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Org.*, **18**, 103-107.
- 16) GLAZEBROOK, J. S., M. P. HEASMAN, and S. W. DE BEER (1990) Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *J. Fish Dis.*, **13**, 245-249.
- 17) RENAULT, T., Ph. HAFNER, F. Baudin LAURENCIN, G. BREUIL, and J. R. BONAMI (1991) Mass mortalities in hatchery-reared sea bass (*Lates calcarifer*) larvae associated with the presence in the brain and retina of virus-like particles. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **11**, 68-73.
- 18) BREUIL, G., J. R. BONAMI, J. F. PEPIN, and Y. PICHOT (1991) Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, **97**, 109-116.
- 19) COMPS, M., J. F. PEPIN, and J. R. BONAMI (1994) Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, **123**, 1-10.
- 20) NISHIZAWA, T., M. FURUHASHI, T. NAGAI, T. NAKAI, and K. MUROGA (1997) Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1633-1636.
- 21) FRERICH, G. N., H. D. RODGER, and Z. PERIC (1996) Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Gen. Virol.*, **77**, 2067-2071.
- 22) IWAMOTO, T., K. MORI, M. ARIMOTO, and T. NAKAI (1999) High permissivity of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Org.*, **39**, 37-47.
- 23) COMPS, M., M. TRINDADE, and Cl. DELSERT (1996) Investigation of fish encephalitis viruses (FEV) expression in marine fishes using DIG-labelled probes. *Aquaculture*, **143**, 113-121.
- 24) MUSHIAKE, K., T. NISHIZAWA, T. NAKAI, I. FURUSAWA, and K. MUROGA (1994) Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.*, **29**, 177-182.
- 25) NGUYEN, H. D., K. MUSHIAKE, T. NAKAI, and K. MUROGA (1997) Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. *Dis. Aquat. Org.*, **28**, 87-91.
- 26) 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.
- 27) 虫明敬一・中井敏博・室賀清邦・関谷幸生・古澤 巖 (1993) シマアジのウイルス性神経壊死症: 仔魚の発病に対する親魚の抗体価および産卵飼育方法の影響. 水産増殖, **41**, 327-332.
- 28) WATANABE, K., S. SUZUKI, T. NISHIZAWA, K. SUZUKI, M. YOSHIMIZU, and Y. EZURA (1998) Control strategy for viral nervous necrosis of barfin flounder. *Fish Pathol.*, **33**, 445-446.
- 29) WATANABE, K., T. NISHIZAWA, and M. YOSHIMIZU (2000) Selection of brood stock candidates of barfin flounder by an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, in press.
- 30) NISHIZAWA, T., K. MUROGA, and M. ARIMOTO (1996) Failure of the polymerase chain reaction (PCR) method to detect striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in striped jack *Pseudocaranx dentex* selected as spawners. *J. Aquat. Anim. Health*, **8**, 332-334.
- 31) OGAWA, K. (1992) *Caligus longipedis* infection of cultured striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Teleostei: Carangidae) in Japan. *Fish Pathol.*, **27**, 197-205.
- 32) 虫明敬一 (1996) 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 (特別研究報告 9 号), 日本栽培漁業協会, 東京, 62 pp.
- 33) WEDEMEYER, G. A. (1970) The role of stress in the disease resistance of fishes. *Spec. Publ. Am. Fish. Soc.*, **5**, 30-35.
- 34) SNIESZKO, S. F. (1970) The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish Biol.*, **6**, 197-208.
- 35) MAZEAUD, M. M., F. MAZEAUD, and E. M. DONALDSON (1977) Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **106**, 201-212.
- 36) WEDEMEYER, G. A., and C. P. GOODYEAR (1984) Diseases caused by environmental stressors. In "Diseases of marine animals" vol. 4, Part 1. (ed. by O. Kinne), Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, pp. 424-434.
- 37) PETERS, G., M. FAISAL, T. LANG, and I. AHMEND (1988) Stress caused by social interaction and its effect on susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Dis. Aquat. Org.*, **4**, 83-89.
- 38) 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.
- 39) ARIMOTO, M., J. SATO, K. MARUYAMA, G. MIMURA, and I. FURUSAWA (1996) Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture*, **143**, 15-22.
- 40) MORI, K., K. MUSHIAKE, and M. ARIMOTO (1998) Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. *Fish Pathol.*, **33**, 443-444.
- 41) 渡辺研一・吉水 守 (1998) オゾン処理海水を用いた飼育器具類および受精卵の消毒. 魚病研究, **33**, 145-146.
- 42) GROTHOMOL, S., and G. K. TOTLAND (2000) Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Dis. Aquat. Org.*, **39**, 89-96.
- 43) 日本栽培漁業協会 (1995) ウイルス性神経壊死症防除技術開発のこれまでの成果 (平成 7 年度栽培漁業技術開発推進

事業ブロック協議会資料), 91 pp.

44) NISHIZAWA, T., M. KISE, T. NAKAI, and K. MUROGA

(1995) Neutralizing monoclonal antibodies to striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Fish Pathol.*, **30**, 111–114.