

## PCR法による種苗生産用親ヨシエビからのクルマエビ急性ウイルス血症ウイルス検出法の検討

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: 山根, 史裕, 西岡, 豊弘, 瀬古, 慶子, 徳澤, 秀渡 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014593">https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014593</a>

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



# PCR 法による種苗生産用親ヨシエビからの クルマエビ急性ウイルス血症ウイルス検出法の検討

山根 史裕\*<sup>1</sup>・西岡 豊弘\*<sup>2</sup>・瀬古 慶子\*<sup>3</sup>・徳澤 秀渡\*<sup>1</sup>

## Retention of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) in Broodstock of the Greasy Back Shrimp, *Metapenaeus ensis*

Fumihiko YAMANE, Toyohiro NISHIOKA, Keiko SEKO, and Hideto TOKUZAWA

To control PAV (penaeid acute viremia) in seed production of greasy back shrimp, *Metapenaeus ensis*, we investigated the retention of PRDV (penaeid rod-shaped DNA virus) in broodstock used for seed production. We detected viral genes at ratios of more than 20 % in the thelycum of spawners but none in the thelycum of wild adult greasy back shrimps. These results suggest that some wild adult shrimps already have PRDV, and viruses may infect larvae from spawners via eggs. To control PAV, it should be effective to select eggs on the basis of PCR (polymerase chain reaction) analysis of the thelycum after spawning for seed production.

2007年7月10日受理

ヨシエビ *Metapenaeus ensis* は、エビ類においてはクルマエビ *Penaeus japonicus* に次ぐ重要な栽培漁業対象種であり、2005年には約3,000万尾の種苗が西日本を中心に放流されている<sup>1)</sup>。三重県の伊勢湾では、クルマエビの漁獲量の減少に対応して種苗放流による資源増大に取り組んできたが、1976年に97トンであった漁獲量が<sup>2)</sup>、1999年には7トンにまで減少し<sup>3)</sup>、目立った効果が得られなかった。そのため、1999年からヨシエビの栽培漁業技術開発に着手した。しかし、近年、エビ類の種苗生産や中間育成過程において、クルマエビ類の急性ウイルス血症 (penaeid acute viremia : PAV)<sup>4)</sup> が発生し、健全な種苗の確保が困難となっており、栽培漁業を推進する上で大きな障害となっている<sup>5)</sup>。クルマエビの種苗生産過程における本病の発生は、主に採卵用の親エビから原因ウイルス PRDV (penaeid rod-shaped DNA virus)<sup>4)</sup> が垂直感染することによると推定されており、防除対策として PCR 法による親エビのウイルス保有検査結果に基づく選別、ヨード剤による受精卵の消毒が有効であると報

告されている<sup>6)</sup>。一方、ヨシエビは本ウイルスに対して高い感受性を有し<sup>7)</sup>、日本沿岸で漁獲された天然のヨシエビから本ウイルスが検出されること<sup>8)</sup>、種苗生産過程で PAV の発生により大量死亡すること<sup>9)</sup> が報告されており、ヨシエビの種苗生産においても、クルマエビと同様に PAV の防除法を確立することが、安定した種苗生産のために必要不可欠である。そこで我々は、ヨシエビの種苗生産における PAV 防除法を確立するための一手段として、種苗生産に用いる親エビのウイルス保有の有無を確認するための PCR 検査に適した部位や採取時期の検討を行い、併せて漁獲海域の異なるヨシエビ成体および種苗生産用親エビの PRDV 保有状況を調査したので報告する。

### 材料と方法

親ヨシエビの PRDV 保有 PCR 検査に適した部位および採取時期の検討には、2005年7月6日に三重県伊勢

\*<sup>1</sup> 財団法人三重県水産振興事業団 三重県栽培漁業センター 〒517-0404 三重県志摩市浜島町浜島 3564-1 (Mie Prefectural Fish Farming Center, 3564-1, Hamajima, Shima, Mie 517-0404, Japan)

\*<sup>2</sup> 独立行政法人水産総合研究センター 養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南勢町中津浜浦 422-1

\*<sup>3</sup> 財団法人三重県水産振興事業団 三重県尾鷲栽培漁業センター 〒519-3922 尾鷲市古江町二ノ前 811-1

湾で小型底曳き網により漁獲された天然雌ヨシエビ成体を使用した。水揚げされたヨシエビから、肉眼による卵影観察法<sup>10)</sup>により成熟した雌ヨシエビ62尾を選別し、うなぎ袋を入れた発泡スチロール(20ℓ: 34.5 cm × 27.5 cm × 深さ 21.5 cm) 3箱に、水量を10ℓとして収容した(20~21尾/箱)。うなぎ袋には酸素を封入し、水温を18℃にして、約3時間かけて三重県栽培漁業センター(以下当センター)まで輸送した。搬入した親エビのうち30尾は、産卵供試前のサンプルとして-30℃で凍結し、ウイルス検査に供するまでそのまま保存した。残りの32尾は、0.5 kℓ 黒色ポリエチレン水槽3面(水量0.5 kℓ)に10~12尾ずつ収容し、水温25℃の止水状態で一晚産卵試験に供した後、翌朝取り上げ、卵影の肉眼観察により、産卵状況を完全産卵、一部産卵および未産卵に区分した。親ヨシエビからPRDVを効率的に検出する部位を検討するため、産卵試験の前後に、血リンパ、卵巣、第5歩脚の指節、生殖器、中腸腺、胃の上皮および第一遊泳脚を個体別に採材し、PCR法によるウイルス検査に供した。

漁獲海域の異なるヨシエビ成体のPRDV保有状況調査には、2005年の産卵期に、伊勢湾(7月6日, 21日, 31日)、高知県の土佐湾(6月15日)、瀬戸内海の播磨灘(6月26日)で底曳き網または小型定置網により漁獲された雄125尾と雌145尾の合計270尾を使用した。雄の生物学的最小形は頭胸甲長で24mm程度とされており<sup>11)</sup>、この値から安部ら<sup>12)</sup>の頭胸甲長と体長および全長と体長の関係式より得られた全長11.3 cm以上を成体とした。雌は目視により卵巣が確認できる個体を成体とした。選別した個体は水揚げ後直ちに-30℃で冷凍し、ウイルス検査に供するまで保存した。検査部位は、雌雄共に生殖器とした。

表1. 産卵供試前後における天然雌ヨシエビの組織別のPRDV検出結果

産卵供試	尾数(尾)	平均全長±標準偏差(cm)	平均体重±標準偏差(g)	nested PCR検査(%)						
				血リンパ	卵巣	第5歩脚	生殖器	中腸腺	胃	遊泳脚
無	30	14.4±1.0	26.0±5.0	0/30 <sup>*2</sup> (0)	0/30 (0)	0/30 (0)	0/30 (0)	0/30 (0)	0/30 (0)	0/30 (0)
有	32 <sup>*1</sup>	14.8±0.5	27.9±3.4	0/32 (0)	0/32 (0)	0/32 (0)	6/32 (18.8)	0/32 (0)	0/32 (0)	0/32 (0)

\*1 完全産卵個体14尾、一部産卵個体8尾、未産卵個体10尾

\*2 PCR陽性数/検査数

表2. 異なる海域で漁獲された天然ヨシエビ成体の大きさと生殖器を用いたPCR法によるPRDV検出結果

漁獲海域	月日	性別	尾数	平均全長±標準偏差(cm)	平均体重±標準偏差(g)	PCR結果(陽性数/検査数)
土佐湾	6.15	♂	30	12.7±0.9	15.7±4.2	0/30
		♀	30	14.6±1.0	27.4±5.5	0/30
播磨灘	6.26	♀	30	14.2±0.9	24.8±4.7	0/30
		♂	30	12.3±0.5	15.4±1.5	0/30
伊勢湾	7.6	♀	30	14.4±1.0	26.0±5.0	0/30
		♂	35	12.2±0.7	13.7±1.8	0/35
	7.21	♀	25	14.6±1.0	26.3±4.4	0/25
		♂	30	13.1±0.7	15.7±1.7	0/30
7.31	♀	30	15.4±0.8	28.1±3.8	0/30	

親ヨシエビのPRDVの保有状況を調査するため、伊勢湾で7月21日, 31日に水揚げされた天然ヨシエビ成体から、肉眼による卵影観察で成熟した雌ヨシエビを選別し(それぞれ30尾, 34尾)、250ℓタンクを用いて当センターまで輸送した。搬入した親エビを一晚産卵に供した後、同様に産卵状況を観察し、完全産卵個体、一部産卵個体の生殖器を採材してウイルス検査に供した。

ウイルス検査は以下により行った。約50 mgの試料から、ISOGEN(日本ジーン製)を用いて常法に従って総DNAを抽出し、佐藤ら<sup>6)</sup>の方法に準じてPCR法によりPRDV遺伝子の有無を調べた。

## 結 果

産卵試験に供する前後の部位別のPCR検査結果を表1に示した。産卵試験前には、検査した何れの個体の何れの部位からもPRDV遺伝子は検出されなかった。しかし、産卵試験後には、生殖器のみからウイルス遺伝子が検出された(検出率18.8%)。

各海域の漁獲直後のヨシエビ成体の生殖器におけるPCR検査結果を表2に示した。その結果、何れの海域の天然ヨシエビ成体からも雌雄共にPRDVは検出されず、海域間および性別による検出率の違いは認められなかった。

伊勢湾産親ヨシエビの産卵状況別のPRDV検出率を表3に示した。未産卵個体も調査した7月6日の結果では、完全産卵個体、一部産卵個体、未産卵個体の検出率がそれぞれ21.4%、25.0%、10.0%であり、産卵した個体で高くなる傾向が認められた。7月21日, 31日の完全産卵個体の検出率は、それぞれ26.3%、23.0%であった。

表3. 伊勢湾産親ヨシエビの生殖器におけるPCR法による産卵状況別PRDV検出結果

収容 月日	産卵状況		
	完全(%)	一部(%)	未産卵(%)
7/6	3/14 <sup>*1</sup> (21.4)	2/8 (25.0)	1/10 (10.0)
7/21	5/19 (26.3)	0/0 (—)	検査せず <sup>*2</sup>
7/31	6/26 (23.0)	0/4 (0)	検査せず <sup>*3</sup>

\*1 PCR陽性数/検査数

\*2 未産卵個体11尾

\*3 未産卵個体4尾

## 考 察

今回の調査から、伊勢湾に生息するヨシエビにもPRDV保有個体が存在することが確認され、PRDV保有の有無を検査するには、産卵試験後の生殖器を用いることが適当であると考えられた。クルマエビでは、産卵後の卵巣や受精嚢でウイルス遺伝子の検出率が高くなることが報告され、要因として、産卵行動やハンドリングに伴うストレスの影響が推測されているが<sup>13)</sup>、本報告によりヨシエビにおいても同様と考えられた。

天然ヨシエビ成体のPRDV遺伝子の保有状況を調査した福澄ら<sup>8)</sup>の筑前海の調査では、今回の結果とは異なり、天然ヨシエビ成体が雌雄共に50%の割合でPRDV遺伝子を保有したことが報告されているが、天然クルマエビ成体では、調査年、時期、海域によりPRDVの検出率が異なることが報告されており<sup>14)</sup>、ヨシエビについてもこれらのことが検出率の違いに関係している可能性が考えられた。また、7月21日、31日に購入した伊勢湾産ヨシエビについては、漁獲直後の雌成体からの検出率が0%であるのに対し、完全産卵個体の検出率がそれぞれ26.3、23.0%であり、産卵に供した後に検出率が高くなるのが本結果からも示された。

これらのことから、伊勢湾産天然ヨシエビ成体の一部が既にPRDVを保有し、クルマエビと同様に親エビからの垂直感染により種苗生産、中間育成過程でPAVが発生する可能性が高いと考えられた。従って、産卵後の親エビ生殖器をPCR法により検査し、陽性個体由来の受精卵を排除する方法が、ヨシエビの種苗生産、中間育成過程においてPAVの発生の危険を低減し、安定生産に寄与すると思われる。三重県栽培漁業センターでは、親エビを個別に産卵水槽に収容し、産卵個体の生殖器をPCR法により検査して陰性個体の受精卵のみを種苗生産に使用することにより、中間育成過程も含めてPAVは発生しておらず、本方法の有効性が実用規模で実証されている。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、天然ヨシエビのサンプル入手にご協力を頂いた高知県栽培漁業センターの石川 徹研究員、独立行政法人水産総合研究センター玉野栽培漁業センターの関谷幸生場長（現、独立行政法人水産総合研究センター北海道区水産研究所栽培技術開発室長）に感謝いたします。また、PCR検査にご協力頂いた独立行政法人水産総合研究センター上浦栽培漁業センター（現、独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所上浦栽培技術開発センター）の職員の皆様にも御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 水産庁、独立行政法人水産総合研究センター、(社)全国豊かな海づくり推進協会(2006)平成16年度栽培漁業種苗生産、入手・放流実績(全国)、22pp.
- 2) 東海農政局三重統計情報事務所(1978)三重県漁業地区別統計表(1976)
- 3) 東海農政局三重統計情報事務所(2000)三重県漁業地区別統計表(1999)
- 4) INOUE, K., K.YAMANO, N.IKEDA, T.KIMURA, H.NAKANO, K.MOMOYAMA, J.KOBAYASHI and S.MIJAJIMA (1996) The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which caused penaeid acute viremia (PAV). *Fish pathol.*, **31**, 39-45.
- 5) 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.
- 6) 佐藤 純・虫明敬一・森 広一郎・有元 操・今泉圭之輔(2003)種苗生産過程におけるクルマエビの急性ウイルス血症(PAV)の防除対策. 栽培技研, **30**, 101-109.
- 7) MOMOYAMA, K., M.HIRAOKA, and C.A.VENEGAS (1999) Pathogenicity of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) to juveniles of six crustacean species. *Fish Pathol.*, **34**, 183-188.
- 8) 福澄賢二・筑紫康博(2003)天然海域におけるクルマエビのPRDV保有状況. 福岡水技研報, **13**, 13-19.
- 9) MOMOYAMA, K., M.HIRAOKA, K.INOUE, T.KIMURA, H.NAKANO and M.YASUI (1997) Mass mortalities in the production of juveniles greasyback shrimp, *Metapenaeus ensis*, caused by penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathol.*, **32**, 51-58.
- 10) 村田 守(1990)ヨシエビの種苗生産, 栽培漁業と新養成技術. 水産の研究, **48**, 97-104.
- 11) 池末 彌(1959)有明海産ヨシエビの生活史について. 有明海研報, **5**, 19-29.

- 12) 安部恒之・日下部敬之・鍋島靖信・辻野耕實 (1995) 大阪湾におけるヨシエビの漁業生物学的研究. 大阪府立水産試験場研究報告, **9**, 57-75.
- 13) 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.
- 14) 虫明敬一・有元 操・佐藤 純・森 広一郎 (1998) 天然クルマエビ成体からの PRDV 検出. 魚病研究, **33**, 503-509.