



Title	マツカワにおけるウイルス性神経壊死症の発生
Author(s)	渡辺, 研一; WATANABE, Ken-ichi; 吉水, 守 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 50(2), 101-113
Issue Date	1999-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/24188
Type	departmental bulletin paper
File Information	50(2)_P101-113.pdf



マツカワにおけるウイルス性神経壊死症の発生

渡辺 研一¹⁾・吉水 守²⁾・石間 正浩²⁾
川真田憲治³⁾・絵面 良男⁴⁾

Occurrence of Viral Nervous Necrosis in Hatchery-Reared Barfin Flounder

Ken-ichi WATANABE¹⁾, Mamoru YOSHIMIZU²⁾, Masahiro ISHIMA²⁾
Kenji KAWAMATA³⁾ and Yoshio EZURA⁴⁾

Abstract

Mass mortalities occurred in hatchery-reared barfin flounder *Verasper moseri* juveniles. Diseased fish showed abnormal swimming with hemorrhaging of eyes and brain. Brain tissue was stained by fluorescent antibody technique using an anti-SJNNV (striped jack *Pseudocaranx dentex* nervous necrosis virus) rabbit serum. Vacuolations were recognized in nervous tissues and viral particles ranging from 27 to 28 nm in size were observed by electron microscopy. Presence of the nodavirus was also detected by PCR. Detection rates of nervous necrosis virus gene from egg fluids were increased with repeating egg collection during spawning period.

Key words: Barfin flounder, *Verasper moseri*, Mass mortality, Viral nervous necrosis, PCR

マツカワ *Verasper moseri* は、北方性のカレイ類でその成長の速さと市場性の高さから、北日本の「つくり育てる漁業」の対象種として期待されている。本種の種苗生産技術については(社)日本栽培漁業協会厚岸事業場(以下当場)が、その開所当初から技術開発に着手し、1986年に初めて稚魚の生産に成功した。その後、年々生産量は増加したが、1990年頃から異常遊泳と眼および脳の出血を主徴とする病魚の出現が確認され始めた。これらの病魚から既知の病原体は検出されなかったが、マスノスケ *Onchorhynchus tshawytscha* 胚由来の CHSE-214 細胞に細胞変性がみられることから、ウイルス性疾病が疑われていた。しかし、原因ウイルスの分離・特定には至らなかった。

1993年に当場および種苗の配付先で、放流を目的に中間育成中のマツカワ稚魚に大量死が確認された。病魚はふらつき遊泳し、一部は遊泳せずに無眼側を水面に向けて水底に静止していた。頭部および眼の発赤、眼の脱落などが観察された。

ウイルス性神経壊死症(viral nervous necrosis: VNN)は、イシダイ *Oplegnathus fasciatus* 仔稚

¹⁾ (社)日本栽培漁業協会厚岸事業場

(*Akkeshi Station of Japan Sea-Farming Association*)

²⁾ 北海道大学水産学部生物化学工学講座(旧:微生物学講座)

(*Laboratory of Biochemical Process Technology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

³⁾ 北海道立栽培漁業総合センター(現:北海道立稚内水産試験場)

(*Hokkaido Institute of Mariculture*)

⁴⁾ 北海道大学水産学部生物海洋学講座(旧:微生物学講座)

(*Laboratory of Biological Oceanography, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

魚の死亡率が極めて高い疾病として最初に報告され (Yoshikoshi and Inoue, 1990), 我が国ではその後, キジハタ *Epinephelus akaara* (Mori et al., 1991), シマアジ *Pseudocaranx dentex* (有元ら, 1994), ヒラメ *Paralichthys olivaceus* (Nguyen et al., 1994), クエ *Epinephelus moara* (中井ら, 1994), トラフグ *Takifugu rubripes* (中井ら, 1994), マハタ *Epinephelus septemfasciatus* (Fukuda et al., 1996), コチ *Platycephalus indicus* (宋ら, 1997) およびスズキ *Lateolabrax japonicus* (鄭ら, 1996) などで報告されている。また, 世界的にはこれらを含み 22 種で発生が確認されている (室賀ら, 1998)。

著者らは, マツカワの病魚および親魚についてウイルス検査と病理組織学的検査を行い, 本疾病を VNN と診断し, 感染源として親魚が疑われることを明らかにしたので報告する。

材料と方法

疾病の発生状況

当場の 1986 年度から 1992 年度の事業報告書をもとに, 過去の本疾病の発生状況について調査を行った。また, 1993 年に当场から種苗を配付され陸上施設で中間育成中に本症が発生した北海道胆振支庁の伊達および渡島支庁の森での生残状況と, 当场で本疾病が発生した飼育群の疾病確認後の生残状況を調査した。

病魚の症状

1993 年に当场および当场からマツカワ稚魚を配付された伊達および森で中間育成中の瀕死魚の行動観察を行い, さらに病魚の外観および解剖学的な症状の観察を行った。

病理組織学的検査

瀕死魚を水槽から取り揚げ, 脳室を開き直ちにブアン氏液で 2 日間固定した。固定後, 病魚の眼および脳を摘出して, 常法にしたがって厚さ 7~8 μm の切片を作製し, ヘマトキシリン・エオシン染色を施して, 光学顕微鏡により観察した。作製した一部の切片をキシレンで脱パラフィンを行い, PBS で 1:100 に希釈した抗 SJNNV (striped jack nervous necrosis virus) ウサギ血清と 37°C で 2 時間反応させた。次に PBS で 3 回洗浄し, 1:100 に希釈した蛍光標識抗ウサギ IgG ヤギ血清 (Dako) と 37°C で 2 時間反応させ, 蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。また, 病魚を水槽から取り揚げた後, 直ちに眼球を摘出して 2% パラフォルムアルデヒド・2.5% グルタルアルデヒド混合液で 4°C, 24 時間の前固定を行った後, カコジレート緩衝液で 2 回洗浄し, 0.4% オスミウム酸で 4°C, 2 時間固定した。その後カコジレート緩衝液で 3 回洗浄し, 脱水を経てエポキシ樹脂に包埋し, 超薄切片を作製した。超薄切片は 3% 酢酸ウラニル・クエン酸鉛で 2 重染色を施し, 透過型電子顕微鏡 (日立, H-7000) を用いて 75 kV で観察した。

PCR 法によるウイルス遺伝子の検出

病魚の眼球, 脳, 腸管, 腎臓, 脾臓, 肝臓, 心臓および筋肉を摘出し, 核酸抽出用試料とした。陽性対照試料として VNN と確認されたシマアジ仔魚を用いた。試料は 50 μl の核酸抽出用溶液 (0.5 mg/l Proteinase K, 0.5% Tween 20) と混和しながら細切し, 200 μl の同溶液を添加した後に 37°C で 1 時間処理した。次に, 抽出液と等量の Tris-EDTA で飽和したフェノール (pH 7.8) を加えて攪拌した後, 12,000 rpm で 15 分間遠心分離を行った。遠心分離後, 水層を回収して, 等量のフェノール・クロロホルム (1:1 V/V) を加えて攪拌した後, 12,000 rpm で 15 分間遠心分離を行った。遠心分離後, 同様の操作を行った。回収した水層を 90°C で 5 分間加熱処理し, RT-PCR

法のテンプレートとして供試した。RT-PCR法はNishizawa et al. (1994)の方法にしたがって、Gene Amp RNA PCR Kit (Perkin Elmer Cetus)を用いてT4領域を増幅した。すなわちRT反応は2.5 UのMLV逆転写酵素、1.0 UのRNaseインヒビター、10 pMの下流プライマー(5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3')および1 mMのdNTPsを含む緩衝液中にテンプレート1 μ lを添加し、サーマルサイクラー (PERKIN ELMER 480, ASTEC PC-700またはTAKARA PJ 480)を用いて23°C-20分、42°C-30分、99°C-10分の処理を行った。PCR反応は、RT反応液に4倍量の10 pMの上流プライマー(5'-TCGCTGTGTACTGACTGTGC-3')と2.5 UのTaq DNAポリメラーゼを含むPCR緩衝液を加え、サーマルサイクラーで72°C-10分、95°C-2分処理した後、95°C-40秒、55°C-40秒、72°C-40秒の温度サイクルを25サイクル行って、最後に72°Cで5分間処理した。得られたPCR産物は、2%アガロースゲルで電気泳動した後、0.5 μ g/mlのエチジウムブロマイドを含むTAEバッファー(40 mM Tris-酢酸、1 mM EDTA)に浸漬して20分間染色し、目的とするバンドを確認した。

疫学調査

1993年9月21日から30日に、北海道内の吉岡、知内、鹿部、広尾におけるマツカワの中間育成場で飼育中の稚魚について、PCR法を用いてVNNウイルス保有状況の調査を行った。

1994年には3月28日から5月2日に、当場で養成中の雌親魚23尾から採卵を行った際に得られた卵巣腔液および、3月14日および6月3日に雄親魚から採取した精液を試料として、上記のPCR法によりウイルス保有状況を調査した。また、産卵初期の3月29、30、31日に得られたPCR陰性の卵と3尾の精液を用いて人工授精を行い、得られたふ化仔魚を用いた種苗生産過程におけるウイルス検出状況を調査した。さらに、当場が位置する厚岸周辺海域に生息する魚類および当場が放流し、再捕されたマツカワを対象にVNNウイルス保有状況の調査を行った。

1995年には陰性の卵およびふ化仔魚を用いた種苗生産過程におけるウイルス検出状況を調査した。

結 果

疾病の発生状況

過去の本疾病の発生状況を、当場の事業報告書をもとに調査した。1986年度から1989年度までの事業報告書には、本疾病と考えられる大量死や病魚の記載はなかった。1991年度の事業報告書では、1991年の7月上旬から開始した海上小割網による中間育成中に、収容5日目頃から大量死が発生し、8月中旬までに生残率が10%未満となり、これらの死亡魚は頭部の発赤が観察されたと報告されていた。このような大量死は陸上水槽で継続飼育されていた群でもほぼ同時期に確認され、海上小割網での飼育では、収容直後に5°Cの水温低下が、陸上水槽でも6°Cの水温低下が起こった後に大量死が発生したと報告されていた。また、詳細は明らかではないが、1990年度の事業報告書にも、1990年の海上小割網による中間育成中に同様の症状の死亡魚が確認されたと報告されていた。1992年度の事業報告書には、1992年の種苗生産過程での生残率が0~31%と1991年の90%を大きく下回ったが、1991年と同時期に行われた海上小割網による中間育成では99%以上の高い割合で飼育が可能であり、海上における水温の変動は緩やかであったと報告されていた。

1993年に本疾病が発生した群の当場での飼育結果をTable 1に示した。5ヶ月間の飼育により平均全長41 mmの群が110 mmまで成長したが、生残率は38%と著しく低かった。死亡の発生は平均全長70 mmとなった8月末からであった。死亡率は1日当たり最大で1%と比較的低かったものの、飼育期間を通して死亡が続いた。なお、飼育水温は飼育開始時の15°Cから終了時には4°C

Table 1. Survival rate of barfin flounder juveniles affected with VNN at Akkeshi Station of JASFA.

Start of rearing			Close of rearing			
Date	No. of juveniles	Average total length (mm)	Date	No. of survived juveniles	Average total length (mm)	Survival rate (%)
Jul. 26, 1993	3,874	41	Dec. 7, 1993	1,482	110	38.3

まで低下した。

伊達の中間育成場における飼育経過に伴うマツカワ種苗の累積死亡数および水温の推移を Fig. 1 に示した。飼育開始後 19 日目（ふ化後 89 日目）から 21 日目にかけて、水温が 13.5°C から 9.5°C へと急激な低下が起こった 2 週間後の 35 日目から死亡数の増加が始まった。80 日間の飼育期間中の累積死亡率は 24% に達した。また、森の中間育成場における同時期の累積死亡率は 28% であった。

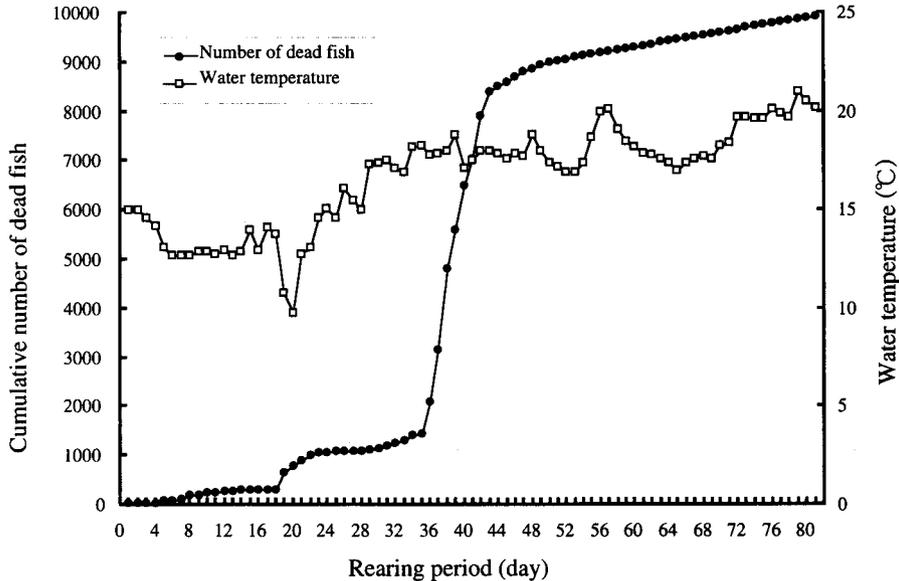


Fig. 1. Cumulative number of dead barfin flounder juvenile reared at Date farm in 1993.

病魚の症状

罹病していると考えられた個体は、摂餌はするものの遊泳せずに無眼側を水面に向けて水槽底に停位する行動が観察された。また、時にはけいれんを伴う異常遊泳を示す個体も認められた。外観観察では、口吻部および頭部の発赤が顕著 (Fig. 2) で、眼球の充血や突出が認められた。さらに、眼球の一部または全部が欠損または脱落しつつある個体も認められた。解剖所見では、外観が正常でも脳に出血が認められる個体も観察された。

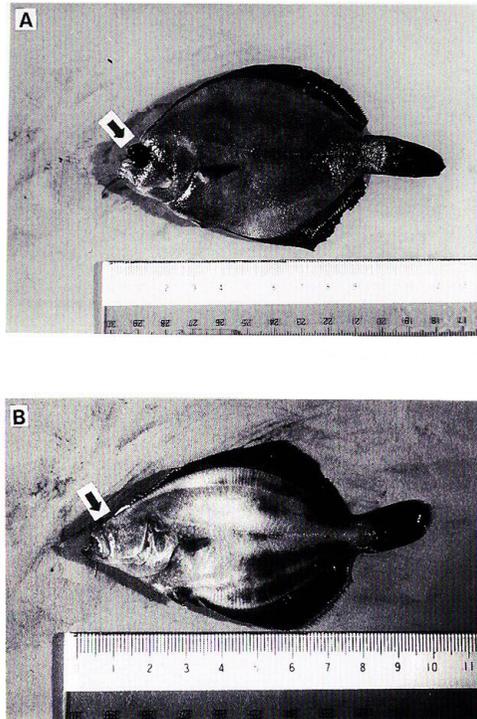


Fig. 2. Photographs showing affected barfin flounder juvenile by VNN.
A : ocular side,
B : blind side,
← : hemorrhage.

病理組織学的検査

病魚の眼球組織の光顕観察では、網膜下組織の一部、内顆粒層、内網状層および神経節細胞層に細胞の壊死崩壊による空胞が多少観察され、その空胞内に細胞が新しく増生している像が観察された (Fig. 3)。脳組織についても眼球と同様に神経細胞の崩壊によると考えられる空胞が観察された。病魚の眼球の組織の間接蛍光抗体法による観察で、網膜下の空胞部位に特異蛍光が観察された (Fig. 4)。電子顕微鏡による観察では、神経細胞の細胞質内に直径 27~28 nm のエンベロープを持たない球形のウイルス粒子が多数観察された (Fig. 5)。

PCR 法によるウイルス検査

マツカワ病魚の眼球および脳組織の核酸抽出物から PCR 法により VNN ウイルス遺伝子を増幅し、アガロース電気泳動法で PCR 産物の検出を行った結果、陽性対照としたシマアジ病魚から得られた増幅産物と同じサイズのおよそ 426 bp の PCR 産物が検出された。

前述の当场における飼育群の VNN ウイルス遺伝子の検出状況を Table 2 に示した。発症魚および外観正常魚を調査したが、ウイルス遺伝子の検出率は共に 80~100% で差はみられず、飼育期間を通して発症魚および外観正常魚からウイルスが検出された。飼育終了時のマツカワは最大で全長 150 mm に達し、外観上は正常と思われたが、その脳からウイルス遺伝子が検出された。また、

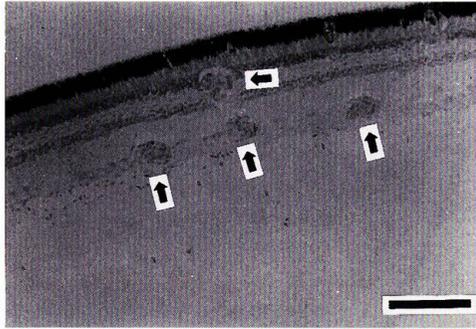


Fig. 3. Light micrograph showing vacuolation in the retina of affected barfin flounder juvenile by VNN.

← : vacuolation,
Bar : 100 μ m.

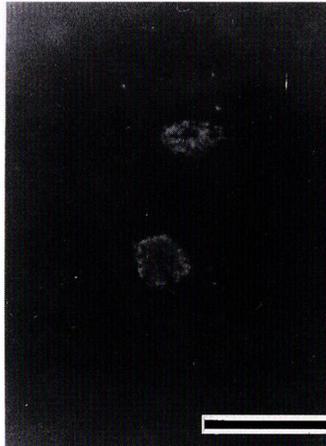


Fig. 4. Specific fluorescence in the affected nerve cells in retina by FAT.

Bar : 100 μ m.

他の中間育成場で飼育中の稚魚における VNN ウイルス遺伝子の検出状況を Table 3 に示した。病魚が確認された森における検出率は 60%、伊達では 15% であった。病魚が確認されなかった知内、鹿部、吉岡および広尾の稚魚からは、ウイルス遺伝子は検出されなかった。

当场および森の中間育成施設のマツカワ病魚の各臓器から、PCR 法により VNN ウイルス遺伝子を増幅した結果、増幅が確認されたのは眼球および脳のみであった (Table 4)。

親魚からのウイルス検出状況

当场で養成中の雌親魚の卵巣腔液から PCR 法により VNN ウイルス遺伝子を増幅した結果、ウイルス遺伝子が検出された割合は、採卵を繰り返すにしたがって増加した (Fig. 6)。

当场で養成中の雄親魚の精液から PCR 法により VNN ウイルス遺伝子を増幅した結果を Table 5 に示した。雌の産卵初期にあたる 3 月には、ウイルス遺伝子が検出される雄個体は存在し

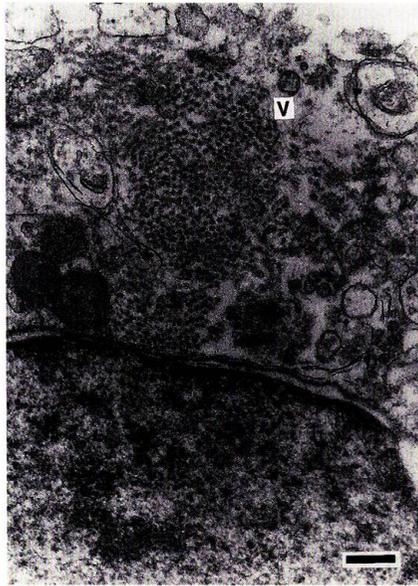


Fig. 5. Electron micrograph showing numerous viral particles in the cytoplasm of a retina cell.
 V : viral particles,
 Bar : 200 nm.

Table 2. Detection rate of VNNV gene from barfin flounder juveniles reared at Akkeshi Station of JASFA.

Date	Sample	Checked organ	Total length (Mean : mm)	No. of positive sample /No. of examined sample	Detection rate (%)
28, Sep. 1993	Diseased fish	Eyes & Brain	Not measured	2/2	100
26, Oct. 1993	Normal fish	Eyes & Brain	109	4/5	80
2, Nov. 1993	Diseased fish	Eyes & Brain	Not measured	7/8	87.5
16, Dec. 1993	Normal fish	Brain	110	12/12	100

Table 3. Detection rate of VNNV gene from barfin flounder juveniles reared at intermediate rearing sites.

Rearing site	Sampling date	Examined date	Total length (mm)	No. of positive sample /No. of examined sample	Detection rate (%)
Mori	26, Aug. 1993	21, Sep. 1993	63 - 157	6/10	60.0
Date	26, Aug. 1993	21, Sep. 1993	80 - 139	3/20	15.0
Shiriuchi	11, Aug. 1993	21, Sep. 1993	Not measured	0/2	0
Shikabe	28, Sep. 1993	29, Sep. 1993	Not measured	0/2	0
Yoshioka	11, Aug. 1993	30, Sep. 1993	Not measured	0/2	0
Yoshioka	29, Sep. 1993	30, Sep. 1993	Not measured	0/2	0
Hiroo	29, Sep. 1993	30, Sep. 1993	Not measured	0/2	0

Table 4. Detection of VNNV specific gene from different organs of affected barfin flounder reared at Akkeshi Station of JASFA and Mori farm.

Tissues	No. of positive sample /No. of examined sample				
Eye	3/3				
Brain	3/3				
Stomach	0/3				
Kidney	0/3				
Spleen	0/3				
Liver	0/3				
Intestine	0/3 </tr <tr> <td>Muscle</td> <td>0/3</td> </tr> <tr> <td>Heart</td> <td>0/3</td> </tr>	Muscle	0/3	Heart	0/3
Muscle	0/3				
Heart	0/3				

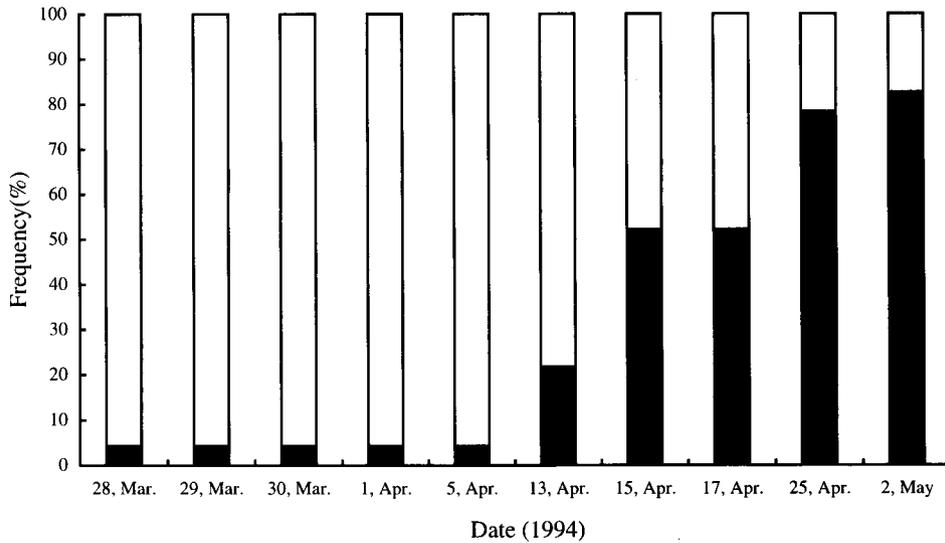


Fig. 6. Detection rate of VNNV gene from egg fluid by RT-PCR.

PCR negative,
 PCR positive.

なかったが、末期の6月には60%の個体の精液からウイルス遺伝子が検出された。

種苗生産過程におけるウイルス検出状況

1994年の種苗生産では、産卵初期のPCR陰性の卵から得られたPCR陰性のふ化仔魚を用いたが、種苗生産水槽に収容した翌日に大量死が確認され、死亡魚および生存魚からVNNウイルス遺伝子が検出された。

1995年の種苗生産過程における、VNNウイルス遺伝子の検出状況をTable 6に示した。1回次にはPCR検査で陰性のふ化仔魚を収容して飼育を行ったところ、ウイルス遺伝子が検出される

渡辺ら：マツカワにおけるウイルス性神経壊死症の発生

Table 5. Detection rate of VNNV gene from sperm of barfin flounder reared at Akkeshi Station of JASFA.

Date	No. of positive sample / No. of examined sample	Detection rate (%)
14, Mar. 1994	0/104	0.0
3, Jun. 1994	3/5	60.0

ことなく全長 25 mm の稚魚を 60% の生残率で生産することができた。2, 3, 4 回次には PCR 陰性の仔魚を用いたものの、ふ化後 5~25 日目までにウイルス遺伝子が検出された。これらの回次での生残率は、全長 25 mm の時点で 15~51% であった。

Table 6. Detection of VNNV gene from barfin flounder on seed production in 1995 at Akkeshi Station of JASFA.

Round of seed production	Days after hatching										Survival rate (%)
	0	5	10	15	20	25	30	40	50	60	
1	0/6* ¹	0/6	0/6	0/12	0/12	0/15	0/20	ND* ²	ND	0/18	60.0
2	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	1/12	2/20	ND	6/6	0/12	51.4
3	0/6	4/6	0/6	3/10	0/12	0/15	0/30	4/10	5/10	0/10	14.9
4	0/6	0/6	0/9	0/10	0/9	9/15	0/20	4/10	0/10	0/10	43.0

*¹ Number of positive sample/Number of examined sample.

*² Not done.

厚岸周辺海域に生息する魚類のウイルス保有状況

1994 年に、厚岸周辺海域に生息する魚類のウイルス保有状況を PCR 法を用いて調査した。厚岸湖内で漁獲されたクロガシラガレイ、クロガレイ、トウガレイ、ヌマガレイからウイルス遺伝子がそれぞれ 25%, 38%, 30%, 23% の割合で検出された (Table 7)。しかしながら、同じカレイ類でも厚岸湾で漁獲されたソウハチ、ヒレグロからは検出されなかった。また、厚岸湖内で漁獲されたシラウオから 27% の割合で VNN ウイルス遺伝子が検出されたが、カラフトマス、シモフリカジカ、ギスカジカからは検出されなかった。厚岸湾で漁獲されたウサギアイナメからも検出されなかった。

放流され、再捕されたマツカワの VNN ウイルス保有状況を調査したところ、1 歳魚で 50%、2 歳魚で 24% の個体から VNN ウイルス遺伝子が検出された。

考 察

マツカワ病魚の症状、病理組織学的検査およびウイルス検査結果から、本疾病をウイルス性神経壊死症であると診断した。原因ウイルスは、シマアジのウイルス性神経壊死症原因ウイルスの検出のために開発された PCR 法により、その遺伝子の一部を増幅することができたことから、SJNNV に非常に近いウイルスであることが示唆される。Nishizawa et al. (1996a) はマツカワのウイルス性神経壊死症原因ウイルスを BFNNV と名付け、SJNNV を基準として BFNNV、

Table 7. Detection rate of VNNV gene from various fish species obtained from Akkeshi bay and Akkeshi lake.

Japanese name	Scientific name or reference	Checked organ	Total length (Mean : mm)	No. of positive sample /No. of examined sample	Detection rate (%)
Shirauo	<i>Salangichthys monodon</i>	Brain	93	3/11	27.3
Karahutomasu	<i>Onchorhynchus gorbuscha</i>	Brain	165	0/4	0
Usagiainame	<i>Hexagrammos lagocephalus</i>	Brain	366	0/10	0
Shimohurikajika	<i>Myoxocephalus brandti</i>	Brain	245	0/5	0
Gisukajika	<i>Myoxocephalus stelleri</i>	Brain	219	0/5	0
Kurogashiragarei	<i>Pleuronectes schrenki</i>	Brain	240	2/8	25.0
Kurogarei	<i>Pleuronectes obscurus</i>	Brain	121	8/21	38.1
Tougarei	<i>Pleuronectes pinnifasciatus</i>	Brain	226	3/10	30.0
Souhachi	<i>Cleisthenes p. herzensteini</i>	Brain	302	0/13	0
Hireguro	<i>Glyptocephalus stelleri</i>	Brain	273	0/10	0
Numagarei	<i>Platichthys stellatus</i>	Brain	157	3/13	23.1
Matsukawa	Recaptured 1 year old fish	Brain	129	31/61	50.8
Matsukawa	Recaptured 2 years old fish	Brain	277	15/62	24.2

TPNNV (トラフグの神経壊死症ウイルス)、JFNNV (ヒラメの神経壊死症ウイルス) および RGNNV (キジハタの神経壊死症ウイルス) との間で外被タンパク質遺伝子の T2 領域の塩基配列を比較した。その結果、BFNNV は SJNNV と 75.8% の類似性を示したが、他の原因ウイルスは SJNNV と 77.4~80.0% の類似性を示し、BFNNV の類似性が最も低かったことを報告している。さらに Nishizawa et al. (1997) は、T4 領域の塩基配列から分子系統樹を作成し、BFNNV は SJNNV と同一のクラスターを形成せず、別のウイルスタイプであることを明らかにした。これらのことは、BFNNV が SJNNV を特異的に検出する PCR 法により検出できるものの、その塩基配列は異なっていることを示している。しかし、本ウイルスは抗 SJNNV ウサギ血清を用いた蛍光抗体法で特異蛍光が確認され、共通抗原を有していたことから、オリジンのウイルスが宿主域を広げていく過程で、塩基配列に変異が生じたものと考えられる。

本疾病は、1991 年の厚岸における海上小割網での中間育成事例や 1993 年の伊達における中間育成事例では、飼育中の水温の急激な低下後、死亡数が増加している。しかし水温急低下現象が認められなかった 1992 年の中間育成事例では、死亡数の増加は認められていない。1992 年の種苗生産においては、原因不明の死亡により低生残率となったが、生残魚を放流したところ、再捕された個体の脳から 24% の割合でウイルス遺伝子が検出され、仔稚魚期に VNN が発生していた可能性が推測され、中間育成を行った群も VNN ウイルスを保有していたものと考えられる。これらのことから、水温の急激な変動をはじめとする種々の要因により稚魚の生理状態が悪化し、微量に感染していたウイルスが増殖して発病することが推測される。また、マツカワの VNN は稚魚期に発生した後、4ヶ月間以上にわたって死亡が継続するのが特徴である。これは、水槽内で発症した稚魚から水平感染により正常な稚魚に伝播し、次々に発症したためと考えられる。シマアジでは、疾病の発生は仔魚期にほぼ限られ、ほとんど直ちに全滅する (有元ら, 1994)。マツカワで稚魚期に発生し、死亡が長期間継続したことと比較すると、発生状況は著しく異なる。この要因として、宿主の感受性の違い、ウイルスのタイプの違いおよび飼育水温の違いなどが考えられるが、今後の検討課題である。

シマアジでは親魚が本疾病の主たる感染源であることが明らかにされているが (Arimoto et al., 1992, Mushiake et al., 1992), マツカワでも雌雄ともに親魚の生殖産物からウイルス遺伝子が検出され、ウイルスが検出される個体の割合は 60~80% 以上にも達したことから、親魚が本疾病の主たる感染源であることが推察される。1995 年の種苗生産においては、4 水槽中 1 水槽では検出されることなく稚魚を生産することができたものの、3 水槽でウイルス遺伝子が検出された。このことは、ふ化仔魚の段階で検出限界以下であったウイルスが、仔魚の成長と共に増加して検出されたものと考えられ、本疾病の主たる感染経路が親魚であることを示唆するものと考ええる。また、飼育途中でウイルス遺伝子が検出されても稚魚を生産することができたことから、本ウイルスは存在しても必ずしも発症するものではないと考えられ、上記の通り水温の激変といった仔稚魚の生理状態を悪化させる要因により発症が誘発されるものと推察される。

厚岸海域に生息する魚類の VNN ウイルス遺伝子保有状況を調査したところ、マツカワと同じカレイ類であるクロガシラガレイ、クロガレイ、トウガレイ、ヌマガレイが保有していることが明らかとなった。一方、放流したマツカワからもウイルス遺伝子が検出されていることから、今後放流魚と天然魚間のウイルス感染状況の解明を進めていく必要がある。

マツカワは、北日本の栽培漁業対象種として期待されており、本疾病の防除対策を開発することは急務である。シマアジでは、親魚の選別を主とした本疾病の防除対策が確立されており (Mushiake et al., 1992, 虫明ら, 1993, Mushiake et al., 1994, Mori et al., 1998), マツカワでもこれらを参考にしながら親魚の選別技術、親魚養成技術、垂直感染の防除技術および水平感染の防除技術を開発している (Watanabe et al., 1998)。また、本ウイルスは SB 細胞 (Lim et al., 1998) およ

び SSN-1 細胞 (Frerichs et al., 1996) により分離される。一般に培養細胞によるウイルス分離は、接種した試料中に感染ウイルス粒子が存在すれば細胞変性効果が得られるために、試料中の感染ウイルス粒子を検出することができる。一方、PCR 法によるウイルス遺伝子の検出も感度の高い方法であるが、シマアジでは PCR 法により選別した親魚から得られた仔魚群に VNN が発生した例が報告されており (Nishizawa et al., 1996b), また、本研究で明らかとなったようにマツカワでも同様であったことから、より確実なウイルス検出法の開発が望まれる。したがって、サケ・マス類における親魚からのウイルス分離 (Yoshimizu et al., 1985) と同様に、SB 細胞または SSN-1 細胞を用いて VNN ウイルスを分離し、親魚の選別を行う方法を開発することも今後の重要な課題であろう。

謝 辞

本研究に当たり、抗 SJNNV ウサギ血清を広島大学生物生産学部中井敏博博士より分与いただいた。PCR 法の実施に関して広島大学生物生産学部西澤豊彦博士に一方ならぬご指導をいただいた。伊達および森の中間育成場の担当者の方々にはデータ収集にご協力いただいた。マツカワ稚魚の PCR 法による検査の一部は、(社) 日本栽培漁業協会五島事業場有元操主任技術員 (現: 上浦事業場場長)、佐藤純技術員 (現: 志布志事業場) および西日本支部西岡豊弘技術員 (現: 五島事業場) にお願した。本研究の実施にあたり、今村茂生場長 (現: 第 2 技術部長) はじめ、当場の関係各位にご協力いただいた。ここに記して、これらの方々に深謝の意を表する。

文 献

- Arimoto, M., Mushiake, K., Mizuta, Y., Nakai, T., Muroga, K. and Furusawa, I. (1992). Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathol.*, **27**, 191-195.
- 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.
- Frerichs, G.N., Rodger, H.D. and Peric, Z. (1996). Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Gen. Virol.*, **77**, 2067-2071.
- Fukuda, Y., Nguyen, H.D., Furuhashi, M. and Nakai, T. (1996). Mass mortality of cultured seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathol.*, **31**, 165-170.
- Lim, C.M., Chong, S.Y. and Yoshimizu, M. (1998). A nodavirus isolated from grouper (*Epinephelus tauvina*) and seabass (*Lates calcarifer*). *Fish Pathol.*, **33**, 447-448.
- Mori, K., Nakai, T., Nagahara, M., Muroga, K., Mekuchi, T. and Kanno, T. (1991). A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Fish Pathol.*, **26**, 209-210.
- Mori, K., Mushiake, K. and Arimoto, M. (1998). Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. *Fish Pathol.*, **33**, 443-444.
- 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**, 473-480.
- Mushiake, K., Arimoto, M., Furusawa, T., Furusawa, I., Nakai, T. and Muroga, K. (1992). Detection of antibodies against striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) from brood stocks of striped jack. *Fisheries Sci.*, **58**, 2351-2356.
- 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**, 327-332.
- Mushiake, K., Nishizawa, T., Nakai, T., Furusawa, I. and Muroga, K. (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.
- 中井敏博・Nguyen H.D.・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**, 211-212.
- Nguyen, H.D., Mekuchi, T., Imura, K., Nakai, T., Nishizawa, T. and Muroga, K. (1994). Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci.*, **60**, 551-554.
- Nishizawa, T., Mori, K., Nakai, T., Furusawa, I. and Muroga, K. (1994). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Org.*, **18**, 103-107.
- Nishizawa, T., Mori, K., Furuhashi, M., Nakai, T., Furusawa, I. and Muroga, K. (1996a). Comparison of the coat protein genes of five nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *J. Gen. Virol.*, **76**, 1563-1569.
- Nishizawa, T., Muroga, K. and Arimoto, M. (1996b). 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**, 332-334.
- Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T., Nakai, T. and Muroga, K. (1997). Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1633-1636.
- 宋 振栄・金井欣也・吉越一馬・新山 洋・本田敦司・浦賢二郎 (1997). 種苗生産過程で発生したウイルス性神経壊死症によるコチ仔・稚魚の大量死. 水産増殖, **45**, 241-246.
- 鄭 星珠・宮崎照雄・宮田雅人・大石 巧 (1996). 神経壊死症ウイルスの新宿主スズキにおける病理組織像. 三重大生物資源紀要, **16**, 9-16.
- Watanabe, K., Suzuki, S., Nishizawa, T., Suzuki, K., Yoshimizu, M. and Ezura, Y. (1998). Control strategy for viral nervous necrosis of barfin flounder. *Fish Pathol.*, **33**, 445-446.
- Yoshikoshi, K. and Inoue, K. (1990). Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, **13**, 69-77.
- Yoshimizu, M., Kimura, T. and Winton, J.R. (1985). An improved technique for collecting reproductive fluid samples from salmonid fishes. *Prog. Fish-Cult.*, **47**, 199-200.