

## 種苗生産過程におけるクルマエビの急性ウイルス血症（P A V）の防除対策

|       |                                                                                                                                        |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| メタデータ | 言語: Japanese<br>出版者:<br>公開日: 2025-04-24<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 佐藤, 純, 虫明, 敬一, 森, 広一郎, 有元, 操, 今泉, 圭之輔<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014546">https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014546</a>                                    |

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



総説

## 種苗生産過程におけるクルマエビの 急性ウイルス血症 (PAV) の防除対策

佐藤 純<sup>\*1</sup>・虫明 敬一<sup>\*1</sup>・森 広一郎<sup>\*2</sup>・有元 操<sup>\*2</sup>・今泉圭之輔<sup>\*3</sup>

### Control of Penaeid Acute Viremia (PAV) in Seed Production of Kuruma Prawn *Penaeus japonicus*

Jun SATOH, Keiichi MUSHIAKE, Koh-ichiro MORI,  
Misao ARIMOTO, and Keinosuke IMAIZUMI

PAV (penaeid acute viremia), the equivalent of white spot syndrome (WSS), has become one of the most serious problems not only in the shrimp farming industry but also in hatchery production in Southeast Asian countries and the Americas. This review article describes control measures for PAV in seed production of kuruma prawn *Penaeus japonicus* undertaken by the Japan Sea-Farming Association (JASFA). The major infection route of the causative virus (PRDV: penaeid rod-shaped DNA virus=WSSV) is considered to be vertical transmission from spawners to larvae/juveniles via eggs in the seed production process. Therefore, in order to inhibit vertical transmission, eggs are selected based on PCR (polymerase chain reaction) detection of PRDV from the receptaculum seminis after spawning. In addition, the fertilized eggs are disinfected with povidone iodine (5 mg/l for 5 min). In order to prevent horizontal transmission, larval and juvenile rearing seawater is treated with UV irradiation. By conducting these measures, the occurrence of PAV in seed production was not observed from 1998 on at JASFA.

2002年12月12日受理

2000年におけるクルマエビ *Penaeus japonicus* の沿岸漁業での漁獲量は1,447トン、養殖漁業においても2,086トンの生産量であり、その生産額はそれぞれ59.8億円および104.7億円に達し<sup>1)</sup>、我が国の沿岸漁業資源および養殖漁業の対象種として重要な位置を占めている。一方、本種の種苗生産技術は1960年代に確立され、2000年には国内における放流用クルマエビの生産尾数は約2億9,000万尾（平均全長18mm）に達している<sup>2)</sup>。日本栽培漁業協会（以下日裁協）志布志事業場では1967年から本種の種苗生産に取り組み、その後、関係府県が行うクルマエビ放流事業の支援を目的に2000年まで33年間にわたり、種苗の供給を行ってきた。1975年頃からは1年間に1億尾前後の種苗が生産できるようになったが、1983年の種苗生産過程でバキュロウイルス性中腸腺

壊死症 (baculoviral mid-gut gland necrosis: BMN)<sup>3)</sup>が発生し、種苗生産に多大な支障を来した。この疾病は受精卵の洗浄を行うことにより、発生を抑えられるようになった<sup>4)</sup>。種苗生産過程におけるBMNの発生は終息したものの、1993年にはクルマエビ類の急性ウイルス血症 (penaeid acute viremia: PAV)<sup>5)</sup>が西日本のクルマエビ養殖場で初めて発生した<sup>6)</sup>。クルマエビ種苗生産過程では、1996年に日裁協志布志事業場での生産種苗において、関係県への配付後の種苗放流を目的とした中間育成時にPAVが発症したほか、他の種苗生産機関でも発生し、種苗放流事業の大きな障害となった<sup>7)</sup>。

そこで、日裁協では上浦事業場を中心に大量生産を実施している志布志事業場と協同してクルマエビの種苗生産過程におけるPAVの防除対策を確立することを目的

<sup>\*1</sup> 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 (Japan Sea-Farming Association Goto Station, 122-7, Arakawa, Tamanoura, Minamimatsuura, Nagasaki, 853-0501 Japan).

<sup>\*2</sup> 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.

<sup>\*3</sup> 日本栽培漁業協会志布志事業場 〒899-7101 鹿児島県曾於郡志布志町夏井.

表 1. WSSV/PRDV の自然感染が報告された主な甲殻類

| 和名            | 英名                    | 学名                       | 国名     | 主要文献                                                                                      |
|---------------|-----------------------|--------------------------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| クルマエビ         | Kuruma prawn          | <i>Penaeus japonicus</i> | 日本, 台湾 | 中野ら (1994) <sup>6)</sup> , CHOU <i>et al.</i> (1995) <sup>16)</sup>                       |
| ウシエビ          | Black tiger prawn     | <i>P. monodon</i>        | 台湾, タイ | WONGTEERASUPAYA <i>et al.</i> (1995) <sup>17)</sup>                                       |
| アカオエビ         | Red-tailed prawn      | <i>P. penicillatus</i>   | 台湾     | LO <i>et al.</i> (1996) <sup>24)</sup>                                                    |
| コウライエビ        | Chinese prawn         | <i>P. chinensis</i>      | 中国     | PENG <i>et al.</i> (1995) <sup>21)</sup>                                                  |
| ショウナンエビ       | Indian white shrimp   | <i>P. indicus</i>        | インド    | WONGTEERASUPAYA <i>et al.</i> (1996) <sup>29)</sup>                                       |
| ヨシエビ          | Greasyback shrimp     | <i>Metapenaeus ensis</i> | 日本, 台湾 | MOMOYAMA <i>et al.</i> (1997) <sup>8)</sup> ,<br>WANG <i>et al.</i> (1997) <sup>33)</sup> |
| (ホワイトシュリンプ) * | Northern white shrimp | <i>P. setiferus</i>      | アメリカ   | LIGHTNER <i>et al.</i> (1996) <sup>11)</sup>                                              |

\* 取り引きされる商品名

に技術開発に取り組んだ。ここでは日裁協でこれまでに得られた知見について主に概説する。

## 1. 原因ウイルスと診断方法

PAV は、前述の如く 1993 年に西日本の養殖場で最初に発生が報告された。国内での流行は、中国から輸入したクルマエビを感染源にして周辺の養殖場に水平伝播したと考えられている<sup>6)</sup>。中野ら<sup>6)</sup>によると、罹病エビは行動が不活発になり、食欲が減退し、体色は赤変または褪色等を示すと報告されている。累積死亡率は多くの場合 80% 以上に達し、国内のクルマエビ養殖において例を見ない大きな被害を引き起こした。一方、種苗生産過程においては、クルマエビ<sup>7)</sup>とヨシエビ (*Metapenaeus ensis*)<sup>8)</sup>での報告がある。原因となる病原体は桿状のエンベロープを有する DNA ウィルスで、日本では、当初 RV-PJ (Rod-shaped nuclear virus of *P. japonicus*) と仮称された<sup>9)</sup>。その後、原因ウイルスは PRDV (penaeid rod-shaped DNA virus)<sup>5)</sup>と改名され、その病名は PAV (penaeid acute viremia)<sup>5)</sup>と名付けられた。

海外の症例では OIE (国際獣疫局) によって呼称されている WSS (white spot syndrome) または WSD (white spot disease) が一般的に使用されている<sup>10)</sup>。特徴的な外観症状として頭胸甲に白い斑点が観察されることが知られているが<sup>11)</sup>、健康なクルマエビでもこの斑点が観察される<sup>12)</sup>ことやウシエビでは細菌に感染した個体がこのような症状を呈することも報告されている<sup>13)</sup>。その結果、この白い斑点の形成がこのウィルス病に特有な症状であるとは言い難いことから、日本では、病名としては WSS ではなく PAV と呼称している<sup>14)</sup>。

原因ウイルスの分類学的な位置は、現在、確定していない<sup>15)</sup>。海外ではアジア各地 (中国, 台湾, マレーシア, インド, 韓国, フィリピン) の養殖クルマエビ, ウシエビ, クマエビおよびコウライエビなどでも類似した症状を呈し、WSS として報告されている<sup>16-22)</sup>。また、最近では、米国でも広がりつつあることが報告されている<sup>23)</sup>。

この WSS は、現在のところ我が国における PAV と同一の疾病と考えられており<sup>24, 25)</sup>、これまでに多くのクルマエビ属での自然感染例が報告されている (表 1)。

PAV 罹病エビの血リンパを暗視野顕微鏡下で観察すると約 0.5  $\mu\text{m}$  の多数の微粒子が認められることや、胃上皮層の感染細胞の核は 10~15  $\mu\text{m}$  の円形あるいは楕円形の輪郭明瞭で無構造の白色物体として観察されることで診断できると報告されている<sup>26)</sup>。原因ウイルスの検出には、特異的プライマーを用いて PRDV の遺伝子を検出する PCR 法<sup>25, 27)</sup>が開発され、キャリアの検出や親エビのウィルス検査の手法として用いられている。その他、外国では *in situ* hybridization<sup>28, 29)</sup> やモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体<sup>30)</sup> によるウィルス検出法も報告されている。

著者らは木村ら<sup>27)</sup>の開発した PCR 法を若干改良し、後述する防除対策における PCR 反応時間の短縮化を図った<sup>\*4)</sup>。従来の PCR 法<sup>27)</sup>では、Nested PCR 反応が終了するまでに約 5 時間を要し、この間に産卵水槽ごとに管理している卵の発生が進むことや、種苗生産水槽に収容するまでの間に沈下した卵のふ化率の低下が懸念された。そのため、PCR 法の熱変性、アニーリングおよび伸長の 3 つのステップの反応のうち、アニーリングのステップを省略する 2 ステップ PCR 法 (シャトル PCR 法) により反応時間の短縮を図るとともに、PCR 反応液量を従来の 50  $\mu\text{l}$  から 25  $\mu\text{l}$  にスケールダウンして熱伝導性を高めた。その結果、従来法<sup>27)</sup>と PRDV の検出感度を比較しても全く遜色のない結果が得られるとともに、Nested PCR 終了までの時間を半分の約 2.5 時間に短縮することに成功した。後述する防除対策上の親エビ検査では検査のスピード化が求められるため、このシャトル PCR 法を日裁協では採用している。

現在のところ、種苗生産現場での親エビや種苗からの PRDV の検出には、いずれの機関においても PCR 法が多用されているが、検査技術の熟練および高価な検査機器が必要であり、特に多くの検体を調べなければならない種苗生産現場には、簡便で安価な検査手法の確立が望

\*4 虫明敬一・佐藤 純・森 広一郎・清水 健・加治俊二・有元 操・今泉圭之輔 (1999) 親エビ受精囊検査に基づく PAV の防除対策。平成 11 年度日本魚病学会春期大会講演要旨集, pp. 39.

表 2. 日裁協における PAV 発生状況 (1996 年～2000 年)

| 年    | 親エビの選別 <sup>*1</sup> | 受精卵の消毒                                  | 成功数/実施数 <sup>*2</sup> |
|------|----------------------|-----------------------------------------|-----------------------|
| 1996 | 実施せず                 | 実施せず                                    | 6/14 (42.9%)          |
| 1997 | 産卵前の卵巣卵検査            | ヨード剤 <sup>*3</sup> の使用 (有効ヨウ素濃度 5 mg/l) | 21/23 (91.3%)         |
| 1998 | 産卵後の受精嚢検査            | ヨード剤 <sup>*3</sup> の使用 (有効ヨウ素濃度 5 mg/l) | 11/11 (100%)          |
| 1999 | 産卵後の受精嚢検査            | ヨード剤 <sup>*3</sup> の使用 (有効ヨウ素濃度 5 mg/l) | 16/16 (100%)          |
| 2000 | 産卵後の受精嚢検査            | ヨード剤 <sup>*3</sup> の使用 (有効ヨウ素濃度 5 mg/l) | 20/21 (95.2%)         |

<sup>\*1</sup> Nested-PCR 検出結果に基づく選別

<sup>\*2</sup> 飼育過程において PRDV の検出や PAV の発生もなく成功した生産事例数/実施した生産事例数.

<sup>\*3</sup> 有効ヨウ素濃度 5 mg/l で 5 分間の消毒を行った (紫外線処理海水を使用した).

まれている。また、高感度な検出法であることから、感染性を失った PRDV を検出することも考えられることからその判定は慎重に行い、確定診断を行う場合は病理組織学的検査も必要であろう。

## 2. 種苗生産過程における発生状況

種苗生産に使用する卵を確保するのに必要な雌親エビの養成技術は沖縄県で養殖クルマエビからの大量採卵事例があるものの<sup>\*5</sup>、まだ確立されておらず、採卵用の成熟した親エビはすべて天然海域での漁獲に依存しているのが現状である。そのため、天然親エビが PRDV に感染していれば、種苗生産現場にウイルスを持ち込むことになり、飼育過程における PAV 発生の危険性が高くなる。

ここでは、日裁協における 1996 年から 1997 年のクルマエビの種苗生産過程 (中間育成過程を含む) における PAV の発生状況について述べる (1998～2000 年については 4. 防除対策に記述)。1996 年には、14 回行った飼育事例中 6 回で、中間育成場に配付する前の種苗から PRDV が検出されたことから、その時点で飼育を中止した (表 2)。一方、ポストラバ 20 日齢期 (P20) まで、いずれの発育段階での検査においてもすべて PCR 陰性であった種苗は、配付し各県の中間育成場に輸送した。その際、すべての飼育事例で一部の種苗を志布志事業場に残留して継続飼育したところ、P29 と P51 で PCR 陽性と判定された事例がみられた。これと合致するように、この同一群は配付後のすべての中間育成場において PAV が発生した。中間育成場では、輸送の翌日から 18 日後の P27～P55 の発育段階種苗で PAV が発生し、瀕死の個体は体色の赤変、褪色および体表 (外骨格) に白斑を呈し、約 10 日間の累積死亡率は 50～100% に達した。これらの種苗生産用に採卵した親エビの胃上皮について、種苗生産終了後に保存していた冷凍サンプルから PCR 法で PRDV の検出を行った結果、7 月下旬以降に搬入した親エビから PRDV が検出され、種苗の PRDV 検出結果と PAV の発症の結果が良く一致した<sup>7)</sup>。なお、一部では親エビが PCR 陰性にも関わらず、種苗で PCR 陽性となるケースがあり、親エビの検査部位として胃上皮は不適当

であると考えられた。この点については次項で詳しく述べる。

一方、1997 年には 4 月および 5 月に搬入した親エビの卵巣から PRDV が検出されたものの、これらの PCR 陽性個体を排除し陰性個体のみから得られた卵を種苗生産に用いた結果、種苗生産の成功事例は 23 事例中 21 事例 (91.3%) になり、ある程度の防除効果を確認できた (表 2)。このように、PRDV 陽性親エビ由来の種苗からの PRDV の検出および PAV の発生、また PRDV 陽性の親エビを排除した種苗生産での成功率の上昇から、種苗生産過程における PRDV の主たる感染経路は親エビからの垂直伝播と考えられた<sup>7)</sup>。

## 3. 天然クルマエビからの PRDV 検出

種苗生産過程での PAV 防除対策に関する技術開発を進めるにあたり、まず、天然親エビの PRDV 保有状況を調査した。1996 年 7 月から 1998 年 4 月までに九州および四国の各沿岸ならびに本州中部太平洋沿岸で漁獲された天然親エビ合計 1,269 尾 (雌 955, 雄 314) について、木村ら<sup>27)</sup>の報告した Nested PCR 法によりウイルス保有状況を調査した。

その結果、雌では検査した 955 尾中 96 尾、雄では 314 尾中 21 尾から PRDV が検出された<sup>31)</sup>。PRDV の部位別検出率は、雌では [卵巣卵 (10.1%)] > [胃上皮 (7.3%)] > [血リンパ (5.8%)] の順に高い値を示した。この天然親エビにおける PRDV の保有調査により、広い海域にウイルスを保有する個体が存在することが明らかとなるとともに、雌の生殖腺からの検出率が最も高かった。図 1 には、1996 年から 2000 年に九州東部の市場に水揚げされた雌の天然クルマエビにおける PRDV 検出率の季節的変動を示した。PRDV の検出率は、夏期 (7 月から 8 月) に漁獲される親エビで高まる傾向がみられた。それとは反対に 4 月から 6 月にかけて漁獲される雌親エビでは PRDV の検出率が低い傾向がみられた。

天然海域から採捕された個体から PRDV あるいは WSSV (white spot syndrome virus) が検出されることはウシエビ<sup>32)</sup>やヨシエビ<sup>33)</sup>でも報告されている。ウシエビ

<sup>\*5</sup> 玉城英信・当真 武 (2002) 養殖クルマエビの産卵. 平成 14 年度日本水産学会大会講演要旨集, pp. 102.

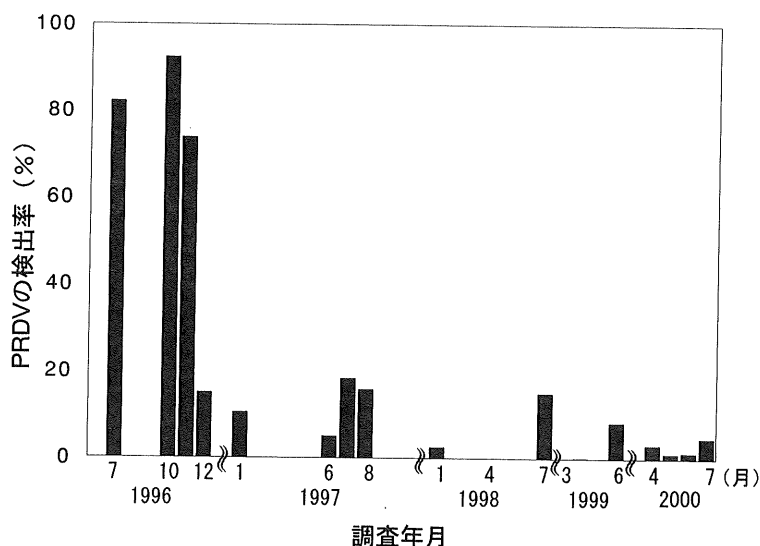


図1. 九州沿岸域の天然雌クルマエビにおける PRDV 検出率の季節的変動

では産卵期である夏から秋に漁獲されるエビの方が冬に漁獲されるエビより検出率が高くなることが報告されている。この現象は日本のクルマエビと同様であり、多回産卵がストレスナーとなって、親エビに不顕性感染している PRDV の増殖を夏期に誘発すると考えられている<sup>34)</sup>。このような検出率に季節的な変動が起こる現象から、クルマエビの種苗生産においては、PRDV の感染率が比較的低い4月から6月に漁獲される親エビから得られた卵を種苗生産に用いることも PAV の防除対策の一つとして有効と考えられる<sup>31)</sup>。

また、1997年から1999年の3年間に於いて、親エビの産卵前後の卵巣および受精嚢（交尾により雄から獲得した精子を貯蔵しておく小嚢）からの PRDV 検出率を比較すると、産卵前の卵巣からの PRDV 検出率は1997年が0.9%で、1998年と1999年は0%であった（図2）。しかし、産卵後の卵巣からの検出率は4.7%（1997年）、0.5%（1998年）および1.9%（1999年）であった。一方、受精嚢における産卵前の検出率は、5.6%（1997年）、0%（1998年）および2.1%（1999年）であったが、産卵後にはそれぞれ33.5%、6.3%および10.9%になった。このように、卵巣および受精嚢のいずれも産卵前より産卵後の方が PRDV 検出率が高く、また、産卵後の検出率は卵巣より受精嚢の方が著しく高くなった<sup>34)</sup>。この現象の詳細は不明であるが、MUSHIAKE *et al.*<sup>34)</sup>は産卵行動やハンドリングに伴うストレスの影響、あるいは産卵によって放精が行われ受精嚢中の精包の精子数が減少し、PCR反応に用いる鋳型 DNA の抽出精度が向上するためと推測している。なお、受精嚢から検出される PRDV が元々雄由来なのか、あるいは雌由来なのかについては現在のところ不明である。

表2に示すように、1998年以降の日裁協におけるクルマエビの種苗生産成功率（種苗からの PRDV 検出と PAV の発症がない事例/種苗生産実施数×100）は

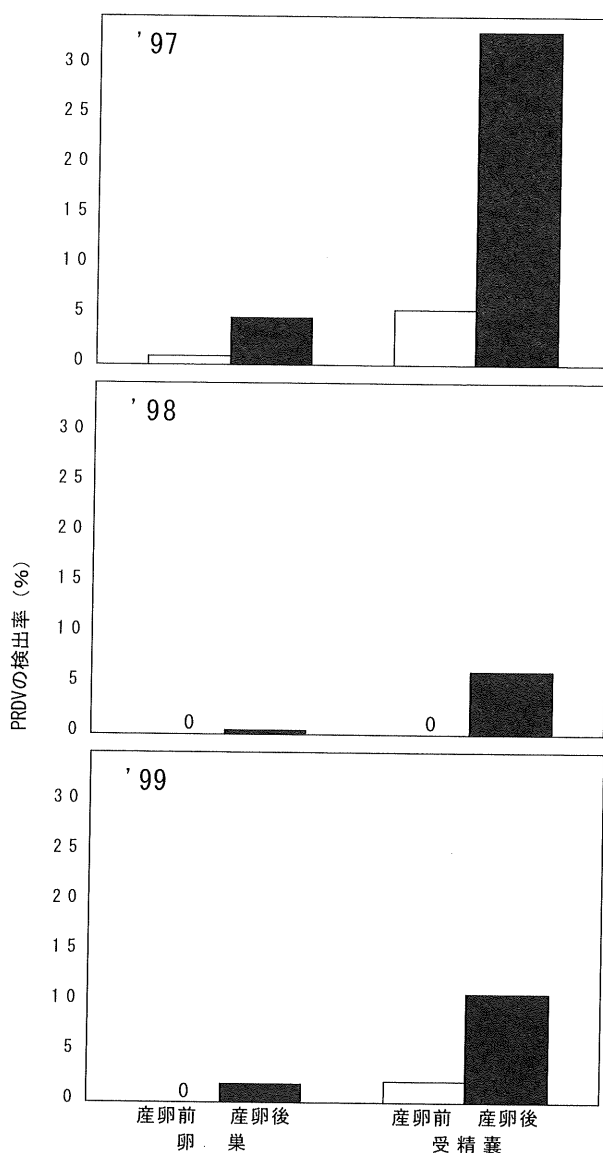


図2. 産卵前後における卵巣および受精嚢からの PRDV の検出

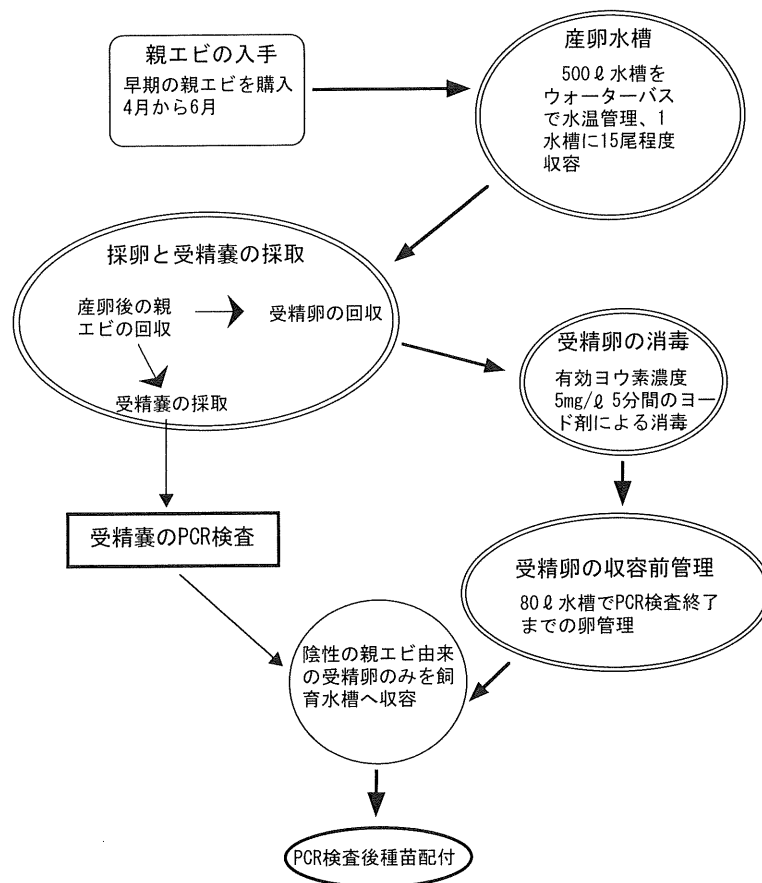


図3. PAV 防除対策の概要

97.9% となった。これは、次項で述べるような防除対策を講じ、天然親エビから種苗生産現場へのウイルスの持ち込みを未然に防ぐことができたようになったためである。

#### 4. 防 除 対 策

##### 1) 垂直伝播の防除対策

(1) 親エビからの PRDV 検出に基づく選別 前述したように、種苗生産過程での PAV の発生状況から、PRDV の感染経路として垂直伝播が強く示唆され、天然親エビのウイルス検査から雌の卵巣、胃上皮、血リンパ、受精囊から高率に PRDV が検出された。種苗生産過程における PAV 防除対策の確立をめざす上で、これらの結果を考慮して、はじめに産卵前の親エビ卵巣のウイルス検査を行い、その結果から陽性親エビを排除し、陰性親エビのみを産卵に供することを考えた。しかし、夏期に搬入した親エビから得られた卵を用いた種苗生産では PAV が発生し、この方法では防除対策として不十分と考えられた。

一方、前述した通り天然親エビのウイルス検査におい

て、産卵後の受精囊で PRDV が高率に検出されることが判明した<sup>34)</sup>。そこで、産卵後の親エビ受精囊を検査し、陰性と判定された親エビ由来の卵のみを選別して種苗生産を行った。その結果、表2に示すように1998年から2000年までのクルマエビ種苗生産の成功率は97.9%になった。この間に行った48事例の種苗生産中47事例で全くPAVの発生は認められなかった。したがって、親エビの受精囊検査に基づく卵選別と次項目で述べる卵消毒とを組み合わせた方法は、種苗生産過程におけるクルマエビのPAV防除対策として有効であると考えられた(図3)。

しかし、48事例中わずか1例で種苗からPRDVが検出され、PAVの発生には至らなかったものの、種苗生産を中止せざるを得ない事例があった。この原因について考えてみると、その後の親エビの検査により8月に漁獲された同一親魚群の陽性率が60%(40個体を検査)に達した事例では、産卵後の受精囊はPCR陰性であったが、卵巣がPCR陽性の個体が含まれていた<sup>\*6)</sup>。すなわち、陽性率が上昇する夏期においては産卵後の受精囊検査結果だけにに基づく卵の選別では、PRDVに感染した親エビを見逃す可能性もあることを示唆している。これを解決す

\*6 虫明ら未発表。

るためには、産卵後の親エビ受精囊と卵巣の両方を検査して、いずれも PCR 陰性の親エビが産卵した卵を種苗生産に供する必要がある。しかし、現実的にはこの両サンプルを検査するためには検査費用が高くなることと検査に長時間を要するため、受精卵の卵管理時間が長引き、ふ化率を低下させる懸念もある。このような観点から、できる限り親エビの PCR 陽性率が低い 4 月から 6 月の比較的早い時期に漁獲される親エビを用いることが PAV 防除対策として重要である。

虫明ら<sup>\*7</sup>は親エビの受精囊における PRDV の存在量と種苗生産過程における PAV の発生との間には関連性があることを報告している。これは、受精囊検査において PRDV の存在量が少なければ、PCR 陽性の親エビ由来の卵を飼育に供しても、必ずしも種苗生産過程で PAV が発生するとは限らないことを意味している。PRDV の存在量を把握することは PAV 発生の危険性を予測する上で有効と考えられる。この知見は、クルマエビ生体防御機構との関連性からも興味深い結果である。しかし、種苗生産過程で PAV が発生しないレベルの PRDV 量とはいえ、種苗生産現場に微量の PRDV を持ち込む危険性があることや種苗生産の方法によってはウイルスを増殖させてしまう懸念もあるため、現場における対策としては、やはり PCR 陰性の親エビ由来の卵のみを種苗生産に用いるべきであろう。

(2) 受精卵の消毒 PRDV がクルマエビ受精卵内に侵入するのか、単に表面に付着しているだけなのかについては明らかではない。また、受精卵の消毒に関しても、今のところ効果を厳密に確認した例は報告されていない。台湾におけるウシエビの WSSV では興味深い報告がある。WSSV が卵巣卵内に存在すると卵の発育が阻害されて、垂直伝播が起こらないとされている。しかし、この場合でも、卵およびふ化幼生については洗浄または消毒を実施することが有効な垂直伝播の防除になるとしている<sup>32)</sup>。しかし、クルマエビの場合、ふ化幼生をヨード剤を用いて消毒すると生残に大きく影響したり、ふ化幼生の形態異常をもたらすことから<sup>\*8</sup>、日裁協では、受精卵の卵表面に存在するウイルスを不活化することを目的として、1997 年以降ヨード剤による消毒を行っている。すなわち、得られた受精卵は、紫外線殺菌処理海水で洗浄し、夾雑物を除いた後、紫外線処理海水にヨード剤を有効ヨウ素濃度 5 mg/l になるように加えて 5 分間の消毒を行う（消毒を行う時の卵の発育段階は、胚に環状帯

が出現した段階（受精約 5 時間後）以降である）。なお、PRDV の不活化には、有効ヨウ素 2.5 mg/l で 10 分間の消毒が有効と報告されているが<sup>37)</sup>、実際にこの条件で卵消毒を行うと、ふ化率は 48.3% と大きく低下する（対照区 99.7%）ことがわかった。そのため、ふ化に影響が少ない有効ヨウ素 5 mg/l で 5 分間の消毒で行っている（ふ化率 94.1%）。なお、この条件での PRDV の不活化効果は確認していない。その他、受精卵への物理的なダメージの軽減を図ることや素早く洗浄を行うためにシャワー状に海水がかかるような工夫も必要である。

PAV 防除対策における採卵方法では、産卵水槽（500 l ポリエチレン水槽）ごとに受精卵の回収と卵管理（小型の水槽 75~500 l）を行っている。すなわち、親エビの産卵水槽ごとに夾雑物を取り除きながら採卵し、前述の方法によるヨード剤による卵消毒を行った。PCR 法による産卵後の親エビ検査が終了するまで小型の水槽中で通気を施しながら卵管理をした（図 3）。

## 2) 水平伝播の防除対策

種苗生産過程における PAV の発生には、PRDV の親エビからの垂直伝播のほかに、水平伝播も重要な要因の一つと考えられる。養殖場間の水平伝播は用水が強く関与していることが疑われている<sup>37)</sup>。PRDV は  $5 \times 10^3 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$  の紫外線照射で大部分が不活化されるため紫外線による殺菌処理によってウイルスフリーの用水の確保が可能であると考えられており<sup>37)</sup>、日裁協志布志事業場では  $3 \times 10^4 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$  の照射量でろ過海水を殺菌処理して飼育用水とした。また、実験感染による死亡個体では目、遊泳脚、歩脚にウイルスが存在することが確認されている<sup>37, 38)</sup>。従って、感染個体の組織を経口から摂取、すなわち共食いすることで水平感染が引き起こされる可能性が十分に考えられる。実験的にも、感染エビとの同居による健康エビへの水平伝播が確認されており、特に高密度の飼育環境下では、共食いや飼育水を媒介とした水平感染が容易に成り立つことが報告されている<sup>14)</sup>。したがって、予防措置として極端な高密度飼育を避け飼育環境に配慮する必要がある。

また、クルマエビの種苗生産には、生物餌料の投与に引き続き配合飼料を与える場合がほとんどであるが、その配合飼料の材料の一部として用いられるエビガラミールから PRDV 遺伝子が検出されたことがある。これを用いた感染試験の結果、クルマエビに対する感染性は認められなかった<sup>\*9, \*10</sup>。しかし、水産庁から提示された当

\*<sup>7</sup> 虫明敬一・清水 健・森 広一郎・有元 操・佐藤 純 (1999) 親エビ受精囊の PRDV の存在量と PAV 発生との関係. 平成 11 年度日本魚病学会春季大会講演要旨集, pp. 20.

\*<sup>8</sup> 虫明ら未発表.

\*<sup>9</sup> 虫明敬一・森 広一郎・有元 操・佐藤 純・今泉圭之輔 (1999) クルマエビ種苗生産における PAV 防除対策の現状. 平成 10 年度日本魚病学会春期大会講演要旨集, pp. 1.

\*<sup>10</sup> 山下浩史・河野芳巳 (1999) PCR 法による PRDV 陽性の飼料を用いたクルマエビ (*Penaeus japonicus*) 攻撃試験. 平成 10 年度日本魚病学会春季大会講演要旨集, pp. 3.

表 3. PRDV (WSSV) の不活化条件

| 項目            | 条件                                                  | 参考文献                                      |
|---------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 熱             | 60℃では1分間以上, 50℃では1時間以上                              | 中野ら (1998) <sup>37)</sup>                 |
| 乾燥            | 3時間以上 (26℃)                                         | MAEDA <i>et al.</i> (1998) <sup>41)</sup> |
| 食塩            | 25% 食塩水で24時間以上                                      | 中野ら (1998) <sup>37)</sup>                 |
| 紫外線           | 100,000 $\mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$ 以上 | 中野ら (1998) <sup>37)</sup>                 |
| オゾン           | 0.62 mg/l 1分間以上                                     | 中野ら (1998) <sup>37)</sup>                 |
| 次亜塩素酸ナトリウム    | 有効塩素 1 mg/l 10分間以上                                  | 中野ら (1998) <sup>37)</sup>                 |
| ヨード剤          | 有効ヨウ素 2.5 mg/l 10分間以上                               | 中野ら (1998) <sup>37)</sup>                 |
| 逆性石鹼          | 塩化トリメチルアンモニウムメチレン 25 mg/l 10分間以上                    | 中野ら (1998) <sup>37)</sup>                 |
| エチルアルコール      | 30% で1分間以上                                          | 中野ら (1998) <sup>37)</sup>                 |
| ホルマリン         | 5 g/l で10分間以上                                       | 中野ら (1998) <sup>37)</sup>                 |
| pH 3          | 60分間以上 (25℃)                                        | CHANG <i>et al.</i> (1998) <sup>40)</sup> |
| pH 12         | 10分間以上 (25℃)                                        | CHANG <i>et al.</i> (1998) <sup>40)</sup> |
| 海水中での感染力の維持期間 | 15日間 (25℃)                                          | MAEDA <i>et al.</i> (1998) <sup>41)</sup> |

面の PAV 防除対策での取り決め<sup>\*11)</sup>では、PCR 法により陽性と判定された種苗は PAV の蔓延を防止するために全て焼却処分することとなっている。そのため、配合飼料がクルマエビ体内に残っている状態でウイルス検出を行うと擬陽性の結果をもたらす、誤った診断結果を得るとともに健全な種苗も焼却処分してしまう可能性もある。そこで、日裁協では、配合飼料を給餌している期間に PCR 検査を行う場合は、検査個体群の一部を別水槽に移して、12時間以上絶食させてから、検査に供するようにした。このことにより、健全種苗の擬陽性はなくなり、誤診を防ぐことができるようになった。

クルマエビの感染個体の死亡による水平的な広がりを実験的飼育環境で実証されており、その他の環境生物からのウイルスの持ち込みの可能性も報告されている<sup>37)</sup>。そのため、種苗生産を開始する前の施設の十分な殺菌消毒も重要な防除対策になる<sup>37)</sup>。これらも加味し、日頃の飼育環境の清浄化に努め、衛生的な環境を維持することが最も基本的な防除対策である。

また、飼育水槽間の器具の共用の禁止、飼育水槽間のエアレーションなどによる飛沫感染の防止等にも注意を払う必要がある。これらの水槽や使用器具については、PRDV (WSSV) に有効な不活化効果のある薬剤が報告されているので<sup>37, 40, 41)</sup>、用途に見合った消毒剤を使用すれば容易に消毒は可能である (表 3)。

## 5. おわりに

産卵後の親エビの受精囊からの PRDV 検出に基づく陰性親エビ由来の受精卵の選別とヨード剤を用いた卵消毒とを組み合わせた方法は、種苗生産過程における PAV 防除対策に有効な方法であることが判明した。しかし、シーズン中にすでに産卵を繰り返している可能性

がある夏期に漁獲される親エビにおいて PRDV の検出率の上昇がみられる傾向があることから、親エビで陽性率が上昇した際には必要な受精卵数を確保できず種苗生産が困難になるケースも考えられる。そのためには、前述した早い時期 (4~6月) に漁獲される親エビから採卵を行うことが防除対策の一つと考えられる。

中南米における *Penaeus vannamei* などの養殖業では IHNV (伝染性皮下造血管壊死症) や TS (タウラ症候群) 等のウイルス病対策として SPR (specific pathogen resistant) 種苗の導入が報告されている<sup>42)</sup>。しかし、放流用種苗の生産において親エビは遺伝的多様性も考慮に入れる必要があることから、放流海域から得られたものが妥当である。そうすることにより、その海域に起こり得る疾病の生き残りを親として使用する可能性が高くなる<sup>43)</sup>。このことは、ある病原体を保有していないだけでなくその病気に対して抵抗性を有していることが保証されることにもなる<sup>43)</sup>。病原体を保有していないかもしくは抵抗性を持つ親から病原体フリーの放流種苗を得ることが可能となれば、自然界での病原体の存在量を下げることにつながるかもしれない。さらに、親エビの入手を確実にするためにも、このような天然親エビから得られた種苗からの採卵用親エビの養成技術の開発が強く望まれ、ウイルスフリーの親エビ養成技術が確立されれば、垂直伝播を防除するための最も大きな対策となり得ると考えられる。そして、本稿で述べた対策を総合的に講じることにより、PAV 防除を図ることができると言っても過言ではない。最後に、種苗放流を目的とした種苗生産において疾病防除対策を講じることは、種苗放流による天然海域への病原体の拡散を未然に防ぐ最良の策であると考えられ、責任ある栽培漁業を推進するためにも当然の責務である。

<sup>\*11)</sup> 水産庁振興部開発課・研究部研究課・養殖研究所・日本栽培漁業協会 (1996): 種苗生産期におけるくるまえば RV-PJ 感染症の当面の防除対策について (種苗生産期におけるクルマエビ RV-PJ 感染症の防除対策に関する担当者会議資料), pp. 8-26.

## 謝 辞

本稿を御校閲頂くと共に、共同研究を推進する上で数々の有益な御助言を賜った広島大学生物生産学部室賀清邦教授に深謝いたします。また、本稿を取りまとめる機会を与えていただいた日本栽培漁業協会古澤 徹常務理事、松永 繁技術参事ならびに水田洋之介技術部長に感謝いたします。さらに、種苗生産現場で早朝から深夜まで、時には炎天下での作業、毎回 100 検体を越える検査業務等に御協力を頂きました古満目事業場の今泉 均主任技術員、上浦事業場の西岡豊弘主任技術員、榎谷恵子さん、吉岡康美さん、山路郁子さん並びに上甲美保さん、志布志事業場の加治俊二主任技術員、西 明文技術員、山元栄一技能職員、萩原ひとみさんと東田香織さんに心よりお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 農林水産省統計情報部 (2002) 平成 12 年漁業・養殖業生産統計年報. 324 pp.
- 2) 水産庁・日本栽培漁業協会 (2002) 平成 12 年度栽培漁業種苗生産、入手・放流実績 (全国). pp. 55.
- 3) SANO, T., T. NISHIMURA, K. OGAWA, K. MOMOYAMA and N. TAKENO (1981) Baculovirus infection of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* in Japan. *Fish Pathol.*, **15**, 185-191.
- 4) 桃山和夫 (1991) クルマエビ稚仔のバキュロウイルス性中腸腺壊死症 (BMN) に関する研究. 山口県内海水産試験場研究報告, No. 20, 1-91.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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) クルマエビ種苗生産過程における PAV の発生状況. 魚病研究, **34**, 33-38.
- 8) MOMOYAMA, K., M. HIRAOKA, K. INOUE, T. KIMURA, H. NAKANO and M. YASUI (1997) Mass mortalities in the production of juvenile greasyback shrimp, *Metapenaeus ensis*, caused by penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathol.*, **32**, 51-58.
- 9) 井上 潔・三輪 理・大迫典久・中野平二・木村武志・桃山和夫・平岡三登里 (1994) 1993 年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死: 電顕観察による原因ウイルスの検出. 魚病研究, **29**, 149-158.
- 10) MUROGA, K. (2001) Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japan hatcheries. *Aquaculture*, **202**, 23-44.
- 11) LIGHTNER, D. V. (1996) A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Special publication of the World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- 12) 桃山和夫・平岡三登里・中野平二・河邊 博・井上 潔・大迫典久 (1994) 1993 年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死: 病理組織観察. 魚病研究, **29**, 141-148.
- 13) WANG, Y. G., K. L. LEE, N. NAJIAH, M. SHARIFF and M. D. HASSAN (2000) A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, 9-18.
- 14) WU, J. L., A. NAMIKOSHI, T. NISHIZAWA, K. MUSHIAKE, K. TERUYA and K. MUROGA (2001) Effect of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 129-135.
- 15) VAN HULTEN M. C. W., M. F. TSAI, C. A. SCHIPPER, C. F. LO, G. H. KOU and J. M. VLAK (2000) Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. *J. Gen. Virol.*, **81**, 307-316.
- 16) 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 Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **23**, 165-173.
- 17) WONGTEERASUPAYA, C., J. E. VICKERS, S. SRIURAIRATANANA, 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.
- 18) WANG, Y. G., M. D. HASSAN, M. SHARIFF, S. M. ZAMRI and X. CHEN (1999) Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. *Dis. Aquat. Org.*, **39**, 1-11.
- 19) MOHAN, C. V., K. M. SHANKER, S. KULKARNI and P. M. SUDHA (1998) Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. *Dis. Aquat. Org.*, **34**, 9-12.
- 20) PARK, J. H., Y. S. LEE and Y. LEE (1998) An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. *Dis. Aquat. Org.*, **34**, 71-75.
- 21) PENG, B., J. REN, J. SHEN, G. ZHOU, H. GU, Y. SHEN, G. ZHENG and Z. GONG (1995) The studies on baculovirus-caused disease of prawns (*Penaeus chinensis*) in Shanghai suburb. *Chinese J. Virol.*, **11**, 151-157.
- 22) MAGBANUA, F. O., K. T. NATIVIDAD, V. P. MIGO, C. G. ALFAFARA, F. O. PENA, R. O. MIRANDA, J. D. ALBALADEJO, E. C. B. NADALA JR, P. C. LOH and L. M. TAPAY. (2000) White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 77-82.
- 23) NUNAN, L. M., B. T. POULOS and D. V. LIGHTNER (1998) The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*, **160**, 19-30.

- 24) 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.
- 25) TAKAHASHI, Y., T. ITAMI, M. MAEDA, N. SUZUKI, J. KASORNCHANDRA, K. SUPAMATTAYA, R. KHONGPRADIT, S. BOONYARATPALIN, M. KONDO, K. KAWAI, R. KUSUDA, I. HIRANO 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.
- 26) MOMOYAMA, K., M. HIRAOKA, K. INOUE, T. KIMURA and H. NAKANO (1995) Diagnostic techniques of rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, **30**, 263-269.
- 27) 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.
- 28) DURAND, S., D. V. LIGHTNER, L. M. NUNAN, R. M. REDMAN, J. MARI and J. R. BONAMI (1996) Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) for penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 59-66.
- 29) WONGTEERASUPAYA, C., S. WONGWISANSRI, V. BOONSANG, S. PANYIM, P. PRATANPIPAT, G. L. NASH, B. WITTHACHUMNARNKUL and T. W. FLEGEL (1996) DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOB II gives positive *in situ* hybridization with white-spot viral infection in six penaeid shrimp species. *Aquaculture*, **143**, 23-32.
- 30) ZHAN, W. Z., Y. H. WANG, J. L. FRYER, K. OKUBO, H. FUKUDA, K. K. YU and Q. X. MENG (1999) Production of monoclonal antibodies (Mabs) against white spot syndrome virus (WSSV). *J. Aquat. Anim. Health.*, **11**, 17-22.
- 31) 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.
- 32) LO, C. F., C. H. HO, C. H. CHEN, K. F. LIU, Y. L. CHIU, P. Y. YEH, S. E. PENG, H. C. HSU, H. C. LIU, C. F. CHANG, M. S. SU, C. H. WANG and G. H. KOU (1997) Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 53-72.
- 33) WANG, C. S., Y. J. TSAI, G. H. KOU and S. N. CHEN (1997) Detection of white spot disease virus infection in wild caught greasy back shrimp, *Metapenaeus ensis* (de Haan) in Taiwan. *Fish Pathol.*, **32**, 35-41.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) LO, C. F. and G. H. KOU (1998) Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: A review. *Fish Pathol.*, **33**, 365-371.
- 37) 中野平二・平岡三登里・鮫島 守・木村武志・桃山和夫 (1998) クルマエビ類の急性ウイルス血症 (PAV) の原因ウイルス PRDV の不活化条件. 魚病研究, **33**, 65-71.
- 38) CHOU, H. Y., C. Y. HUANG, C. F. LO and G. H. KOU (1998) Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. *Aquaculture*, **164**, 263-276.
- 39) CHANG, P. S., C. F. LO, Y. C. WANG and G. H. KOU (1996) Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in shrimp, *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 131-139.
- 40) CHANG, P. S., L. J. CHEN and Y. C. WANG (1998) The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. *Aquaculture*, **166**, 1-17.
- 41) MAEDA, M., J. KASORNCHANDRA, T. ITAMI, N. SUZUKI, O. HENNING, M. KONDO, J. D. ALBALADEJO and Y. TAKAHASHI (1998) Effect of various treatment on white spot syndrome virus (WSSV) from *Penaeus japonicus* (Japan) and *P. monodon* (Thailand). *Fish Pathol.*, **33**, 381-387.
- 42) LIGHTNER, D. V. and R. M. REDMAN (1998) Strategies for the control of viral disease of shrimp in the Americas. *Fish Pathol.*, **33**, 165-180.
- 43) 室賀清邦 (2000) 疾病防除の面から見た放流用種苗生産のあり方 (総説). 栽培技研, **28**, 39-45.