

素掘池を利用したPRDVフリー親クルマエビの養成

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: 崎山, 一孝, 虫明, 敬一, 西岡, 豊弘 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014527

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



素掘池を利用した PRDV フリー親クルマエビの養成

崎山一孝*1・虫明敬一*2・西岡豊弘*3

Broodstock Management of PRDV-free Kuruma Prawn *Penaeus japonicus* in an Earthen Pond

Kazutaka SAKIYAMA, Keiichi MUSHIAKE, and Toyohiro NISHIOKA

The rearing of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) free broodstock is essential in order to prevent penaeid acute viremia during kuruma prawn seed production. In this study, an experiment involving broodstock management was carried out using juveniles that were non-detectable for PRDV by the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. It was possible to rear 1-year old mature prawns and their seed without the detection of viruses in the culture pond where no the virus-positive organisms were determined to be present by PCR. It was considered that PRDV infection was prevented by the absence of horizontal infection occurring due to other organisms in the pond, and possibly by reducing stress under low density rearing, removing dead individuals from the culture pond, and preventing the degradation of water quality during the rearing period.

2002年2月5日受理

近年、我が国のクルマエビの種苗生産事業や養殖業では、クルマエビ類の急性ウイルス血症 (penaeid acute viremia: PAV)¹⁾ の発生が大きな問題となっている。また、これまでに東南アジア諸国の養殖クルマエビ、ウシエビ、レッドテールシュリンプおよびコウライエビなどにも、white spot syndrome (WSS) と呼ばれる本病と類似の症状を呈する疾病の発生が報告されている²⁻⁵⁾。この WSS は、現在のところ日本における PAV と同一の疾病と考えられている^{6,7)}。

本病の原因ウイルス (penaeid rod-shaped DNA virus; PRDV)¹⁾ の感染経路は、養殖場では PRDV に感染した種苗や PAV により死亡した個体からの水平感染が主たる感染経路と考えられている⁸⁾。一方、種苗生産過程では、天然の親クルマエビ (以下、親エビ) から卵を介した垂直感染が主要な感染経路と考えられており⁹⁾、種苗生産過程での PAV の防除には PRDV を保有していない親エビの確保が重要とされている¹⁰⁾。

しかし、天然海域で漁獲された親エビにはウイルス感染率が夏期以降に 90% 以上を示す場合もあり¹⁰⁾、ウイルスに感染していない成熟した親エビの確保が困難となっている。そこで、(社)日本栽培漁業協会では、ウイ

ルスを保育していない親エビの確保を目的として、百島事業場の素掘池 (以下、養成池) を利用して健康なクルマエビ種苗 (以下、稚エビ) を用いた親エビ養成試験に取り組んできた。その結果、PRDV フリーの親エビ (PCR 法により PRDV 遺伝子が検出されない親エビ) が得られ、その親エビから PRDV フリーの稚エビの生産が可能となったので報告する。

材料と方法

供試エビ 養成試験に供した稚エビは、1999年4月2日に大分県鶴見町に水揚げされた親エビを用いて、(社)日本栽培漁業協会上浦事業場で生産したものを使用した。親エビは輸送後産卵水槽 (0.5 kl) に 10 尾収容して産卵させた。飼育に供する PRDV フリーの卵の確保は、MUSHIAKE *et al.* (1999)¹¹⁾ の方法に準じた。すなわち、親エビの産卵後、産卵個体の受精囊からポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) 法により PRDV の検出を試み、PCR 陰性の親エビから得た受精卵のみをヨード剤 (有効ヨウ素 5 mg/l で 5 分間浸漬) で消毒し、飼育に供した。

*1 日本栽培漁業協会百島事業場 〒722-0061 広島県尾道市百島町 1760 (Japan Sea-Farming Association Momoshima Station, 1760, Momoshima, Onomichi, Hiroshima, 722-0061 Japan).

*2 日本栽培漁業協会五島事業場 〒853-0501 長崎県南松浦郡玉之浦町荒川郷 122-7.

*3 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.

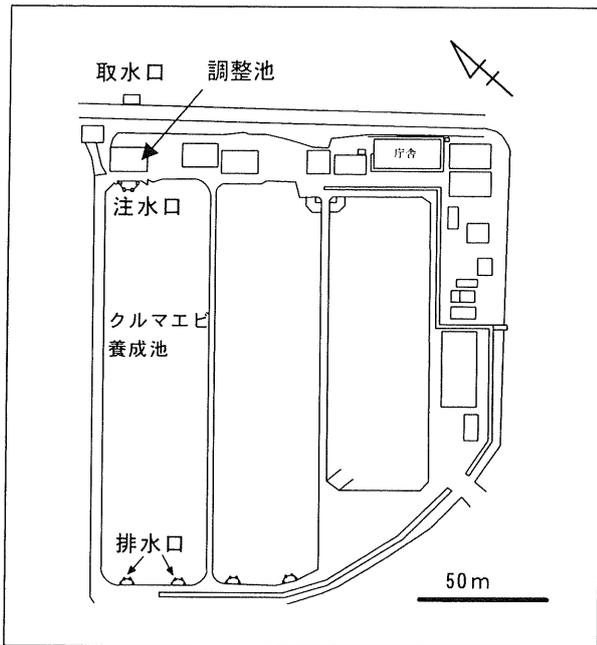


図1. 親クルマエビの養成試験に使用した素掘池（養成池）

種苗生産試験には150kl水槽を用い、77日間の飼育を行った。飼育水にはオゾン殺菌処理海水を使用した。種苗生産期間中は、定期的にPCR法により稚エビのウイルス検査を行った。PRDV遺伝子は検出されなかったため、1999年7月2日に稚エビ(P74)2.3万尾を百島事業場へ輸送し、養成池へ収容した。輸送には0.5および1kl水槽を各1基ずつ使用し、輸送中は酸素とブローアによる通気を行った。養成池収容時の稚エビの大きさは、平均体長40.2mm、平均体重0.66gであった。

養成池 試験に使用した養成池を図1に示した。池の底面積は7,500m²、最大水深は2mで底質は砂泥である。養成池の換水は、満ち潮時に調整池にとり入れた外海水を注水口から養成池に取り入れ、排水は引き潮時に排水口から行った。注水口と排水口にはクルマエビの大きさに応じて0.8~5.0mm目合のスクリーンを設置し、大型魚介類などの害敵生物の侵入を防止した。池内には攪水機(桜川ポンプ社製)2基を設置し、海水の攪拌と酸素の供給を行った。

給餌 餌料には市販の配合飼料(10月5日までヒガシマル製、10月6日以降は協和発酵製)を使用し、1日に1回、16時以降に給餌した。養成期間中は適宜潜水調査を行い、死亡個体やごみ、海草を除去するとともに、残餌の状況を観察し給餌量を調整した。なお、低水温期の1月~3月は摂餌しないため給餌しなかった。

水質調査 養成池の水質調査として、毎日9~10時に注水口の水温、塩分濃度、溶存酸素量、pHおよび濁度を測定した。測定には東亜電波社製のDOメーター、pH

メーター、および塩分濃度計を使用した。

成長と生残 クルマエビの成長は、月に2~3回かご網により捕獲し、体長、頭胸甲長および体重を測定した。なお、低水温によりエビの捕獲ができない12月末から翌年3月中旬までは測定しなかった。

生残尾数の推定は、2000年6月1日、7月7日および8月18日にコドラート法により行った。調査方法は、養成池内に24カ所の定点を設け、定点毎に1m角の枠内の尾数を計数し、1m²中の平均尾数を求め、それに養成池の面積7,500m²を乗じて養成池内の生残尾数を推定した。また、雌エビでは交尾栓の有無と、宮島・松本¹²⁾が従来の目視による判断を整理し、成熟状態をA~Dの4段階(AおよびBが成熟個体)に分けた評価で行った。**PCR法によるPRDVの検出** 1999年7月から2000年6月にかけて養成クルマエビと池内に生息するカニ類、スナモグリおよび多毛類について、PCR法によるPRDVの検出を行った。なお、検査は(社)日本栽培漁業協会上浦事業場で行った。

養成クルマエビでは1999年9月、11月、2000年2月、3月、4月および6月の計6回、1回あたり6~56尾を検査した。検査部位は雌では受精嚢、卵巣卵および胃上皮の3部位とし、また、雄では貯精嚢と胃上皮の2部位とした。いずれのサンプルも個体別にPCR法による検査を行なった。また、カニ類、スナモグリおよび多毛類では1999年6月、9月および2000年4月の計3回、カニ類とスナモグリは胃上皮を、多毛類は頭部について検査した。

水産庁のマニュアル¹⁴⁾に準じて、検体から鋳型DNAの抽出を行い、木村ら¹³⁾の方法に準じ、nested PCRによりPRDVの標的遺伝子(569塩基対)を増幅させ、アガロース電気泳動により増幅産物の有無を確認してPRDVの検出を行った。

結 果

環境の変化 養成期間中の水温、溶存酸素量、pHおよび塩分濃度の変化を図2に示した。水温は8~9月に30℃まで上昇し、1~2月は5℃まで低下した。溶存酸素量は5~15mg/l、pHは7.0~9.0の範囲にあり、夏期に低下し冬期に上昇する傾向が見られた。塩分濃度は30~35psuの範囲で、季節による大きな変動は認められなかった。

成長と生残 種苗生産した稚エビの輸送中に目立った死亡は認められず、養成池収容時の活力は良好であった。養成開始から翌年9月までの成長を図3に示した。体長、頭胸甲長および体重の増加は緩やかなS字形を示し、低水温期である1月から3月の間は成長が停滞し

*4 水産庁養殖研究所病理部・熊本県水産研究センター(1996)PCR法によるPRDV(RV-PJ)の検出方法(平成8年度魚病技術者研修魚病専修コース研修用資料)、日本水産資源保護協会、東京、pp.1-8.

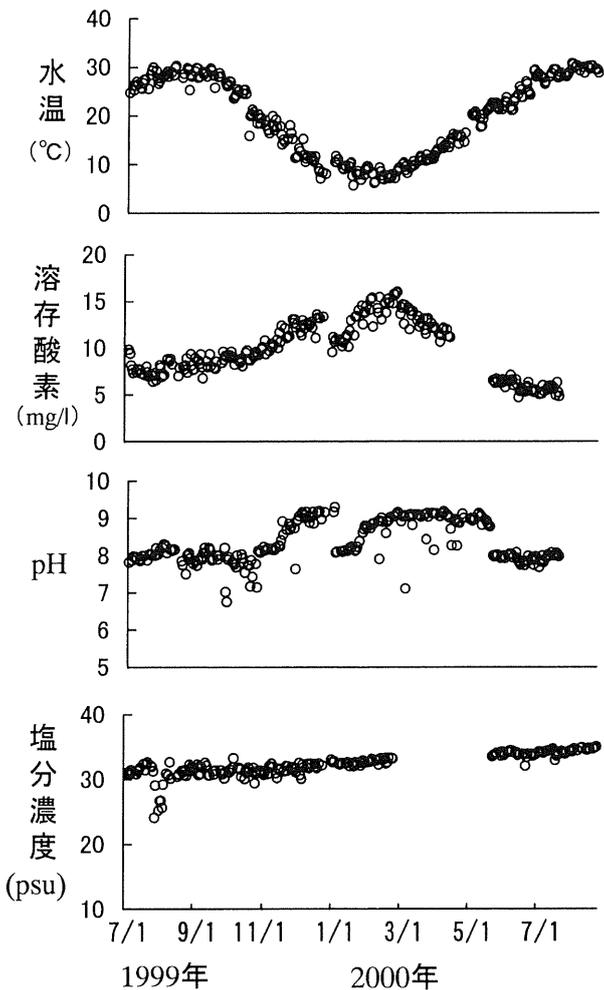


図2. クルマエビ養成池の環境変化

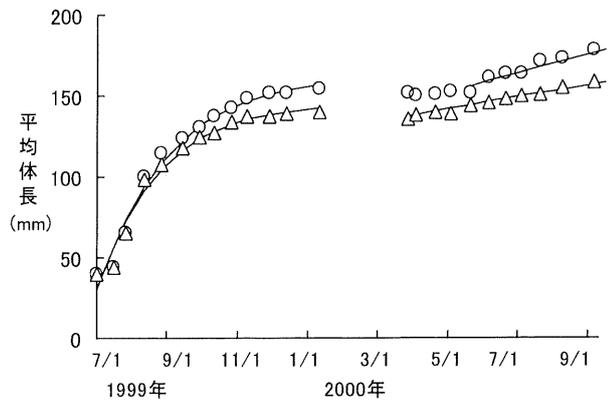


図3. 養成池内でのクルマエビの成長
○: 雌, △: 雄.

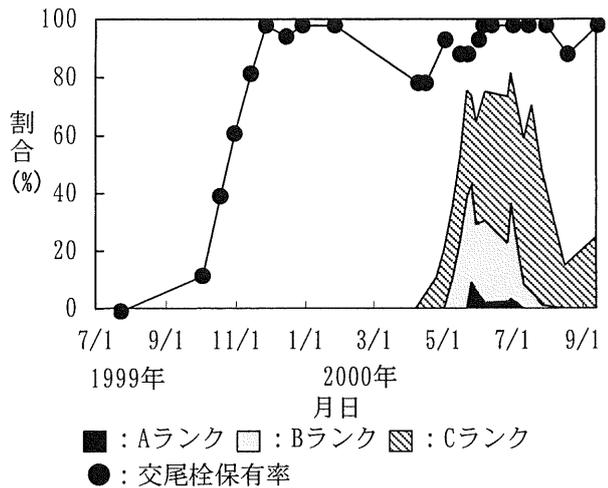


図4. 養成池での雌クルマエビの成熟状況と交尾栓保有率の変化

た。
 養成1年後のコドラート法による推定生残尾数は4,600~6,400尾(生残率17.6~24.6%)と推定された。なお、養成期間中にPAVによると思われる大量死亡は認められなかった。

成熟と産卵 雌エビの成熟状況を図4に示した。交尾栓を保有する個体の出現率は11月から増加し、12月以降は90%以上を示した。成熟個体は、養成開始翌年の5月8日から確認され、その時の平均体長は152.8±7.3mm, 平均体重は44.6±5.8gであった。また、5月26日

に出現率が43.1%と最も高くなった。

種苗生産試験を目的として、2000年6月8日に上浦事業場へ50尾の成熟個体を輸送し、産卵させた。輸送した親クルマエビは全てPCR法によりPRDV遺伝子は検出されなかった。そのうち4尾の親クルマエビから得られた73万粒の受精卵をふ化させ、52万尾のふ化幼生が得られた。また、この幼生を用いて生産した稚エビから、PRDV遺伝子は検出されなかった。

ウイルス検査結果 養成クルマエビについて行った6回の検査結果を表1に示した。いずれの時期においても、

表1. 素掘池で養成したクルマエビのPRDV検出結果

年	月日	雌検出結果(陽性個体数/検査個体数)						雄検出結果(陽性個体数/検査個体数)				
		尾数	平均体長(mm)	受精囊	卵巣卵	胃	第5歩脚	尾数	平均体長(mm)	精巣	胃	第5歩脚
1999	11.30	10	151	0/10				5	137	0/5		
2000	3.31	10	151	0/10				10	135	0/10		
	4.7	28	150	0/28				23	138	0/23		
	5.9	10	152	0/10	0/10	0/10	0/10	10	139	0/10	0/10	0/10
	6.8	56	160		0/56							
	8.30	10	172	0/10	0/10	0/10		19	155	0/19	0/19	0/19

*: 雌雄区別無し 空欄は未調査

表2. 素堀池の環境生物の PRDV 検査結果

種類	検査結果 (陽性個体数/検査個体数)		
	1999年6月	1999年9月	2000年4月
スナモグリ	0/32	0/24	0/14
多毛類	0/15	0/10	0/6
カニ類	0/11	0/41	0/12

また、雌雄いずれの個体からも PRDV は検出されなかった。また、養成池内に生息するカニ類、スナモグリおよび多毛類について3回の検査を行ったが、いずれのサンプルからも PRDV は検出されなかった (表2)。

考 察

PRDV の感染経路には、水平感染⁸⁾と垂直感染⁹⁾の両方が存在すると考えられている。そのため、人工稚エビを用いた親エビの養成過程において、PAV の防除にはこの二つの感染経路を遮断するような対策を講ずることが重要である。

垂直感染の防除として、種苗生産過程でウイルスを保有していない親エビから得られた卵の使用、およびヨード剤を用いた卵の消毒が有効であることが報告されている⁹⁻¹¹⁾。今回養成池試験に用いた稚エビの生産過程においても、これら2つの予防対策を講じたことで PRDV の垂直感染を防除できたと考えられる。

一方、水平感染では、種苗生産や中間育成場での飼育過程における様々な要因がストレスとして宿主に負荷をかけ、その結果として PRDV に対する感受性を増大させ、PRDV の宿主生体内での増殖の誘因になる可能性が指摘されている¹⁰⁾。養成池でのストレスとして、高密度飼育、餌不足および環境の悪化が挙げられる。しかし、本試験における稚エビの収容密度は 3.7 尾/m² であり、養殖での一般的な収容密度 20 尾/m²¹⁴⁾ に比べてかなり低く、飼育密度の影響は少ないと考えられる。また、養成期間中にクルマエビの体重や肥満度の低下が認められなかったことから、餌不足であったとは考えにくい。このように、今回、素堀池を用いた養成により、クルマエビへのストレスを軽減させることができたことが親エビ養成に成功した要因の一つと考えられた。

養成池内に PRDV が侵入し水平感染を引き起こす可能性の一つとして、外海に棲息する PRDV キャリアーの養成池への侵入に伴い、諸要因によりストレスを受けたクルマエビが容易に PRDV に感染するケースが想定される。実際に PRDV に感染したニホンスナモグリと同居させることにより、クルマエビ種苗に PRDV の水平感染が成立することが実験的に確かめられている^{*5)}。本試験で1年間の養成を行った結果、養成エビに PRDV

の感染が認められなかったことから、養成池への侵入生物による PRDV の持ち込みはなかったものと考えられる。現在、天然クルマエビ以外にも *Ephydriidae* 属の昆虫、コペポーダ (*Schmackeria dubia*)、エビ類 (*Exopalaemon orientis*)、カニ類 (*Helice tridens*) での PRDV の感染事例¹⁵⁾や、感染は成立するものの死亡に至らずキャリアーとして生存し続ける事例¹⁶⁾が報告されている。PCR 法にはウイルスの量的な検出限界があり、また、今回の試験でも検査サンプル数も十分であるとは言いが、調査した養成池内に生息するスナモグリ、カニ類および多毛類のいずれからも PRDV は検出されなかった事実から、これらの環境生物における PRDV の感染濃度は極めて低いと考えられた。また、仮にそれらの生物にごく微量の PRDV が感染していたとしても、養成クルマエビが適正な飼育条件下に管理され宿主側の抵抗力が正常に機能していたために水平感染を受けることがなかったとも考えられる。すなわち、潜水調査による死亡個体やごみなどの除去を行うとともに、餌料を配合飼料のみとしたことで水質の悪化が防止できたことも水平感染の防除に効果があったと考えられた。

本試験で養成したクルマエビから PRDV は検出されず、PAV も発生しなかったことから、水平感染はなかったものと判断された。しかし、使用した養成池の水温は、夏期が 29℃ 以上に上昇し、冬期には 5℃ に下降することから、この水温変動の較差が最も大きなストレスになり得る可能性は残されている。また、クルマエビの養殖場では、29℃ 以上の高水温は種苗の成長に悪影響を及ぼすことが報告されている¹⁷⁾。今後この養成池を利用した親エビ養成を行う際の課題として検討する必要がある。

謝 辞

本論文を取りまとめるにあたり、有益なご助言を頂いた広島大学生物生産学部の室賀清邦教授と日本栽培漁業協会本部の古澤 徹常務理事に深謝します。また、養成試験にご協力頂いた百島事業場と上浦事業場の職員各位に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) INOUE, K., K. YAMANO, N. IKEDA, T. KIMURA, H. NAKANO, K. MOMOYAMA, J. KOBAYASHI and S. MIYAJIMA (1996) The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathol.*, **31**, 39-45.
- 2) CHOU, H. Y., C. Y. HUANG, C. H. WANG, H. C. CHIANG and C. F. LO (1995) Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in

*5) 福田 穰 (1999) クルマエビ養殖池に生息するニホンスナモグリからの PRDV の検出. 平成 11 年度日本魚病学会春季大会講演要旨集, 38.

- Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **23**, 165-173.
- 3) WONGTEERASUPAYA, C., J. E. VICKERS, S. SRIURAIRATANA, G. L. NASH, A. AKARAJAMORN, V. BOONSAENG, S. PANYIM, A. TASSANAKAJON, B. WITHYACHUMNARNKUL and T. W. FLEGEL (1995) A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 69-77.
 - 4) PENG, B., J. REN, J. SHEN, G. ZHOU, H. GU, Y. SHEN, G. ZHENG and Z. GONG (1995) The study on baculovirus-caused disease of prawns (*Penaeus chinensis*) in Shanghai suburb. *Chinese J. Virol.*, **11**, 151-157.
 - 5) LIGHTNER, D. V. (1996) A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Special publication of the World Aquaculture Society, Barton Rouge, LA, (sections 1-7).
 - 6) TAKAHASHI, Y., T. ITAMI, M. MAEDA, N. SUZUKI, J. KASORNCHANDRA, K. SUPAMATTAYA, R. KHONGPRADIT, S. BOONYARATPALIN, M. KONDO, K. KAWAI, R. KUSUDA, I. HIRONO and T. AOKI (1996) Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricius. *J. Fish Dis.*, **19**, 399-403.
 - 7) LO, C. F., J. H. LEU, C. H. HO, C. H. CHEN, S. E. PENG, Y. T. CHEN, C. M. CHOU, P. Y. YEH, C. J. HUANG, H. Y. CHOU, C. H. WANG and G. H. KOU (1996) Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 133-141.
 - 8) 中野平二・河邊 博・梅沢 敏・桃山和夫・平岡三登里・井上 潔・大迫典久 (1994) 1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死: 発生状況および感染実験. 魚病研究, **29**, 135-139.
 - 9) 佐藤 純・虫明敬一・森 広一郎・有元 操・今泉圭之輔・西澤豊彦・室賀清邦 (1999) クルマエビの種苗生産過程における PAV の発生状況. 魚病研究, **34**, 33-38.
 - 10) 虫明敬一・有元 操・佐藤 純・森 広一郎 (1998) 天然クルマエビ成体からの PRDV の検出. 魚病研究, **33**, 503-509.
 - 11) MUSHIAKE, K., K. SHIMIZU, J. SATOH, K. MORI, M. ARIMOTO, S. OHSUMI and K. IMAIZUMI (1999) Control of penaeid acute viremia (PAV) in *Penaeus japonicus*: selection of eggs based on the PCR detection of the causative virus (PRDV) from *Receptaculum seminis* of spawned broodstock. *Fish Pathol.*, **34**, 203-207.
 - 12) 宮島義和・松本 淳 (1996) 人工養成クルマエビを用いた生検法による採卵用親エビの成熟度判定と効率的な採卵方法. 栽培技研, **25**, 37-40.
 - 13) 木村武志・山野恵祐・中野平二・桃山和夫・平岡三登里・井上 潔 (1996) PCR 法による PRDV の検出. 魚病研究, **31**, 93-98.
 - 14) 茂野邦彦 (1969) クルマエビの養殖技術に関する諸問題. 水産研究業書, **19**, pp. 1-96.
 - 15) LO, C. F., C. H. HO, S. E. PENG, C. H. CHEN, H. C. HSU, Y. L. CHIU, C. F. CHANG, K. F. LIU, M. S. SU, C. H. WANG and G. H. KOU (1996) White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 215-225.
 - 16) RAJENDRAN, K. V., K. K. VIJAYAN, T. C. SANTIAGO and R. M. KROL (1999) Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from India. *J. Fish Dis.*, **22**, 183-191.
 - 17) 門脇秀策・田中啓陽 (1993) 透明度から見た養殖クルマエビの成長. 水産増殖, **41**, 61-65.