

ウイルス性神経壊死症 (VNN) を耐過したキジハタにおけるベータノダウイルスの 検出

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: 西岡, 豊弘, 森, 広一郎, 津村, 誠一, 高野, 正嗣
	メールアドレス:
URL	所属:
	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014732

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



ウイルス性神経壊死症 (VNN) を耐過したキジハタにおける ベータノダウイルスの検出

西岡 豊弘^{*1}・森 広一郎^{*2}・津村 誠一^{*3}・高野 正嗣^{*4}

(^{*1} 養殖研究所魚病診断・研修センター, ^{*2} 養殖研究所病害防除部種苗期疾病研究グループ,
^{*3} 岡山理科大学専門学校, ^{*4} 玉野栽培漁業センター)

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中間育成過程で発生することから¹⁻⁴⁾、種苗の安定確保を図る上で大きな障害となっている。わが国では、1990年にイシダイで初めて報告され⁵⁾、その後、シマアジ⁶⁾、クエ⁷⁾、ヒラメ⁸⁾などで本病の発生が報告されている。また、同じ疾病が海外においてもバラマンディー⁹⁾、スズキ¹⁰⁾、ターボット¹¹⁾、ハタ類^{12,13)}などで症例が報告されている。これまでに14科30種の魚類で本症の発生が報告されており^{14,15)}、世界的に大きな問題となっている。本病の原因ウイルス (nervous necrosis virus : NNV) は当初、ノダウイルス科に分類されたが¹⁶⁾、現在ではベータノダウイルスに分類されている¹⁷⁾。

キジハタにおけるVNNの発生では、水温25～27℃で全長7～39mmの仔稚魚期に発病し、病魚は活力が低下し、症状として旋回遊泳や水槽底面方向に沈んで行く等の異常行動を示し、死亡率は約80%に達することが報告されている¹⁸⁾。また、全長80～90mmの稚魚で発病した場合には、およそ2ヵ月間に渡り本症による死亡が認められるものの、全滅に至ることはなく、生残する個体が存在することが報告されている¹⁹⁾。しかし、VNN発病後に生残したキジハタの感染耐過魚におけるウイルス保有状況については、明らかにされていない。そこで、著者らは、1999年と2002年にVNNが発病した群で、キジハタ感染耐過魚におけるウイルス保有状況を明らかにするため、感染耐過魚を長期間飼育し、NNVの感染状況を調査したので報告する。

材料と方法

種苗生産および育成 玉野栽培漁業センター（以下、玉野センター）において、天然魚を1～4年間養成した親魚（年齢は不明）から自然産卵により得られた受精卵を、ヨード剤（有効ヨウ素20mg/ℓ）を含む海水で洗浄し飼育に供した。飼育用水は砂ろ過海水を紫外線（10万μW/秒/cm²；日本フォトリックス）で殺

菌し、飼育水温は25～26℃を維持した。飼育初期にはナンノクロロプシスまたは濃縮淡水クロレラ（スーパー生クロレラV12；クロレラ工業）を添加し、S型ワムシタイ株、S型ワムシ、アルテミア幼生および配合飼料を給餌した。日齢40以降に飼育水槽から取り上げて中間育成に供し、日齢200以降に達した時点で一部の稚魚を上浦栽培技術開発センター（以下、上浦センター）へ輸送し継続飼育した。上浦センターでの用水には、ろ過海水を紫外線殺菌またはオゾン（OZF-30；荏原実業）で殺菌後、オキシダントを除去した殺菌海水を用いた。餌料には市販の配合飼料（海産ソフト餌付け用；坂本飼料）を与え、自然水温で育成した。

NNVの検出 玉野センターでは、日齢50までの仔稚魚期と異常な死亡が認められた時に、また上浦センターでは育成開始の約2～10ヵ月後に、飼育群から無作為に仔稚魚を採取し、網膜および脳を含む頭部組織を試料として、市販のRNA抽出試薬（ISOGEN；日本ジーン）を用いて常法に従い全RNAを抽出した。抽出したRNAは0.1%のジエチルピロカーボネイト処理水に溶解し、PCR用の検査試料とした。PCR法はNishizawa *et al.*²⁰⁾の方法に準じ、ウイルス外被タンパク質をコードしているT4領域（427bp）を増幅した。すなわち、逆転写酵素にはSuper Script II Reverse Transcriptase (Invitrogen) および下流プライマーを用いて、逆転写反応（42℃，30分）によりNNVのRNAからcDNAを合成させた後、上流プライマーとDNA合成酵素Takara EX Taq, (Takara) を添加し、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）により、熱変性（95℃，40秒）、アニーリング（55℃，40秒）および伸長（72℃，40秒）を1サイクルとするPCR反応を30サイクル行なった。さらに、PCR増幅産物の一部を用いて、森ら²¹⁾の方法によりnested-PCRを行なった。nested-PCRでは、NNVのうちキジハタタイプに特異的なプライマーを用い、nested-PCR反応を計30サイクル繰り返した。PCRおよびnested-PCRで増幅させたDNAは、トリスホウ酸/EDTA緩衝液で調製した2.0%

表1 キジハタ稚魚におけるPCR検査結果

試験区	生産年	検査法	仔稚魚の日齢				
			25-50	51-100	100-150	450-500	1100-1200
1	1999	PCR	0/6 ^{*1}	10/10	NT	NT	0/26
		nested-PCR	NT ^{*2}	NT	NT	NT	18/26
2	2002	PCR	0/60	0/30	0/35	0/30	—
		nested-PCR	0/60	0/30	6/35	30/30	—

*1 陽性尾数／検査尾数

*2 検査を実施せず

Nusieve 3:1 Agarose (FMC) で電気泳動し、紫外線照射によりPCR増幅産物 (T4領域) およびnested-PCR増幅産物 (259bp) の有無をそれぞれ確認した。

結果および考察

1999年と2002年の種苗生産および中間育成過程におけるPCR法によるNNVの検査結果を表1に示した。

種苗生産および中間育成中の仔稚魚では、何れの年もウイルスは検出されず、VNNの発生も認められなかった。

1999年に生産された稚魚では、中間育成過程の日齢51-100で一部の稚魚が旋回遊泳等の異常行動を示し、これらの個体からPCR法によりNNVが検出され、VNNが発生したことを確認した。しかし、その症状が飼育群全体に拡大することはなく、その後は死亡も観察されなくなった。約3年間育成した日齢1,100-1,200の時期には、PCR法ではウイルスは確認されなかったが、nested-PCR法では、26尾のうち18尾 (検出率69.2%) からウイルスが検出された。

2002年に生産された稚魚では、日齢110-120の時点で放流用に関係機関へ輸送した稚魚において本症の症状が認められ、死亡個体からPCR法によりウイルスが検出され、VNNの発生が確認された。輸送した群と同じ群を玉野センターで継続して飼育試験を行ったところ、日齢100まではPCR法およびnested-PCR法による検査でウイルスは検出されなかったが、日齢100-150でPCR法ではウイルスは検出されなかったものの、nested-PCR法により35尾中6尾 (検出率17.1%) からウイルスが検出され、その後、約1年2ヵ月-1年4ヵ月育成した日齢450-500には、nested-PCR法により検査した30尾全ての個体からウイルス

が検出 (検出率100%) された。なお、何れの年度の稚魚も日齢100以降に、本症の特徴的な症状や死亡は認められず、PCR法による検査では全て陰性であり、VNNの再発は認められなかった。

VNNが発生した1999年に生産された稚魚では、3年後においてもnested-PCRによりNNVの感染が確認された。一方、VNNの発生が認められなかった2002年に生産された稚魚では、約1年4ヵ月後においもウイルスが検出されたことから、NNVが感染したキジハタでは、ウイルスを完全に排除できず、長期間に渡り不顕性感染していることが明らかとなった。

ウイルス感染では長期間あるいは生涯にわたって感染が持続する感染様式を持続感染と呼んでいる²³⁾。本調査において2002年に生産された稚魚では、日齢100-150のnested-PCR法による検出率が17.1%で有ったのに対し、日齢450-500には100%に増加していることから、稚魚体内においてウイルスがいずれかの標的器官で増殖していると考えられる。また、病的症状を示さない天然キジハタ (体重120-1,252g) から、培養細胞 (E-11) により感染性を有するNNVが分離されていることから^{23,24)}、キジハタにおけるNNVの感染は、持続感染であると推察された。従って、VNNの感染耐過魚を放流した場合には、天然海域での新たな感染源と成りうる可能性があり、感染耐過魚は放流に供すべきでないと考えられる。なお、今回の調査では、nested-PCR法でのみウイルスが検出された2002年の稚魚から、培養細胞を用いてウイルス分離を実施していないため、これらの稚魚が感染性を有するウイルスを保有していたか否かについては、不明のままである。今後、稚魚からのウイルス分離を行い、nested-PCR法で陽性であることと稚魚体内でのウイルス増殖の有無について検討を行う必要があると考えられた。

文 献

- 1) 室賀清邦 (1995) 海産魚介類の仔稚におけるウイルス性および細菌性疾病. 魚病研究, **30**, 71-85.
- 2) 西岡豊弘・古澤 徹・水田洋之介 (1997) 種苗生産過程の海産魚介類における疾病発生状況 (1989~1994年). 水産増殖, **45**, 285-290.
- 3) Muroga, K. (2001) Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries. *Aquaculture*, **202**, 23-44.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 中井敏博・Nguyen Huu Dung・西澤豊彦・室賀清邦・有元 操・大槻観三 (1994) クエおよびトラフグにおけるウイルス性神経壊死症の発生. 魚病研究, **29**, 211-213.
- 8) 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*. *Fisheries Sci.*, **60**, 551-554.
- 9) 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* Block. *J. Fish Dis.*, **13**, 245-249.
- 10) 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.
- 11) Bloch, B., K. Gravning and J. L. Larsen (1991) Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Dis. s. Aquat. Org.*, **10**, 65-70.
- 12) Danayadol, Y., S. Direkbusarakom and K. Supamattaya (1995) Viral nervous necrosis in brownspotted grouper, *Epinephelus malabaricus*, cultured in Thailand, in "Diseases in Asian Aquaculture II" (ed. by M. Shariff, J. R. Arthur and R. P. Subasinghe), Fish Health Sec., *Asian Fish Soc.*, Manila, pp.227-233.
- 13) Chua, F. H. C., J. J. Loo and J. Y. Wee (1995) Mass mortality in juvenile greasy grouper, *Epinephelus tauvina*, associated with vacuolating encephalopathy and retinopathy, in "Diseases in Asian Aquaculture II" (ed. by M. Shariff, J. R. Arthur and R. P. Subasinghe), Fish Health Sec., *Asian Fish. Soc.*, Manila, p p. 235-241.
- 14) 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.
- 15) Munday, B. L., J. Kwang, N. Moody (2002) Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, **25**, 127-142.
- 16) 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.
- 17) Schneemann, A., L. A. Ball, C. Delsert, J. E. Johnson, T. Nishizawa (2005): Family Nodaviridae, *Virus Taxonomy, Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York, 865-872.
- 18) Mori, K., T. Nakai, M. Nagahara, K. Muroga, T. Mekuchi and T. Kanno (1991) A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of red-spotted grouper. *Fish Pathol.*, **26**, 209-210.
- 19) 津村誠一 (2003) 地域型底層性魚類の放流手法技術開発 (キジハタ). 平成14年度日本栽培漁業協会事業年報, pp. 201.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 本間守男 (1997) 1.ウイルス学 1.3人間. 「ウイルス学」朝倉書店, 東京, pp.22-29.
- 23) 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.
- 24) 森 広一郎・西岡豊弘・菅谷琢磨・有元 操 (2004) 天然キジハタからのベータノダウイルスの検出. 栽培漁業センター技報, **1**, 63-66.