

マツカワのウイルス性神経壊死症原因ウイルス遺伝子の 検出に及ぼす PCR 条件の検討

渡辺研一・吉水 守

(2000年12月28日受理)

Revelation of Effective Methods for Detection of Viral Nervous Necrosis Virus Gene using Polymerase Chain Reaction in Barfin Flounder, *Verasper moseri*

Ken-ichi WATANABE*¹ and Mamoru YOSHIMIZU*²

Abstract: Detection rate of viral nervous necrosis (VNN) virus gene using polymerase chain reaction was investigated. Tested specimens were: just hatched larvae, heads of larvae, eye or brain of juveniles, ovarian fluid and sperm obtained from brood fish. The specimens were mixed with a 10-fold serial dilution of virus solutions prepared from the eyes and brain of the Pacific Cod, *Gadus macrocephalus*, affected with VNN. For nucleic acid extraction, a comparison was made between 20-proteinase K, SDS-proteinase K, acid guanidium phenol chloroform, Isogen, TRIzol, RNA isolation kit, Catrimox-14, and High Pure Viral Nucleic Acid Kit. Isogen and/or RNA isolation kit showed the highest detection rate. PTC-200 and PJ 480 thermal cyclers were more effective than the PC-700 model. In comparison of reverse transcriptase, AMV, M-MLV, and Super Script II were tested; r *Taq* or Ex *Taq* was used as the DNA polymerase. Pairing of Super Script and Ex *Taq* was most effective. In PCR programs, 3-temperature PCR was more effective than 2-temperature PCR.

Keywords: Barfin flounder; PCR; Viral nervous necrosis; Viral detection

海産魚類の放流を目的とした種苗生産は、年々その種類を拡大し、対象魚種は1996年に37種となっている¹⁾。近年種苗生産の成否に疾病発生の有無が大きな影響を与え、中でもウイルス性神経壊死症 (viral nervous necrosis: VNN) は、発生する宿主範囲が広く、被害も大きい²⁾。わが国では1989年から1994年までの6年間に、VNNはビブリオ病と並びもっとも多い7魚種で発生が報告され²⁾、世界的には22魚種で本疾病の発生が報告されている³⁾。

日本栽培漁業協会厚岸事業場 (以下当事業場とする) の種苗生産対象種であるマツカワ, *Verasper moseri* にも VNN が発生し⁴⁾、その防除対策の確立が急務となった。疾病の防除対策に当たっては、原因病原体の検出法の確立がまず必要である。今までに、VNN の原因ウ

イルスを検出する方法として電子顕微鏡観察⁵⁾、ELISA⁶⁾、PCR⁷⁾、蛍光抗体法⁸⁾、酵素抗体法⁹⁾、*In situ* hybridization¹⁰⁾および培養細胞による分離¹¹⁾などが報告されている。現在では、検出感度の高さと簡便さから PCR によるウイルス検出法が主に用いられている^{12,13)}。

本疾病は、親魚が主たる感染源であると考えられている^{4,14-18)}。しかしながら、PCR 陰性と判定された親魚から得た PCR 陰性のふ化仔魚を用いた種苗生産過程で VNN が発生した例が報告されている^{4,19)}。また、シマアジでは主にふ化後10日目までに VNN が発生するが¹⁶⁾、マツカワでは種苗生産過程のどの段階でウイルスに感染し、ウイルスが増殖し始めるか容易に推定できない⁴⁾。さらに、飼育水や餌料などから水平感染する可能性も否定できない。

*¹ (社) 日本栽培漁業協会厚岸事業場 (Akkeshi Station of Japan Sea-Farming Association, Chikushikoi, Akkeshi, Hokkaido 088-1108, Japan).

*² 北海道大学大学院水産科学研究科 (Graduate School of Fisheries Science, Hokkaido University, Minato, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan).

このため、マツカワの種苗生産においては、卵および精液のPCRによる検査をはじめ、ふ化仔魚から稚魚を取り上げるまでの2.5ヶ月間、5日に1回、60尾を対象にPCRによる検査を実施し、VNNウイルスの増殖状態の把握を行っている¹³⁾。このために要する労力、時間およびコストには多大なものがあり、検査の省力化と省コスト化をはかる必要がある。さらに、検出感度が低い方法を用いて検査を行い陰性と判定した場合、実際にはウイルスが存在する可能性も否定できず、卵管理の際には周辺環境の汚染、種苗生産過程では他の水槽へ水平感染を引き起こすことも考えられる。そのため、少しでも検出感度が高い方法を用いて検査を行い、ウイルス陰性を確認する必要がある。

一方、検出感度を向上させるためにはPCRのサイクル数を増加させること、および一度PCRにより増幅したcDNAをテンプレートとして、再びPCR法に供するnested PCR法が知られている。しかしながら、検査環境が満足とは言えない飼育現場では、サイクル数の増加や2度増幅を繰り返すことは多大な労力を要し、場合によっては非特異産物の増幅を招き、検出感度の向上につながらない可能性も危惧される。

そこで、本研究ではPCRのサイクル数を一定とし、既存の各種核酸抽出法、PCRプログラム、酵素およびサーマルサイクラーを用いてPCRを行い、それらに要する時間と検出成績を比較して、マツカワの飼育現場で簡便にかつ高感度にVNNウイルス遺伝子を検出する方法について検討した。

材料と方法

供試魚 当事業場で養成中の種苗生産用マツカワ親魚の卵巣腔液および精液、ふ化仔魚および仔魚の頭部、眼ならびに稚魚の脳を供試した。これらの試料はNishizawa *et al.*⁷⁾の方法によるPCR検査によりいずれも陰性であった。卵巣腔液および精液は50 μ lを、他の材料では50 mgを1検体とした。

ウイルス液の調製 供試ウイルス液として、北海道立中央水産試験場より分与を受けた、VNN罹病マダラ、*Gadus macrocephalus*の眼および脳ホモジナイズ液（以下ウイルス液とする）を用いた。なお、病魚は-80°Cに保管されていたものを用いた。病魚の眼および脳はストマッカー（オルガノ）を用いてホモジナイズし、10 unit/mlのRNase Inhibitor (Takara)を含むDDW [0.1% (W/V) ジエチルピロカーボネイトを含む蒸留水を一晩放置した後、オートクレーブ (121°C, 15分) したもので10倍希釈してウイルス液とした。ウイルス液は使用するまで-80°Cで凍結保存した。なお、供試ウイルス液はNishizawa *et al.*⁷⁾の方法を一部変更して行った場合、10⁻⁴希釈までPCR陽性となった。変更は、

RT反応において逆転写酵素に50UのSuper Script II (Gibco BRL)と添付の緩衝液、PCR反応においてDNAポリメラーゼに1.25UのEx *Taq* (TaKaRa)と添付の緩衝液を用い、サーマルサイクラーにPTC-200 (MJ Research)を用いることにより行った。

核酸抽出法の検討 既存の核酸抽出法のVNNウイルス遺伝子検出成績を比較するために、tween 20-proteinase K法²⁰⁾、SDS-proteinase K法⁷⁾、親魚の体腔液に存在するVNNウイルスを検出するために改良されたSDS-proteinase K法¹⁷⁾、AGPC法²¹⁾、および市販されている核酸抽出キットのうちIsogen, RNA isolation kit, TRIzol (Gibco BRL), Catrimox-14 (Takara) およびHigh Pure Viral Nucleic Acid Kit (Behlinger-Manheim)を用いた。核酸抽出はこれらの各方法の手順にしたがい、10⁻³から10⁻⁵希釈のウイルス液を含む脳、眼、頭、仔魚、卵巣腔液および精液に、500 μ lの核酸抽出液を添加して行った。核酸液の調製と得られた核酸液からのVNNウイルス遺伝子の検出は前述の方法により行った。結果は、アガロースゲル電気泳動法によりVNNウイルス特異バンドが検出された材料について、陽性を示した最大希釈倍率の常用対数値（以下検出成績とする）に-1の係数を乗じた値で示し、複数回行った結果の平均値と標準偏差で示した。

PCRプログラムの検討 一般にシャトルと呼ばれる変性を1反応温度、アニーリングと伸長反応を1反応温度の計2つの温度で行うPCRは、反応時間の短縮と高温においてアニーリングさせることによる特異性の高さが期待される²²⁾。そこで { (95°C10秒, 60°C30秒) \times 25サイクル } のシャトルPCRと、通常の3反応温度のPCR { 72°C10分, 95°C2分, (95°C40秒, 55°C40秒, 72°C40秒) \times 25サイクル, 72°C5分 } のVNNウイルス遺伝子検出成績を比較した。成績の比較は、シャトルPCRの検出成績に-1の係数を乗じた値に、3反応温度のPCRの検出成績を加算した値の平均値により行った。

PCRに用いる酵素の検討 逆転写酵素としてAMV reverse transcriptase {AMV: Takara, RNA PCR kit (AMV) Ver. 2.1}, M-MLV reverse transcriptase (M-MLV: Toyobo, RT-PCR high) およびSuper Script IIを、DNAポリメラーゼとしてはEx *Taq*とr *Taq* (Takara)を用い、酵素の商品の違いによる検出成績を比較した。成績の比較は、それぞれの酵素を組み合わせた検出成績に-1の係数を乗じた値にSuper Script IIとEx *Taq*を用いた場合の検出成績を加算した値の平均値により行った。酵素のユニット数は、AMVでは2.5 U, M-MLVでは10U, r *Taq*では1.25Uとした。使用する緩衝液は各酵素に添付のものを用い、各種塩類の濃度は各酵素に添付の説明書に記載されている濃度とした。プ

ライマーおよび dNTPs の濃度は前述と同様とした。

PCR に用いるサーマルサイクラーの検討 PTC-200, PJ 480 (Perkin-Elmer Cetus) および PC-700 (Astec) を用いて, サーマルサイクラーの違いによる検出成績を比較した。PCRにあたっては, Aldrich Chemical Company 製のミネラルオイルを添加した。成績の比較は, それぞれの機種を用いた場合の検出成績に-1 の係数を乗じた値に, PTC-200を用いて, ミネラルオイルを添加せずに PCR を行った場合の検出成績を加算した値の平均値により行った。

結 果

核酸抽出法の検討 種々の核酸抽出法を用いた場合のウイルス遺伝子の検出状況を Table 1 に示す。脳および眼を材料とした場合には Isogen 法, TRIzol 法, AGPC 法および RNA isolation kit 法いずれでも良好の検出結果が得られた。頭部を材料とした場合には Isogen 法および RNA isolation kit 法の検出結果は 4.3 ± 0.50 , 4.5 ± 0.58 と高く, AGPC 法では 3.5 ± 0.58 とやや劣った。t 検定により統計的な有意差は認められなかった (Isogen 法に対しては $p > 0.5$, RNA isolation kit 法に対しては $p > 0.4$)。仔魚と卵巣腔液を材料とした場合には, Isogen 法と RNA isolation kit 法の検出結果が優れたが, 精液を材料とした場合には RNA isolation kit 法の検出結果が優れた。検出結果が優れた Isogen 法, TRIzol 法, AGPC 法および RNA isolation kit 法では 10^{-5} 希釈となるようにウイルス液を添加した場合でも VNN ウイルス遺伝子が検出される場合があり, 前述の通りウイルス液のみを核酸抽出した場合 10^{-4} 希釈まで陽性となったよりも検出結果が優れた。

PCR プログラム, 酵素およびサーマルサイクラーの検討 PCR プログラム, 酵素およびサーマルサイクラーの種類によるウイルス遺伝子検出結果を Table 2 に示す。PCR プログラムとして 2 温度段階 PCR を用いた場合のウイルス遺伝子検出結果は -1.0 ~ -1.8 となり, 通常の 3 反応温度を用いた場合には 2 温度段階 PCR よりウイルス液を 10 ~ 100 倍希釈して添加した場合までウイルス遺伝子が検出された。

酵素の組み合わせの違いでは, Super Script II と r Taq を用いた場合の検出結果は -0.3 ~ -0.5 と Super Script II と Ex Taq を用いた場合の結果と差が少なかった。しかし, 他の酵素の組み合わせを用いた場合の検出結果は 0 ~ -1.5 であり, Super Script II と Ex Taq を用いた場合の検出結果が最も優れた。

サーマルサイクラーの比較では, MJ480 の検出結果は 0 ~ 0.2 を示し, いずれの核酸抽出法を用いても PTC-200 とほぼ同等であった。しかし, PC-700 ではいずれの核酸抽出法を用いても -0.3 ~ -0.5 とやや劣る結果となった。PTC-200 では, 検出結果が 0.5 ~ -0.5 とミネラルオイルの添加の有無による検出感度の差は認められなかった。

考 察

本研究では, マツカワの各種試料にウイルス液を添加し, 様々の方法を用いて PCR を行い, それらの検出感度を比較することにより, 飼育現場で簡便かつ高感度にマツカワの VNN ウイルス遺伝子を検出する方法について検討した。

まず核酸抽出法について検討したところ, Isogen 法, TRIzol 法および RNA isolation kit 法は, 従来用いられ

Table 1. Effect of nucleic acid extraction on detection rate of VNN gene

Sample	Method of nucleic acid extraction								
	TP*1	SP*2	sSP*3	ISO*4	TRI*5	AGPC*6	RIK*7	CT*8	HP*9
Brain	$4.0 \pm 0.00^{*10}$	4.0 ± 0.00	NT*11	4.8 ± 0.50	4.8 ± 0.50	4.8 ± 0.50	5.0 ± 0.00	NT	4.5 ± 0.71
Head	3.0 ± 0.00	ND*12	NT	4.3 ± 0.50	NT	3.5 ± 0.58	4.5 ± 0.58	NT	NT
Eye	3.0 ± 0.00	NT	NT	4.8 ± 0.50	5.0 ± 0.00	4.8 ± 0.50	4.8 ± 0.50	4.0 ± 0.00	3.5 ± 0.71
Hatched larvae	ND*12	3.8 ± 0.50	NT	4.8 ± 0.50	4.5 ± 0.58	NT	4.8 ± 0.50	NT	NT
Ovarian fluid	3.3 ± 0.25	3.5 ± 0.58	ND*12	5.0 ± 0.00	4.5 ± 0.58	NT	5.0 ± 0.00	ND*12	3.5 ± 0.71
Sperm	3.8 ± 0.50	3.3 ± 0.50	ND*12	4.5 ± 0.58	4.5 ± 0.58	NT	5.0 ± 0.00	ND*13	3.8 ± 0.50

*1 Tween 20-proteinase K method.

*2 Sodium dodecyl sulfate-proteinase K method.

*3 Sodium dodecyl sulfate-proteinase K method using supernatant of homogenized sample solution for nucleic acid extraction.

*4 Isogen (Nippon gene) method.

*5 TRIzol (Gibco BRL) method.

*6 Acid guanidium phenol chloroform method.

*7 RNA isolation kit (Toyobo) method.

*8 Catrimox-14 (Takara) method.

*9 High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Behlinger-Manheim) method.

*10 Mean of $-\log_{10}$ (dilution rate of virus solution which detected the viral specific gene) \pm S.D.

*11 Not tested.

*12 Not detected in some cases.

*13 Not detected.

Table 2. Results of experiments on detection rate of NNV gene

Experimental object	Thermal cyclers	Combination of enzyme	PCR program	Mineral oil	Method of nucleic acid extraction*1,2		
					ISO	TRI	RIK
PCR program*3	PTC-200 (MJ Research)	Super Script II & Ex <i>Taq</i>	Shuttle*4	Not use	-1.0*5	-1.2	-1.8
Combination of enzyme*6	PTC-200	AMV & r <i>Taq</i>	Usual*7	Not use	-1.2	-0.7	-0.7
	PTC-200	AMV & Ex <i>Taq</i>	Usual	Not use	-1	0	-0.2
	PTC-200	M-MLV & r <i>Taq</i>	Usual	Not use	-1.2	-1.5	-1.3
	PTC-200	M-MLV & Ex <i>Taq</i>	Usual	Not use	-0.7	-0.3	-1.2
	PTC-200	Super Script II & r <i>Taq</i>	Usual	Not use	-0.5	-0.3	-0.3
Thermal cyclers*8	PTC-200	Super Script II & Ex <i>Taq</i>	Usual	Aldrich Chemical Company	0.5	0	-0.5
	PC-700 (Astec)	Super Script II & Ex <i>Taq</i>	Usual	Aldrich Chemical Company	-0.5	-0.3	-0.4
	PJ480 (Perkin-Elmer Cetus)	Super Script II & Ex <i>Taq</i>	Usual	Aldrich Chemical Company	0	0.2	0.1

*1 See Table 1.

*2 Brain, eye, heads, hatched larvae, ovarian fluid and sperm were used for nucleic acid extraction sample.

*3 Results were compared with usual program.

*4 (95°C - 10sec, 60°C - 40sec) × 25 cycles.

*5 $\Sigma (-\log_{10} (\text{examined value of most diluted virus solution that detected the viral specific gene}) + \log_{10} (\text{compared value of most diluted virus solution that detected the viral specific gene})) / \text{trial number}$.

*6 Results were compared with combination of enzyme that use Super Script II & Ex *Taq*.

*7 72°C - 10min, 95°C - 2min, (95°C - 40sec, 55°C - 40sec, 72°C - 40sec) × 25 cycles, 72°C - 5min.

*8 Results were compared with PTC-200 that performed without mineral oil.

てきた tween 20-proteinase K 法, SDS-proteinase K 法および改良された SDS-proteinase K 法に比較して, 感度が10~100倍優れていた。中でも Isogen 法と RNA isolation kit 法の検出感度が高かった。核酸抽出に要する時間は RNA isolation kit 法が150分間であるのに対して Isogen 法は90分間と短く, 時間の短縮をはかるとすれば, Isogen 法を用いることが有効と考えられた。一方, 精液の VNN ウイルス保有状況を検査する場合には RNA isolation kit 法の検出感度が高く, 精液を材料とする際には本法により核酸抽出を行うべきと考えられた。

Isogen 法および RNA isolation kit 法は RNA を抽出する方法であるが, tween 20-proteinase K 法, SDS-proteinase K 法は全核酸を抽出する方法である。これらの全核酸を抽出する方法では, 同時に抽出された DNA と共に核酸液中の核酸量が過剰になってしまっている可能性が考えられる。核酸量が過剰な場合, PCR 反応が阻害されることが知られている²³⁾が, このことにより VNN ウイルス遺伝子が検出できなかった可能性がある。

一方, Catrimox-14法と High Pure Viral Nucleic Acid Kit 法は, RNA を抽出する方法であるが, 検出感度が低かった。これは, これらの市販キットがマツカワの VNN ウイルス検出のための核酸抽出法として適していないためと考えられた。

また, 改良 SDS-proteinase K 法の場合, 材料のホモジナイズ液の遠心上清を使用することから, 核酸抽出液中の核酸量は, 材料のホモジナイズから直接核酸抽出する場合と比較して少ないと考えられる。低濃度の核酸溶液中の核酸をエタノール沈殿により回収する場合, 効率が悪いことが知られており, 酵母の tRNA など

の適切な共沈剤を添加して核酸を回収することが行われている²⁴⁾。一方, Isogen 法などではウイルス液のみを核酸抽出した場合に 10^{-4} 希釈までしかウイルス遺伝子が検出できなかったのに対して, ふ化仔魚, 卵巣腔液および精液といった材料にウイルス液を添加して核酸抽出した場合には 10^{-5} 希釈まで検出することができた。このことは, 供試魚由来の核酸が VNN ウイルス核酸の共沈剤となって, PCR で VNN ウイルス遺伝子を検出するに十分な量のウイルス核酸を回収できたためと考えられる。したがって, 改良 SDS-proteinase K 法の場合は, 適切な共沈剤を用いることにより PCR 検出に十分な量のウイルス遺伝子を回収することができ, 検出感度が向上する可能性がある。

PCR に用いるプログラムの検討では, 一般にシャトルと呼ばれる変性を95°C, アニーリングと伸長反応を60°Cの計2つの温度で行う PCR は, 通常の3反応温度の PCR と比較して反応時間が短い利点があるが, プライマーの T_m 値が反応温度以下の場合増幅が認められない可能性がある。本 PCR に用いる F2 および R3 プライマーの T_m 値は, それぞれ60°C, 62°Cと計算される²⁵⁾ことから増幅可能と判断し, シャトル PCR と通常の3反応温度 PCR の検出感度を比較した。シャトル PCR を用いた場合でも VNN ウイルス遺伝子の検出は可能であったが, 検出感度は通常のプログラムを用いた方が高く, 現場での検査には通常の3反応温度のプログラムを用いるべきと考える。

PCR に用いる酵素の検出感度に与える影響を検討したところ, Super Script II と Ex *Taq* を用いた場合に検出感度が高かった。

サーマルサイクラーでは, PJ 480 と PTC-200 の検出感

度に差は認められなかったが、PC-700を用いた場合には若干低下した。PC-700は同一のPCRプログラムを実施した場合、他の機種が110~120分間を要するのに対して90分間で結果が出せる。PC-700を使用する場合には、他の機種の温度変化カーブにあわせた温度変化が可能となるように、プログラム設定を変更する必要がある。また、PTC-200を使用した場合にはミネラルオイルの添加の有無により検出感度に差が認められなかった。以上のことから、ミネラルオイルを使用せずにPCRすることができるPTC-200をサーマルサイクラーとして用いることが省力化、省コスト化の面から有効と考えられる。

以上の結果を整理する。卵巣腔液、仔魚、仔魚の頭部、仔稚の眼および稚魚の脳ではIsogen法、精液ではRNA isolation kit法を用いて核酸抽出し、Super Script IIとEx Taqを酵素として用い、PTC-200を用いて3反応温度によるPCRを行うと良好な結果が得られると結論される。しかしながら、本研究では既存の技術のみを検討しており、特にPCRに用いたプライマーはシマアジの神経壊死症原因ウイルスの塩基配列から設計されたものである⁷⁾。マツカワとシマアジの神経壊死症ウイルスの塩基配列は異なっている²⁶⁾ことから、マツカワ用のプライマーを設計することも必要であろう。さらに、分子生物学関連の技術は日進月歩であることから、新たな技術に関して情報収集し、それらの検出感度を比較しながら導入を検討していく必要もあろう。

最近マツカワのVNNウイルスは、SSN-1細胞により分離できることが明らかとなった¹¹⁾。培養細胞によるウイルス分離は検出感度が高い方法であるが、検出に若干の時間を必要とする²⁷⁾。一方、伝染性造血器壊死症(IHN)ウイルスの場合には、材料を接種した細胞を1日培養後にPCRすることにより、高感度に迅速にIHNウイルスを検出することが可能であることが報告されている^{28,29)}。VNNウイルスについても、細胞培養法とPCR法を併用して検出する方法を検討する必要があると考える。

要 約

マツカワを材料とした場合の、核酸抽出法、PCR反応温度、反応酵素、機器等のウイルス性神経壊死症原因ウイルス遺伝子の検出に及ぼす影響について比較検討した。核酸抽出法としてはIsogenおよびRNA Isolation Kitが、cDNAの増幅に際して変性、アニーリング、伸長反応を3種類の反応温度により行う方法が、逆転写酵素としてはSuper Script II、DNAポリメラーゼはEx Taqが、サーマルサイクラーはPTC-200およびPJ 480が優れていた。

謝 辞

本研究にあたり、北海道立中央水産試験場から貴重なマダラ病魚を恵みいただいた。ここに記して深謝の意を表する。

文 献

- 1) 水産庁・日本栽培漁業協会 (1998): 海産魚介類の機関区分別種苗生産放流実績. 平成8年度種苗生産入手・放流実績 (全国), 日本栽培漁業協会, 東京, pp. 8-12.
- 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**(2), 285-290.
- 3) 室賀清邦・古澤 徹・古澤 巖 (1998): シマアジのウイルス性神経壊死症. 水産増殖, **46**(4), 473-480.
- 4) 渡辺研一・石間正浩・川真田憲治・吉水 守・絵面良男 (1999): マツカワにおけるウイルス性神経壊死症の発生. 北大水産彙報, **50**(2), 101-113.
- 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 Disease*, **13**, 69-77.
- 6) Arimoto, M., K. Mushiake, Y. Mizuta, T. Nakai, K. Muroga, and I. Furusawa (1992): Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathol.*, **27**(4), 191-195.
- 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**(2), 103-170.
- 8) Nguyen, D. N., T. Nakai, and K. Muroga (1996): Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, **24**, 99-105.
- 9) Office International des Epizooties (OIE) (1997): Diagnostic manual for aquatic animal diseases. 195p.
- 10) Comps, M., M. Trindade, and C. I. Delsert (1996): Investigation of fish encephalitis viruses (FEV) expression in marine fishes using DIG-labeled probes. *Aquaculture*, **143**, 113-121.
- 11) 渡辺研一・吉水 守 (1999): 魚類由来培養細胞の魚類ノダウイルス感受性. 魚病研究, **34**(4), 213-214.
- 12) Mori, K., K. Mushiake, and M. Arimoto (1998): Control measures for viral nervous necrosis of striped jack. *Fish Pathol.*, **33**(4), 443-444.
- 13) Watanabe, K., S. Suzuki, T. Nishizawa, K. Suzuki, M. Yoshimizu, and Y. Ezura (1998): Control strategy for viral nervous necrosis of barfin flounder. *Fish Pathol.*, **33**(4), 445-446.
- 14) Mushiake, K., M. Arimoto, T. Furusawa, I. Furusawa, T. Nakai, and K. Muroga (1992): Detection of antibodies against striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) from brood stocks of striped jack. *Fisheries Sci.*, **58**(2), 2351-2356.

- 15) 虫明敬一・中井敏博・室賀清邦・関谷幸生・古澤 巖 (1993): シマアジのウイルス性神経壊死症: 仔魚の発病に対する親魚の抗体価および産卵飼育方法の影響. 水産増殖, **41**(3), 327-332.
- 16) 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**(1), 19-24.
- 17) 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**(3), 177-182.
- 18) 虫明敬一 (2000): シマアジ親魚の産卵に伴って増殖するウイルス性神経壊死症 (VNN) 原因ウイルス (SJNNV) とその抑制対策. 水産増殖, **48**(1), 109-115.
- 19) Nishizawa, T., K. Muroga, and M. Arimoto (1996): Failure of the polymerase chain reaction (PCR) method to detect striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in striped jack *Pseudocaranx dentex* selected as spawners. *J. Aquat. Anim. Health*, **8**(4), 332-334.
- 20) 西澤豊彦 (1997): PCR法を用いた魚類病原ウイルスの検出. 魚類ウイルス病の遺伝子診断法の開発とその応用に関する研究. 平成8年度科学研究費補助金 (一般研究B) 研究成果報告書.
- 21) Yoshinaka, T., M. Yoshimizu, T. Sawabe, and Y. Ezura (1997): Detection and identification of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) by reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). *Fisheries Sci.*, **63**(4), 592-595.
- 22) 向井博之 (1997): PCRの反応組成と条件① PCRの基本反応条件. PCR法最前線基礎技術から応用まで (関谷剛男・藤永恵編), 共立出版, 東京, 17-22.
- 23) 細谷紀子 (1998): 実地編 ADNA 検出のためのPCR法1. PCR法によるDNA検出のためのストラテジー. PCR法利用の手引き (矢崎義雄監修, 平井久丸・門脇孝編), 中外医学社, 東京, 40-48.
- 24) 井手口隆司・戒能徳樹・角野富三郎・齋藤 拓・堀尾武一・山下仁平 (1986): 1章 DNAの抽出と精製. 生物化学実験の手引き 3 核酸の分離・分析法 (泉美治・中川八郎・三輪谷俊夫編), 化学同人, 京都, 1-14.
- 25) Innis, M. A., and D. H. Gelfand (1994): 1. PCRの最適条件, 「PCRの実験条件, 齊藤隆監訳, HBJ 出版局, 東京, 3-10.
- 26) Nishizawa, T., K. Mori, M. Furuhashi, T. Nakai, I. Furusawa, and K. Muroga (1995): Comparison of the coat protein gene of five nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *J. Gen. Virol.*, **63**(4), 1563-1569.
- 27) Yoshimizu, M., T. Kimura, and J. R. Winton (1985): An improved technique for collecting reproductive fluid samples from salmonid fish. *Prog. Fish-Cult*, **47**, 199-200.
- 28) 吉仲桃子・堀 友花・本西 晃・河西一彦・山本 淳・鈴木邦雄・宇賀神光男・野村哲一・吉水 守 (1998): RT-PCRと細胞培養法を組み合わせた伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV) の検出. サケ・マス資源管理センター研究報告, **1**, 29-34.
- 29) Yoshimizu, M., Y. Hori, Y. Yoshinaka, and Jo-Ann Leong (2000): Evaluation of methods used for the surveillance and monitoring of fish health for risk assessment. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **21**: in press.