

ヒラメ天然魚のベータノダウイルス保有状況の調査

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2025-06-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 森, 広一郎, 西岡, 豊弘, 菅谷, 琢磨, 山田, 徹生, 村上, 恵祐, 本藤, 靖, 太田, 健吾, 岡, 雅一, 有元, 操 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014718

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



ヒラメ天然魚のベータノダウイルス保有状況の調査

森 広一郎^{*1}・西岡豊弘^{*1}・菅谷琢磨^{*1}・山田徹生^{*2}・村上恵祐^{*3}

本藤 靖^{*4}・太田健吾^{*5}・岡 雅一^{*1}・有元 操^{*6}

(*1: 上浦栽培漁業センター, *2: 宮古栽培漁業センター, *3: 南伊豆栽培漁業センター,

*4: 宮津栽培漁業センター, *5: 伯方島栽培漁業センター, *6: 栽培漁業部)

ウイルス性神経壊死症 (viral nervous necrosis: VNN) は海産魚の種苗生産および育成過程で問題となっており, 1990年に我が国のイシダイで初めて発生が報告されて以来, 国内ではシマアジ, ヒラメ, ハタ類等, 海外では VNN と同一の疾病 (ウイルス性脳・網膜症)¹⁾ がパラマンディー, ターボット, ハリバット, スズキ, ハタ類等で報告されている。国内外を合わせると発生魚種は14科30種となり, 本病は多くの魚種で世界的に大きな問題となっている^{2,3)}。

本病の原因ウイルスであるベータノダウイルス (以下, NNV) の感染経路については, シマアジでの発生事例で, 親魚生殖腺から高率にウイルスが検出され, ふ化直後にウイルスの急激な増殖によって本病が発生することから, 親魚からの垂直感染であることが明らかにされている。そのため, ウイルス検査で陰性の親魚だけを産卵に用いることにより VNN の発生率を低下させることに成功している^{4,5)}。しかしながら, その他の魚種では, ふ化直後に本病が発生することは希で, 稚魚期以降の中間育成過程でも発生する事例があるなど, 他魚種での NNV の感染経路については不明な点が多く残されている。

ヒラメにおいても, 1992年以降, 種苗生産過程の稚魚に本病が発生し大きな問題となっているものの⁶⁾, 感染経路については未だ明らかにされていない。本研究では, 親魚候補として種苗生産場に導入するヒラメ天然魚が種苗生産過程での本病の感染源になる可能性の有無を明らかにするため, 天然海域で漁獲されたヒラメを入手し NNV の保有状況を調査した。

材 料 と 方 法

供試魚 宮古湾, 駿河・相模湾, 若狭湾および瀬戸内海西部の4海域で, 2001年2月から2004年10月の間に漁獲されたヒラメ (平均体重535g, 範囲204~1,293g) 合計586尾を購入し, 上浦栽培漁業センターに搬入した (表1)。搬入後速やかに解剖し, それぞれの個体の眼球 (網膜組織) および脳を検査サンプルとして採取した。その際, 生殖腺を観察して雌雄を判別するとともに, 無眼側黒化等の体色異常を観察し, 色素異常を有する個体を放流魚と判定した。なお採取

したサンプルは, いずれも検査に供するまで-80℃で冷凍保存した。

PCR によるウイルス検出 採取したサンプルに9倍量の HBSS (Hank's balanced salt solution) を加え磨砕し, 0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過後, 磨砕濾液の一部から市販の核酸抽出試薬である ISOGEN (ニッポンジーン) を用い RNA の抽出を行った。得られた RNA を適量のジエチルピロカーボネート処理した超純水に溶解し, これを核酸試料とし以下の検査に用いた。検査は, RT-PCR⁷⁾ および nested PCR⁸⁾ により実施した。すなわち, RT-PCR には T4 領域 (RNA2 の 427b の領域) の増幅用プライマーとして F2 (5'-cgtgtcagtcagtcgtcgtc-3') と R3 (5'-cgagtcacacgggtgaaga-3') を, 逆転写酵素に SuperScriptII Reverse Transcriptase (Invitrogen) を, *Taq* DNA 合成酵素に Takara EX *Taq* (Takara) を用い, 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) によって, 逆転写反応を 42℃ で 30 分間行ったのち, 熱変性 (95℃ - 40 秒間), アニーリング (55℃ - 40 秒間) および伸長 (72℃ - 40 秒間) の一連の PCR 反応を 30 サイクル繰り返した。nested PCR には, Nishizawa et al. (1997) が報告した NNV の 4 つの遺伝子型⁹⁾ に対し, 各遺伝子型を特異的に検出できる 4 組のプライマーを用いた。すなわち, SJNNV タイプに特異的なプライマーには, SJ-669f (5'-acctgaggacaccaccgctc-3') と SJ-926r (5'-cagtcacaaagtaccacgcagg-3') を, RGNNV タイプには, RG-669f (5'-acctgaggagactaccgctc-3') と RG-926r (5'-cagcgaaaccagcctgcagg-3') を, BFNNV タイプには, BF-669f (5'-acctgaagatacattcgctc-3') と BF-926r (5'-cagtggaaccacccgcagg-3') を, そして, TPNNV タイプには, TP-669f (5'-acctgaggaaacattcgctc-3') と TP-926r (5'-caatccaagaagcctgcagg-3') を用いた。前述の RT-PCR で増幅した PCR 反応液を核酸試料とし, サーマルサイクラーを用いて 95℃ (30 秒間), 65℃ (30 秒間) および 72℃ (30 秒間) で PCR 反応を 30 サイクル繰り返した。そして, RT-PCR および nested PCR の増幅産物の解析は, トリスホウ酸 / EDTA 緩衝液 (0.46M Tris, 0.46M ホウ酸, 0.01M EDTA) で調製した 2.0% NuSieve 3:1 Agarose

表1 PCR 法によるヒラメ天然魚からのベータノダウイルス検出結果

漁獲場所	調査年月	調査尾数 (♂/♀/放流魚)*1	平均体重 (g) (最小～最大)	検出率%							
				RT-PCR	nested PCR						
					SJNNV	タイプ	RGNNVタイプ	BFNNV	タイプ	TPNNV	タイプ
宮古湾	2001年3月	12 (3/ 9/ 0)	470 (330～740)	0	0	0	0	0	0		
	2001年4月	9 (0/ 9/ 0)	538 (390～685)	0	0	0	0	0	0		
	2001年5月	10 (4/ 6/ 0)	557 (490～675)	0	10	0	0	0	0		
	2002年4月	13 (6/ 7/ 1)	593 (335～910)	0	0	0	0	0	0		
	2002年5月	7 (0/ 7/ 1)	711 (460～850)	0	0	0	0	0	0		
	2002年7月	16 (6/10/ 0)	695 (329～1,293)	0	0	0	0	0	0		
	2002年10月	22 (10/12/ 1)	418 (204～818)	0	0	0	0	0	0		
	2003年1月	16 (8/ 8/ 1)	604 (328～1,000)	0	0	0	0	0	0		
	2003年5月	13 (5/ 8/ 0)	647 (333～1,000)	0	0	0	0	0	0		
	2003年7月	17 (1/16/ 0)	686 (290～1,006)	0	0	0	0	0	0		
	2003年11月	3 (1/ 2/ 1)	426 (394～470)	0	0	0	0	0	0		
	2004年5月	21 (8/13/ 1)	417 (262～731)	0	0	0	0	0	0		
	2004年10月	32 (ND*2/ND/ 8)	419 (332～560)	0	0	0	0	0	0		
	駿河・相模湾	2001年3月	9 (5/ 4/ 0)	568 (490～685)	0	0	0	0	0	0	
2001年4月		10 (7/ 3/ 0)	995 (630～1,300)	0	0	0	0	0	0		
2002年5月		16 (10/ 6/ 0)	823 (575～1,200)	0	0	0	0	0	0		
2002年11月		10 (6/ 4/ 0)	486 (435～541)	0	0	0	0	0	0		
2003年1月		14 (10/ 4/ 0)	598 (321～1,111)	0	0	0	0	0	0		
2003年5月		15 (8/ 7/ 0)	853 (485～1,358)	0	0	0	0	0	0		
2003年11月		5 (5/ 4/ 0)	608 (508～758)	0	0	0	0	0	0		
2003年12月		4 (5/ 4/ 0)	534 (448～595)	0	0	0	0	0	0		
2004年1月		11 (6/ 5/ 1)	776 (645～917)	0	0	0	0	0	0		
2001年3月		10 (7/ 3/ 2)	683 (575～970)	0	0	0	0	0	0		
2001年4月		11 (ND/ND/2)	475 (165～1,070)	0	0	0	0	0	0		
2001年6月		10 (3/ 7/ 0)	402 (255～535)	0	0	0	0	0	0		
2002年4月		22 (7/15/ 2)	697 (380～1,135)	0	0	0	0	0	0		
2002年7月		14 (7/ 7/ 0)	525 (262～939)	0	0	0	0	0	0		
若狭湾	2002年10月	20 (12/ 8/ 1)	467 (332～725)	0	0	0	0	0	0		
	2003年1月	15 (9/ 6/ 0)	642 (456～1,029)	0	0	0	0	0	0		
	2003年5月	14 (10/ 4/ 1)	620 (418～1,029)	0	0	0	0	0	0		
	2003年6月	19 (10/ 9/ 3)	558 (230～745)	0	0	0	0	0	0		
	2004年1月	5 (3/ 2/ 0)	665 (510～910)	0	0	0	0	0	0		
	2001年2月	11 (4/ 7/ 1)	667 (420～1,170)	0	0	0	0	0	0		
	2001年3月	9 (3/ 2/ 0)	776 (485～1,135)	0	0	0	0	0	0		
	2001年4月	15 (14/ 1/ 0)	963 (745～1,155)	0	0	0	0	0	0		
	2002年4月	20 (20/ 0/ 1)	834 (615～1,090)	0	0	0	0	0	0		
	2002年11月	9 (4/ 5/ 1)	337 (206～471)	0	0	0	0	0	0		
	2002年12月	7 (7/ 0/ 0)	253 (120～380)	0	0	0	0	0	0		
	2003年1月	20 (13/ 7/ 1)	706 (386～1,088)	0	0	0	0	0	0		
	2003年4月	17 (14/ 3/ 0)	1,290 (963～1,906)	0	0	0	0	0	0		
	2004年1月	20 (13/ 7/ 2)	594 (332～838)	0	0	0	0	0	0		
2004年4月	20 (19/ 1/ 1)	698 (471～1,050)	0	0	0	0	0	0			
全体	2001年2月～ 2004年10月	586 (296/247/31)	535 (204～1,293)	0	0.17	0	0	0	0		

*1：調査群の雄、雌および放流個体の尾数を示した。

*2：ND：雌雄の判別ができなかったことを示す。

(Cambrex Bio Science) で電気泳動を行い、DNA 分子量マーカーとして ϕ X174Hae III digest (Takara) を用いて増幅産物の分子量を確認し、NNV 遺伝子の増幅の有無を確認した。

結 果

4 海域から入手した合計586尾のヒラメ天然魚を調査したところ、RT-PCR ではいずれの海域で漁獲された個体からも NNV は検出されなかった (表1)。しかしながら nested PCR では、宮古湾で2001年5月に漁獲された10個体のうち1個体から SJNNV タイプの NNV が検出された。調査海域全体では、SJNNV

タイプの検出率は0.17%であった (表1)。なお、SJNNV タイプ以外の NNV はいずれの個体からも検出されなかった。なお、今回調査した586尾のうち、296尾は雄、247尾は雌 (不明が43尾) で、このうち体色の異常から放流魚と判断される個体は合計31尾確認されたが、これらの個体からは NNV は検出されなかった。また、NNV が検出された個体は雄で眼球からのみ検出された。

考 察

これまでに、NNV の天然魚からの検出例は、カナダの winter flounder *Pleuronectes americanus*¹⁰⁾ や、

我が国のキジハタおよびマアジ^{11,12)}、最近では増養殖場付近で採取された数種の天然魚¹³⁾からの検出例が報告されている。これらの報告例の中で、winter flounder の事例では、NNV の検出率は0.23%と報告されており、これに比べると本報のヒラメでの検出率(0.17%)は若干低い。一方、キジハタの事例では、検出率はRT-PCR で7.9~16.7%, nested PCR で15.8~46.7%, マアジの事例では、検出率はRT-PCR で85%, nested PCR で90%と報告されており、これらに比べると本報のヒラメでの検出率は明らかに低い結果となった。

前述のようにヒラメの種苗生産には親魚として天然魚が用いられているが、今回の調査では親魚候補となる天然魚から高率にウイルスは検出されなかった。今回の調査結果から、導入したヒラメ天然魚が感染源となり、種苗生産場に侵入したNNV が原因となって種苗生産過程で本病が発生する可能性は否定できないものの、確率的には非常に低いことが予想される。これまでに、冷凍餌料として利用されているマアジが本ウイルスを保有していることが報告されており、このような生餌餌料から種苗生産場にウイルスが持ち込まれ本病が発生する可能性が指摘されている¹²⁾。今後、ヒラメについては、餌料等を含む飼育環境についても調査し、本病の感染源を特定する必要がある。

文 献

- 1) 日本魚病学会 (2004) 選定された魚病名 (2004年改訂). 魚病研究, **39**, 223-233.
- 2) 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.
- 3) Munday, B.L., J.Kwang, N.Moody (2002) Betanodavirus infections of teleost fish : a review. *J. Fish Dis.*, **25**, 127-142.
- 4) 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.
- 5) Mori,K., K.Mushiake and M.Arimoto (1998) Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. *Fish Pathol.*, **33**, 443-444.
- 6) Nguyen,H.D., T.Mekuchi, K.Imura, T.Nakai, T.Nishizawa and K.Muroga (1994) Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish.Sci.*, **60**, 551-554.
- 7) 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.
- 8) 森 広一郎・西岡豊弘・有元 操・中井敏博 (2001) 魚類ノダウイルスのPCR 検出系の再検討. 平成13年度日本魚病学会春季大会.
- 9) 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.
- 10) Barker,D.E., A.Mackinnon, L.Boston, M.D.B.Burt, D.K.Cone, D.J.Speare, S.Griffiths, M.Cook, R.Ritchie and G.Olivier (2002) First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Dis.Aquat.Org.*, **49**, 99-105.
- 11) 西岡豊弘・森 広一郎・菅谷琢磨・有元 操・冲 中 泰・中井敏博 (2003) キジハタ天然魚からのベータノダウイルスの検出. 平成15年度日本魚病学会大会.
- 12) 菅谷琢磨・西岡豊弘・森 広一郎・有元 操・中井敏博 (2003) 親魚餌料からのベータノダウイルスの検出. 平成15年度日本魚病学会大会.
- 13) Gomez, D.K., J. Sato, K. Mushiake, T. Isshiki, Y. Okinaka and T. Nakai (2004) PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *J. Fish Dis.*, **27**, 603-608.