



Title	魚類ウイルス病とその防疫・防除に関する研究
Author(s)	吉水, 守
Description	平成23年度日本水産学会賞
Citation	日本水産学会誌, 78(3), 358-367 https://doi.org/10.2331/suisan.78.358
Issue Date	2012-05-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53351
Rights	© 2012 公益社団法人日本水産学会
Type	journal article
File Information	sosetsu44.pdf



平成 23 年度水産学会賞

魚類ウイルス病とその防疫・防除に関する研究

吉 水 守

北海道大学大学院水産科学研究院

Studies on fish viral diseases and those prevention and control methods

MAMORU YOSHIMIZU

Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan

1. はじめに

1960年代後半から、マスノスケ *Oncorhynchus tshawytscha* およびベニザケ *O. nerka* をわが国に資源として定着させようという試みが行なわれていた。その最中の1971年に、道南のふ化場で飼育中のヒメマス *O. nerka* 稚魚が大量に死亡した。翌年、道東のふ化場でもヒメマス稚魚とアラスカから卵で移植したベニザケ稚魚の大量死が起こった。当初は細菌病が疑われたが、原因は伝染性造血器壊死症 (IHN: infectious hematopoietic necrosis) ウイルスであることが判明した。¹⁾ 当時、卒業研究のサケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究に没頭していたが、恩師木村喬久先生のニジマス *O. mykiss* 卵巣由来細胞の培養を手伝い、IHN ウイルスによる細胞変性効果を見る機会に恵まれた。それまで、わが国にはIHNの発症例がなく、種卵および種苗の移動等の経緯²⁾ から、アラスカから移植されたベニザケ卵と共にIHNウイルスが道内に侵入したと考えられた。³⁾ 同じころ、アラスカでも本病の最初の発生が報告された。当時分離したIHNウイルスは、その後の遺伝子解析で、アラスカを含む北米のウイルスと同じタイプのウイルスであることが明らかになった。⁴⁾ 1974年からIHNは本州各地のニジマス *O. mykiss* に広がり大きな問題となり、河川湖沼養殖研究会で防疫対策の研究が開始され、⁵⁾ 後段で紹介する防疫対策を対象魚種と病気に応じて組み合わせる方法が功を奏し、現在、大量死は見られなくなっている。1976年から北海道内および東北地方のサケ・マス類の採卵親魚を対象に病原ウイルスと細菌の分布調査を始め、北海道内は現在も継続している。⁶⁾ この間にサケ科魚類からは新種のウイルスが3種見つかった。1978年にサケ科魚類に肝炎を起こし、生き残った魚の口部に上皮腫を引き起こす、魚で最初の腫瘍原性ヘルペスウイ

ルスが分離された。Oncogenic な *Oncorhynchus masou* 由来のウイルスとして *Oncorhynchus masou virus* (OMV) と名づけられた。^{7,8)} 2番目は同年、サケからレオウイルスが分離され chum salmon virus (CSV) と名づけられた。⁹⁾ こちらは病原性がないウイルスであった。3番目は1991年にギンザケから分離され、神経に感染して軸索を壊すために異常遊泳を引き起こすウイルス性旋回病 (VWD: viral whirling disease) の原因ウイルスが分離された。¹⁰⁾ 翌1992年には北海道の多くの河川に遡上したサケ・カラフトマス・サクラマスからIHNウイルスが分離された。水産庁は事態を重視し、緊急に防疫対策会議を開催し、全道の孵化場を対象に全魚種の発眼卵を消毒することを決め、直ちに実施された。IHNウイルスは翌年以降分離されることはなく、発眼卵消毒は現在まで継続されている。海産魚の養殖および栽培事業が盛んになるにつれ、1980年代後半になって、それぞれの対象魚種でウイルス病が問題となり、その対策の確立が急がれた。今回、これらのウイルス病とその防疫対策について、その概略を紹介し、飼育魚種と対象疾病ごとのリスク管理手法を導入した防疫対策導入の必要性を紹介する。

2. 魚類のウイルス病研究の歴史

コイのボックス (pox) やカレイ類のリンホシスチス病 (LCD: lymphocystis disease) は、外観症状が特徴的で慢性的に経過することから広く人々の目に留まり、古くは18世紀に記載をみることができる。しかし、病原体としてのウイルスの研究が始まったのは1950年代になってからであり、¹¹⁾ まず、米国東部およびカナダのカワマスおよびニジマスの伝染性膵臓壊死症 (IPN: infectious pancreatic necrosis) が濾過性の病原体による

ことが明らかになった。しかし、当時は魚類の培養細胞がなく、ニジマスの尾鰭を用いた初代培養細胞により、1960年に原因ウイルスが分離された。同時期、米国西部のベニザケならびにマスノスケに認められた風土病様の病気も濾過性の病原体によることが明らかになった。1960年代に入り、ニジマスの生殖腺組織由来 RTG-2 細胞¹²⁾およびマスノスケの胚由来 CHSE-214 細胞が樹立され、¹³⁾ 前記 IPN ウイルスをはじめベニザケおよびマスノスケからウイルスが分離された。このベニザケおよびマスノスケからのウイルスは IHN ウイルスと名付けられ、¹⁴⁾ IPNV および IHNV の分離が魚類ウイルスおよびウイルス病研究の始まりとなった。以来、次々と魚類由来株化細胞が樹立され、1994年の Fryer and Lannan¹⁵⁾ の総説には 34 科 74 種から樹立された 137 株の魚類由来培養細胞が記載されている。これと並行して魚類のウイルス病の研究も進み、原因が不明であったサケ科魚類のエグドベト病やコイの伝染性腹水症（正確にはその一部）がウイルス病であることが明らかとなり、ウイルス性出血性敗血症（VHS: viral haemorrhagic septicemia）および春ウイルス血症（SVC: spring viremia of carp）なる名称が提案され、原因ウイルスも分離された。¹¹⁾ このような経緯から、魚類のウイルス病および原因ウイルスの研究は、まず、北米、欧州および日本で産業的に被害の大きかったサケ科魚類およびコイ科魚類が研究の対象となった。近年になって種々の魚類、甲殻類、軟体動物が増養殖の対象になり、種苗生産施設および養殖場で魚類、エビ類および一部の貝類の病気が大きな問題になっている。¹⁶⁾

魚類に致死性の病気を引き起こすウイルスのうち分離培養が可能なものによる病気として、北米・欧州・日本のサケ科魚類の IPN および IHN、日本のサケ科魚ヘルペスウイルス病（OMVD）およびウイルス性旋回病（VWD）、欧州のニジマスの VHS、伝染性サケ貧血症（ISA: infectious salmon anemia）、コイの SVC、コイヘルペスウイルス病（koi herpes virus disease）、ウイルス性乳頭腫症（viral papilloma）、オーストラリアのレッドフィンパーチの流行性造血器壊死症（enzootic hematopoietic necrosis）、アメリカナマズのウイルス病（channel catfish viral disease）、シロチョウザメのイリドウイルス病（white stergine iridoviral disease）、ウナギでは日本およびヨーロッパのヘルペスウイルス性鰓糸壊死症（herpesviral gill filament necrosis）、日本のウナギの血管内皮壊死症（viral endothelial cell necrosis）、ラブドウイルス性皮膚炎（rhabdoviral dermatitis）などがあり、さらに海産魚のウイルス病としてはブリやヒラメのウイルス性腹水症（viral ascites）、ヒラメ等海産魚のラブドウイルス病（hirame rhabdovirus disease）、マダイ等多くの海産魚のイリドウイルス病（red seabream

iridoviral disease）、ウイルス性神経壊死症（viral nervous necrosis）などが知られている。^{11,17)}

これらウイルスが分離されている病気に加え、原因ウイルスの分離・培養には成功していないが、ウイルス粒子が病患部組織などに電子顕微鏡によって観察され、感染試験によりウイルスが原因であることが確認されている病気も多くある。古くから知られているものとしては種々の海産魚・淡水魚の LCD（近年ヒラメやヨーロッパヘダイの LCD ウイルスは宿主由来の培養細胞を用いることで分離が可能になった）、サケ科魚類のウイルス性赤血球壊死症（viral erythrocytic necrosis）、赤血球封入体症候群（erythrocytic inclusion body syndrome）、ウイルス性コイ浮腫症（viral edema of carp）、キンギョのヘルペスウイルス性造血器壊死症病（herpesviral hematopoietic necrosis）、アユの異形細胞性鰓病（atypical cellular gill disease）、ヒラメの表皮増生症（viral epidermal hyperplasia）、トラフグの口白症（kuchijirosho）などがある。

また魚類の腫瘍の中には、上記のサケ科魚ヘルペスウイルスによる基底細胞上皮腫、コイヘルペスウイルス（CyHV 1）による乳頭腫、バイクやウオールアイの肉腫の他、ウイルスが原因と考えられるものはいくつか知られている。¹⁸⁾

わが国で報告された魚類のウイルス病を表 1 に示した。上記のウイルス病および原因ウイルスに関しては多くの教科書および総説・解説が出版されている。代表的なものとしては魚介類の感染症・寄生虫病、¹⁹⁾ 改訂・魚病学概論、²⁰⁾ 魚病学、²¹⁾ 新魚病図鑑、²²⁾ Fish Virus and Fish Viral Disease¹¹⁾ などがあげられる。誌面の関係から詳細については、これらを参照頂ければ幸いである。

わが国では栽培漁業の進展に伴い各地の栽培漁業センターあるいは種苗生産施設で多くの魚種の種苗が生産されるにつれ、それぞれの魚種で新しいウイルス病の被害が報告されるようになった。特にシマアジ、キジハタ、ヒラメ、トラフグ、マツカワ等の海産仔稚に見られたウイルス性神経壊死症およびヒラメ、キツネメバル等のウイルス性表皮増生症は、一時各地で壊滅的な打撃を与え、種苗生産時におけるウイルス病対策の重要性を提起した。^{23,24)} 外国では北欧およびチリのタイセイヨウサケの IPN や伝染性サケ貧血症（infectious salmon anemia）が問題となっている。

3. 魚類培養細胞

魚類のウイルス病研究の基礎として、原因ウイルスの分離・同定、性状検査等に宿主由来の培養細胞が不可欠である。前述のように 1960 年以降、サケ科魚類を中心に魚類由来培養細胞が樹立された。日本でも、著者らの研究室を主体に 2000 年の時点で 57 種の魚類由来細胞

表1 わが国で見られた魚類の主要なウイルス病

サケ科魚類・病名	原因ウイルス	症 状
伝染性脾臓壊死症	IPNV	キリミ状旋回遊泳と突然の大量死
伝染性造血器壊死症	IHN	貧血と体表のV字状出血を伴う大量死
サケ科魚ヘルペスウイルス病	OMV	肝炎と体表の潰瘍および腫瘍の形成
赤血球封入体症候群	EIBSV	赤血球の細胞質に封入体、極度の貧血
ウイルス性旋回病	VWDV	回転を伴う旋回遊泳
ウイルス性赤血球壊死症	VENV	赤血球の細胞質に封入体
レオウイルス感染症	CSV	環境変化による死亡
温水魚・病名	原因ウイルス	症 状
ウイルス性乳頭腫腫症	CyHV-1	コイの鰭の上皮腫
ウイルス性コイ浮腫症	VECV	浮腫
ウイルス性眠り病	VECV	遊泳緩慢
コイヘルペスウイルス病	KHV	鰓の壊死、眼房陥没、粘液分泌
ヘルペスウイルス性造血器壊死症	CyHV-2	キンギョの造血器壊死
ウイルス性血管内皮壊死症	VECNV	ウナギの血管内皮細胞の壊死
ヘルペスウイルス性鰓弁壊死症	AngHV-1	ウナギの鰓弁壊死
ラブドウイルス性皮膚炎	EeRhabd	ウナギの皮膚炎
海産魚・病名	原因ウイルス	主な感染魚
リンホシスチス病	LCDV	マダイ、ヒラメ、スズキ、ブリ
ウイルス性腹水症	YTAV	ブリ、ヒラメ
ウイルス性変形症	YTAV	ブリ
ヒラメラブドウイルス病	HIRRV	ヒラメ、クロダイ
ウイルス性出血性敗血症	VHSV	ヒラメ
ウイルス性表皮増生症	FHV*	ヒラメ、キツネメバル、マツカワ
マダイイリドウイルス病	RSIV	マダイ、ブリ
ウイルス性神経壊死症	VNNV	シマアジ、キジハタ、マツカワ、クエ
口白症	sDNAV	トラフグ
特定疾病	原因ウイルス	症 状
流行性造血器壊死症	ENV	体色黒化、運動失調、摂餌低下
ウイルス性出血性敗血症*	VHSV	サケ科：貧血と筋肉内出血、成魚も発症
コイ春ウイルス血症	SVCV	コイ科：鰓の貧血と各臓器の点状出血

が継代維持されている。²⁵⁾ 魚類細胞を作出する場合、1960年代から長くトリプシン消化法が用いられてきたが、成功率が低く難しい手法であった。著者らが Leibovitz の L-15 培地を用いた直播き法（図1）を紹介して以来、日本国内をはじめ世界各地で本法により細胞が樹立され、海産魚を含め多くの魚種で細胞が整備され

た。

魚類培養細胞は Eagle の最小必須培地（MEM）を基礎培地に、炭酸緩衝液を使用して CO₂ インキュベーターを用いて培養した場合と Tris および HEPES 緩衝液を用いた場合、さらに前述の L-15 培地あるいは 199 培地を用いた場合の細胞の増殖を比較すると、いずれの培地でも増殖し、海産魚由来細胞を含め、食塩濃度 0.116～0.171 M で増殖可能である。至適発育温度は棲息水温に依存し、サケ・マス類由来細胞が 15～20℃、温水魚由来細胞は 20～30℃ である。染色体は 2n のものが大部分であるが、継代数の増加につれ染色体数が増加して 3 倍量になっているものが多い。一方で EPC 細胞のように、半数 (n) になっている細胞も存在する。ヒトおよび家畜の細胞培養には CO₂ インキュベーターが広く用いられているが、魚類細胞の多くは培養温度が低く、冷却装置を備えたインキュベーターが必要となる。低温 CO₂ インキュベーターは高価となることから、L-15 培地あるいは MEM-Tris 培地が広く用いられ、プレートにはシールを貼ることが一般的である。^{26,27)}

細胞を凍結する場合、FBS あるいは MEM₁₀Tris に DMSO、グリセリンあるいはレバンを 10% の割合に加え、凍結時の温度勾配を 0.3～1.0℃/min とし、0℃ から -60℃ あるいは -80℃ までこの条件で下げ、その後液体窒素中に保存する方法を推奨している。この温度条件は発泡スチロール製の断熱ボックスを使用しても得られ、この条件で細胞は少なくとも 10 年間は生存率 85% 以上で保存されている。^{28,29)} 現在、25 年が経過しているが保存状態に問題はない。-80℃ では数年が限界とされてきたが、昨年 23 年を経過した EK-1 細胞の培養が可能であった。

なお、甲殻類のエビ・カニ類や軟体動物の貝類由来の株化細胞はほとんどなく、これら水棲無脊椎動物のウイルス病研究に大きな障害となっている。株化は困難であるが、血リンパ細胞の初代培養は可能であり、^{30,31)} ホタテ貝では筋肉エキスを 10% 添加海水培地にインシュリンを添加することにより 6 ヶ月程度は維持が可能となっている。

4. 防疫対策

魚類は稚仔魚期に免疫応答が成立するまでにかなりの時間を要する。サケ科魚類の場合、液性免疫応答が見られるのは 0.3～0.5 g 前後、カレイ類のマツカワでは約 15 g である。³²⁾ 現在、ワクチン開発が精力的に進められているが、ワクチンが利用できるようになっても、この期間およびワクチン投与後、免疫応答が成立するまでの期間は防疫対策を実施する必要がある。陸上施設での孵化、種苗生産ではこの期間、有効な防疫対策を講じることにより、病気の発生を抑えることができるようになっ

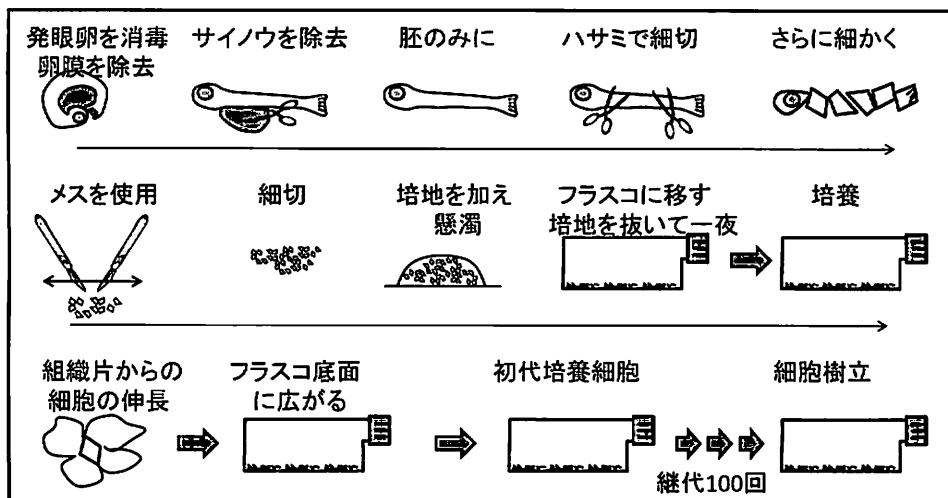


図1 直播き法による魚類培養細胞の作出法

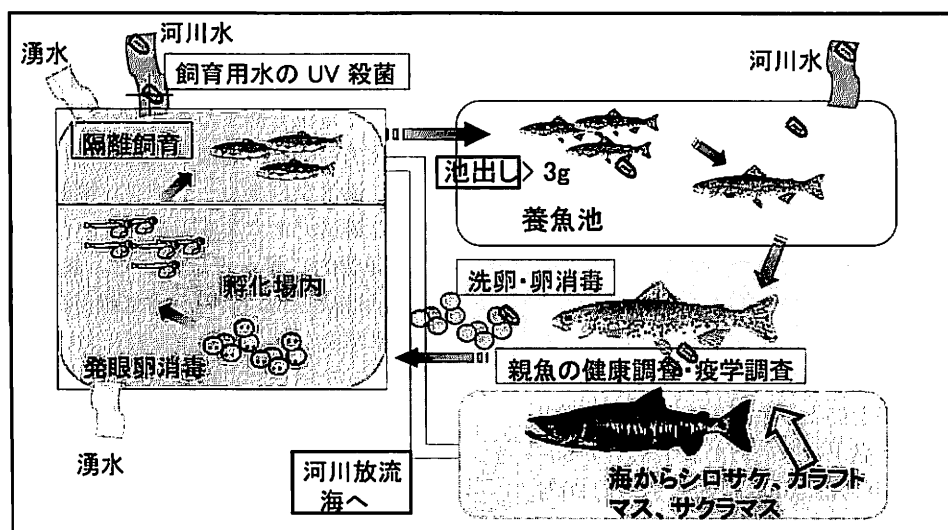


図2 サケ科魚類の増養殖場で実施されている防疫対策

ている。^{33,34)} 現在採用されている孵化場あるいは種苗生産施設における疾病防除対策は、飼育器具・機材および施設の衛生管理、病原体フリー飼育水の確保、健康親魚の確保あるいは選別、卵洗浄および消毒、稚仔魚の健苗性の確認のための病原体検査、飼育水温の管理、飼育排水の殺菌等である(図2)。³⁴⁾ 飼育池あるいは生簀への移動および放流に際しての防疫対策は健苗性の確認とワクチン投与である。さらに養殖に際しては耐病系統の確立などが求められている。³⁵⁾ 魚類防疫に関しても、魚種および病原体ごとのリスク評価を行い、重要な管理点の抽出とその実施記録が重要である。

1) 飼育器具・機材および施設の衛生管理

作業者の手指や長靴をはじめ、陸上施設では飼育水槽、飼育器具・機材の微生物管理が病原体の伝播防止上

きわめて重要である。飼育水槽、飼育池、生け簀等の飼育施設は種苗の搬入前に病原体を殺菌あるいは排除しておく必要があり、飼育器具および機材は日頃から常時消毒し防疫に努める必要がある。³³⁾

消毒薬は種類が多く、その作用機序も異なり、また病原体によって感受性も異なる。さらに水棲生物は種ごとに飼育温度や塩分濃度も異なり、病原体ごとに適切な消毒薬を選択する必要がある。³⁶⁾ 各種消毒薬の中で、魚介類に対し比較的毒性が少なく、除去が容易でかつ多量に使用しても安価なものが用いられている。幸い魚類の病原細菌およびウイルスは、いずれも市販の公称有効濃度で十分殺菌・不活化されるが、冬期間の低温下での使用や飼育魚の糞・残餌、体表粘液等有機物が付着した対象物の殺菌には一部不適な消毒薬がある。塩素やヨードと

いったハロゲン系の消毒薬は低温下でも効果の減少は見られないものの、反復使用は避けるべきであり、アルデヒド系の消毒薬は反復使用に耐えるものの温度の影響を受けやすい。魚介類の病原ウイルス・細菌に限ってみれば、逆性石鹸液が臭いもなく両者の条件を満たしている。³⁷⁾ 後述のオゾン処理海水あるいは電解海水を消毒剤として使用することは、消毒剤購入経費の削減になり一石二鳥の効果がある。³⁸⁾ さらに、消毒済み区域への立ち入りに際しては専用の長靴を使用し、着衣も専用のものに替えるといった対策が必要である。³³⁾

2) 病原体フリー飼育用水確保のための殺菌

飼育用水の殺菌に関しては吉水・笠井³⁸⁾に開発の経緯と目的に応じた殺菌法について詳述した。水そのものの理化学的性状を変えることなく大量の水の殺菌処理が安定して行える装置が求められる。現在のところ、紫外線、オゾンあるいは電解による殺菌が一般的である。紫外線を用いる場合、病原体の紫外線感受性を求め、その値の5～10倍程度の線量を照射している。魚介類の病原体は紫外線感受性から、高感受性グループと低感受性グループに分けられる。エンベロープを有する各種ウイルス、DNAウイルスおよびグラム陰性細菌が高感受性グループに含まれ、 $10^4 \mu W \cdot sec/cm^2$ の紫外線照射で99.9%以上の殺菌あるいは99%以上の感染性ウイルスの不活化が可能である。一方、2本鎖RNAウイルスやグラム陽性細菌、カビ、原虫、寄生虫は感受性が低く $10^6 \mu W \cdot sec/cm^2$ 程度の照射が必要である。水深は紫外線の透過率(5cmで10%減衰)を考慮してなるべく浅くとり、影になる部分がないよう水中の大型粒子を除去する必要がある。また低温下では効力が若干低下する。現在の紫外線ランプの出力は8,000時間経過で約20%低下する。年一回の交換が望ましい。

海水をオゾン処理すると海水中のブロム等のハロゲンと反応してオキシダントが生成され、これが殺菌効果を示す。もちろん、魚にも毒性を示す。殺菌効果はオゾンガスの酸化力とオキシダントの効果がほぼ1:1である。淡水では曝気によりオゾンガスを除去後飼育用水として使用可能であるが、海水ではまずオゾン処理水槽で殺菌後、活性炭槽を過し残留オキシダントを除去して飼育水とする。魚類病原細菌およびウイルスを99.9%以上殺菌あるいは不活化させる残留オキシダント濃度と処理時間は0.5 mg/Lで1分程度であり、安全率を考慮して通常0.5 mg/Lで5分間処理されている。³⁸⁾ この場合、飼育水中の一般細菌の生菌数は99.9%以上減少する。上記中圧紫外線殺菌装置を用いた $10^6 \mu W \cdot sec/cm^2$ 照射時の生菌数の減少率も99.9%以上となり共に3桁以上の減少を見る。この数値を魚類病原微生物を殺菌する際の指標値としてもよい。オゾン殺菌装置はヨーロッパを中心に水道水の殺菌に広く利用され普及している

表2 水産分野における電解水の利用ガイドライン

目的	有効塩素濃度と作用時間	処理法
魚類飼育用水の殺菌	0.5 mg/L・5分間 (1.0 mg/L・1分間)	脱塩素後に使用
飼育排水の殺菌	0.3～0.5 mg/L	0.5 mg/Lでは脱塩素後に放流
カキの浄化	0.3 mg/L	掛け流し
漁船・漁具の殺菌洗浄	0.5 mg/L	洗浄
市場の床・岸壁の殺菌洗浄	0.5～1.0 mg/L	洗浄
食品加工工程の殺菌・洗浄	0.5 mg/L	食塩電解水を使用*
加工品の殺菌・洗浄	0.5 mg/L	食塩電解水を使用

*: 現在食品添加物として認められているものは、次亜塩素酸ナトリウム、強酸性電解水、弱酸性電解水、食塩水を電解した食塩電解水である。

が、高価であり、メンテナンス経費等から水産増養殖分野では、後述の海水電解装置への置き換えが進んでいる。

海水を電気分解すると食塩が分解され、塩化物イオンが酸化力の強い次亜塩素酸に転化し、これが殺菌効果を示す。海水を白金コートチタン電極間を流すのみという簡単な構造であり装置が単純で、かつ海水は無尽蔵であり、経費的に最も安価である。飼育にはオゾン殺菌同様、活性炭を用いた脱塩素処理が必要である。³⁸⁾ 表2に機能水学会が示した水産分野における電解水利用のガイドラインを示した。飼育海水の殺菌に用いる場合、有効塩素濃度0.5 mg/Lで5分あるいは1 mg/Lで1分間の処理後、活性炭を通して脱塩素を行って使用する。有効塩素濃度0.5 mg/Lで5分の処置で海水中の一般細菌の生菌数は99.9%以上減少する。カキなど貝類やウニの浄化には有効塩素0.3 mg/L以下の電解海水で24時間飼育すれば大腸菌は陰性となり、³⁹⁾ ウニ腸管内の腸炎ビブリオは排除される。⁴⁰⁾ 水産物の食品加工には食品添加物として認められている食塩電解水を用いる。

その他、中空糸濾過膜を用いた濾過除菌やホットプレートを用いた加熱殺菌あるいはヨードを滴下する方法も有効であるが、電解殺菌以外は経済的な面や魚毒性等で問題があり、実用化には至っていない。⁴¹⁾

3) 健康親魚の確保あるいは選別

採卵用親魚の健康状態の把握とその管理は、種苗生産の成否を左右する。魚類の場合、一般に感染耐過してキャリアになった個体は、成熟期に生殖産物、特に卵巣腔液あるいは精液に病原体が出現する。催熟畜養中に病原体を出す個体が存在すると、群全体に水平感染が起こり、生み出された卵あるいは精子は病原体に汚染され、孵化仔魚に感染する。このリスクを避けるために、採卵用親魚候補個体の検査を実施し、催熟中の水平感染を防

止する。さけ・ます類では、受精後発眼に至るまでに約1ヶ月を要するために、採卵時に卵巣腔液を採取し、細菌およびウイルスの検査を行い、病原体保有状況を把握している。⁴²⁾ 北日本のヒラメおよびマツカワなどの異体類では、天然海域での捕獲後、親魚候補個体は全て個体標識され、施設への搬入時に抗体検査を実施し、高リスク個体を排除している。⁴³⁾ さらに、成熟3ヵ月前に再度検査を行い、親魚候補個体を選別している。採卵時に卵および精子を対象に、RT-PCRを用いてウイルス遺伝子の有無を検査し、陽性個体があれば受精卵を廃棄している。上記の飼育用水の殺菌と親魚の検査により、ウイルス性神経壊死症の発生は見られなくなっている。

4) 卵洗浄および消毒

魚のウイルスが卵子や精子に吸着することが分り、⁴⁴⁾ ウイルスが受精時に精子とともに卵内に侵入すると、生まれてくる仔魚への感染が避けられないとの論議が起こった。しかし、受精時に卵内に侵入したウイルスは胚に感染したのち、ある程度は増えるものの胚は死亡し、ウイルスは臍嚢内容物によって不活化されることが分り、⁴⁵⁾ 死亡した卵を除去し、正常発生卵を胚の安定期である発眼期にポピドンヨード剤 (50 ppm・15分) で消毒すると、卵表面に付着している病原体を殺すことができ、その感染を防止することができるようになった。

消毒した発眼卵を病原体がいない飼育用水でふ化させる方法が世界的に広く用いられるようになり、その結果、仔稚魚期の病気は激減し、サケ・マス類の増養殖事業は順調に進展し、放流事業はもちろんニジマスやギンザケ *O. kisutch* 養殖も産業として成り立つようになった。

等張液洗卵は、受精率を上げる目的で古くから実施されてきたが、卵表面の生菌数を減少させることにも効果があることが報告され、垂直感染防止に有効であると注目されている。細菌性腎臓病原菌と冷水病原菌は卵内感染するとされてきたが、 10^7 CFU/ml 以上の細菌を含む卵巣腔液 (体腔液) 中に卵が存在すると、細菌は卵門から卵腔に侵入することが明らかになった。卵表面の細菌およびウイルスの数は、1回の洗卵で1桁減少し、通常の洗卵2回、シャワー洗卵1回で約4桁減少することが報告されている。⁴⁶⁾ 受精後、ポピドンヨードで卵表面を消毒すれば、孵化施設への病原体搬入が阻止できる。

他の魚種でも、この卵消毒が導入されているが、魚種により卵径・卵膜の厚み、消毒剤感受性が異なり、表3に見られるように、それぞれの魚種に適した消毒剤の濃度と処理時間が検討されている。^{47,48)} このときの消毒対象となるウイルスの不活化濃度を表4に示した。卵消毒では完全殺菌を求める必要はなく、対象とする病原体を不活化あるいは殺菌できれば目的は達成される。魚類ではマダイ卵が一番感受性が高く、安全に消毒できる濃

表3 魚類受精卵のポピドンヨード感受性

魚 種	安全性が確認された濃度と時間		消毒率 (%)
	濃度 (mg/L)	時間 (分)	
サケマス類	50~1,000	15	>99
ニシキゴイ	50~200	15	88~98
ヒラメ	25~50	15	>99
マツカワ	50	15	>99
ハモ	25~100	15	>99
シマアジ	50	15	>99
クエ	25~100	5	>99
トラフグ	25~100	5	>90
マダラ	25~100	5	>90
マダイ	<25	<5	—

表4 代表的な魚類病原ウイルスのポピドンヨード感受性

ウ イ ル ス	不活化濃度 (mg/L)	時間
伝染性脾臓壊死症ウイルス	25	15 秒
伝染性造血器壊死症ウイルス	30	5 分
<i>Oncorhynchus masou</i> virus	40	30 秒
ウイルス性出血性敗血症ウイルス	8	5 分
コイヘルペスウイルス	12	30 秒
ウイルス性神経壊死症ウイルス	25	5 分

度は 10 mg/L・5 分処理程度である。クルマエビのホワイトスポット病対策には 5 mg/L・5 分が採用されている。ウイルス性神経壊死症ウイルスのオキシダントによる不活化は残留オキシダント濃度 0.5 mg/L で 30 秒である。マツカワ卵の場合、モルラ期に残留オキシダント濃度 0.5 mg/L・5 分あるいはポピドンヨード 50 mg/L・15 分で消毒するのが一番安定であり、ヒラメでも同濃度での消毒の安全性が報告されている。

5) 稚仔魚の病原体検査・健苗性の確認

孵化仔魚は親魚群毎に水槽に収容し隔離飼育を行う。当然、飼育器具は各水槽専用とし、定期的に消毒を行う。異常遊泳個体あるいは発症個体を見つけた場合は、速やかに検査する。発症魚の検査には病患部を含む部位のスタンプ標本作製し、モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法を用いて行う検査が最も早く精度良く診断できる。発症の有無にかかわらず定期的に検査する場合は、培養可能ウイルスは一度細胞に接種して1~2日培養し、培養細胞をPCRに供する培養併用PCR法が最も精度が高い。海産魚ではウイルス性神経壊死症、ウイルス性腹水症、ヒラメラブドウイルス病、マダイイリドウイルス病には培養併用RT-PCRが、ウイルス性表皮増生症には蛍光抗体法がリンホシスチス病にはRT-PCRが適している。採血が可能なサイズになれば、抗体検査を行い感染履歴の把握に務めることも重要である。

6) 飼育水温の調節

サケ・マス類の伝染性造血器壊死症や赤血球封入体症候群、ウイルス性出血性敗血症およびヒラメラブドウイルス病などのウイルス感染症は、水温が20℃あるいは15℃を越えると自然終息することが知られている。ヒラメラブドウイルス病では感染試験でも15℃では死亡が見られなかったことから、以後飼育水温を18℃に設定するよう指導がなされ、翌年から、わが国では発症報告はなくなっている。⁴⁹⁾ 細菌病ではコイ・キンギョの通称“穴あき病”は30℃への昇温療法が有効であり、鰻養殖では加温養鰻の普及により路地池で見られた赤点病等の病気は見られなくなっている。

7) 飼育排水の殺菌

飼育排水はその量が多く、前述の紫外線あるいはオゾンでの殺菌はコスト的に困難である。しかし、魚病対策はもちろん環境対策からも効果的な排水の殺菌が必要である。前述のように海水を電気分解すると、次亜塩素酸が発生する。この次亜塩素酸は、魚類病原微生物に対し0.1~0.5 ppm, 1分の処理で良好な殺菌・不活化効果を示す。これに必要な装置は、チタン電極間に海水を通すのみの簡単な構造でよく、小型で安価であり、毎時200~500トンの飼育排水の生菌数を99.9%以上減少させることができる。⁵⁰⁾ 排水中に含まれる塩素の環境影響評価を行い、適切な運転条件を設定すれば、排水の殺菌処理が可能である。タンパク質を凝集させ加圧浮上などの処理を行えば飼育排水のCOD, SS, TOC, 全リン量, 全窒素量およびアンモニア態窒素量を減らすことが可能である。

8) 有用細菌による細菌叢の安定化

受精卵をヨード剤あるいはオキシダント海水で消毒後、紫外線あるいはオゾンで殺菌した飼育用水を用いて孵化仔魚を飼育すると、いわゆる病原体フリー(specific pathogen free: SPF) 魚が得られる。これにより孵化場や種苗生産施設での大量死は見られなくなり、ワクチン開発の実験魚、バイオテクノロジー研究、病理学研究に大いに貢献した。しかし、一部で放流時に細菌感染症に罹りやすい、環境適応が悪いとの指摘があり、飼育魚の細菌叢を正常細菌叢に近づける試みを実施している。サケ・マス類の場合、正常細菌叢の形成時期は免疫応答成立時とほぼ一致し、それまでは環境中の細菌叢の影響を受ける。⁵¹⁾ そのため、なるべく早く正常細菌叢に近づける必要がある。この場合、病原性がなく且つ抗ウイルス物質や免疫賦活物質を産生する細菌を投与した方が、より効果的と考えた。サケ・マス類やヒラメ・マツカワで、抗ウイルス物質産生腸内細菌を経口投与することにより、ウイルス病を制御することが可能となった。⁵²⁾ 淡水養殖サケ・マス類の腸内細菌は *Aeromonas* 属であり、その中から抗 IHNV・OMV 活性のあるもの

を選び、その培養液を飼料(ペレット)に10%の割合で添加して与えると、腸管内でも抗ウイルス物質が産生され、糞と共に排泄され、水槽内に蓄積した。他方、海産稚仔魚の場合は、生物餌料のワムシやアルテミア卵をまず消毒し、孵化後、抗ウイルス物質産生細菌を添加するとワムシやアルテミアの細菌叢を制御することができ、海産魚の腸内細菌は *Vibrio* 属が優性なため、この中から抗 IHNV・OMV・NNV 活性のあるものを選び、この抗ウイルス物質産生細菌が優勢となった生物餌料を給餌すると、稚仔魚の腸内細菌叢も添加細菌が優勢となり、腸管内容物に抗ウイルス活性が認められた。これらは糞と一緒に飼育水槽中に放出される。ヒラメとマツカワの場合、ともに飼育水槽の換水率が低いため、抗ウイルス物質は水槽内に蓄積される。マツカワについては8年間、抗ヘルペスウイルス・ラブドウイルスおよびノダウイルス活性を有する細菌の経口投与を続けたが、投与菌による障害はなく、上記の防疫対策の効果と相まって、ウイルス性表皮増生症およびウイルス性神経壊死症の発生は見られなくなった。⁵²⁾

9) 耐病系の選抜

病気が蔓延しても、必ず生き残る個体が存在し、一般的には10世代で抵抗性を獲得した個体が優性となり生物は耐病性を獲得すると云われている。魚類でも主要養殖魚種を対象に選抜育種が行われているが、被害の大きいウイルス病では伝染性造血器壊死症のようにウイルスの変異が魚の耐病化を上回り、未だ耐病性獲得には至っていない。⁵³⁾ 現在まで、伝染性造血器壊死症に抵抗性のあるギンザケとニジマスとの異種間交配により感受性の低いギンザケの性質を受け継いだニジマスの選抜や、伝染性造血器壊死症抵抗性を示すクローンニジマスの選抜、⁵⁴⁾ ニジマス4倍体とブラウントラウトを掛け合わせ OMV 抵抗性の信州サーモン⁵⁵⁾ などが報告されている。さらにリンホシスチス病耐病性遺伝子座をマーカーに選抜した LCD 耐性ヒラメやホワイトスポット病抵抗性ウシエビの樹立などが報告されている。しかし、伝染性造血器壊死症抵抗性ニジマスおよびホワイトスポット病抵抗性ウシエビはピブリオ病に弱く、ニジマスではワクチン投与で対応可能であるが、ウシエビは養殖系統とはなっていない。

10) ワクチン開発の現状

現在市販されているワクチンは、投与方法により浸漬ワクチン、経口ワクチンおよび注射ワクチンに大別される。まず、細菌性疾病であるピブリオ病に対する浸漬ワクチンが承認され、ついで連鎖球菌症に対する経口ワクチンが販売された。マダイイリドウイルス病や連鎖球菌症、類結節症に対する注射ワクチンが開発され、現在3種混合ワクチンも市販されている。⁵⁶⁾ 注射は最も有効な投与方法であるが、対象魚数万尾に接種するのは容易な

作業ではない。ブリ属およびヒラメを対象としたワクチン注射装置を開発し⁵⁷⁾製造承認も得たが量販には至っていない。本装置には電気麻酔装置を組み込むことも可能であり、注射時の麻酔の効き過ぎによる死亡や逆に麻酔がかからない等の事故の防止に役立つ。課題としては稚仔魚へのワクチン投与法の検討が挙げられる。現状としては浸漬、噴霧あるいは経口投与法が有望である。弱毒ウイルスの使用が効果的であり、ワクチン処理施設を設け、確実に排水処理を実施すれば実現可能と考える。

11) インターフェロン誘導剤の活用

(1) 天然生薬の利用

中国やベトナム、タイでは、古くから薬草の直接経口投与が行われている。漢方生薬あるいはハーブ抽出液に抗ウイルス活性が認められ、これら抽出物を用いた、ウシエビのイエローヘッド病やキャットフィッシュの運動性エロモナス症の改善例が報告されている。⁵⁸⁻⁶⁰⁾ 抗ウイルス活性とインターフェロン誘導活性を有する漢方生薬抽出物を添加した餌料を、マダイに投与してマダイイリドウイルス病の死亡率軽減効果を観察し、餌料添加物としての利用が可能となっている。

(2) 二本鎖 RNA ウイルスあるいは Poly (I:C) の利用

インターフェロンを誘導する例として2本鎖RNAウイルスの感染が知られている。IPN ウイルスに感染した後にIHN ウイルスあるいはAquabirnavirusに感染した後にVHS ウイルスで攻撃すると大幅な死亡率の低減が見られる例^{61,62)}やCSVとIHNウイルスの組み合わせ等が報告されている。弱毒とは云え生きたウイルスを使用することは環境への配慮を考えると好ましくなく、合成2本鎖RNAであるPoly (I:C) を使用する感染防御法が検討され、同様の効果が認められ、容量・用法も提案されている。^{63,64)} 魚体内残留もなく注射ワクチンとならぶ将来の一つの防御法として有望視されている。さらに系統保存個体の発症時の治療法にも有効と考える。

5. おわりに

魚介類の種苗の生産・放流を中心とする栽培漁業や沿岸域での養殖が盛んになるにつれ、魚を人為環境下で管理することが多くなり、病原体が侵入すれば抵抗力の弱くなっている個体が感染・発病し、飼育群全体に病気が伝播する環境が形成されている。なかでもウイルスによる病気は被害が大きく、その対策確立が急務であり、水産関係のウイルス研究者の労力の大半はこちらに注がれてきた。魚類ウイルスの種類は、今のところヒトや家畜に比べればかなり少なく、これは魚類ウイルスの研究が産業的に被害の大きい病気の原因ウイルスを対象に行われてきたことと、魚類・甲殻類・軟体動物のウイルスで人や家畜に病原性を有するウイルスが分離されていない

ことにより、医学・獣医学領域の研究者の関心を引かなかったことも一因と考える。増養殖対象魚介類がより広範囲になれば、今後も未知のウイルスによる病気が発生する可能性があり、水産業の発展のためにも、増養殖の対象となり得る魚種のウイルス保有状況調査を行うと共に、現在実施されている防疫対策に加え、より効果的なウイルス病対策を検討する必要がある。その場合、現在飼育している魚を対象にした危害分析を行い、①どういうウイルスに感染する可能性があるか、②感染したときの発症率は、③来源として考えられるものは、④親魚は健康か、⑤洗卵および卵消毒は可能か、⑥飼育用水は汚染されていないか、⑦飼育担当者は対応マニュアルを遵守しているか等をあらかじめ検討し、リスク分析を行う。次いで、①親魚候補魚の健康状態評価を行ったか、②洗卵および卵消毒を行ったか、③飼育用水は汚染されていないか、可能性がある場合、殺菌処理を実施したか、④殺菌装置は正常に作動しているか、⑤飼育者の作業衣は適切に管理されているか、⑥手洗器および長靴の消毒槽の消毒液は交換されているか、⑦魚の健康診断を実施したか、⑧対応ワクチンは準備されているか、⑨そのワクチン投与法は、等をチェックし、実施の有無およびその評価を記録として残しておく必要がある。防疫対策も日進月歩であり、最新の知見・手法を随時導入する必要がある。

水圏に生息する生き物は多種多様であり、魚類のみならず、甲殻類をはじめ軟体動物、藻類さらにはプランクトンまでも研究の対象に入れば、多くの未知の病原体が存在すると考えられる。現在まで、主に産業的に被害の大きい魚類ウイルスや細菌、真菌、原虫を対象に研究が展開されてきたが、非病原ウイルスや病原体の生態学的な研究が今後の課題である。同じ増養殖現場でも、施設の形態や規模の違いで、採用される対策が異なる。また海面をそのまま利用する場合は、病原微生物に感受性の高い時期を避けるか、ワクチンを利用する以外に現実的な対処法がない。今後新たな病原微生物に水産業が脅かされないためにも、国内未侵入の疾病に対する防疫体制を整えると共に、国内でも未侵入の地域に対しては同様の対策を講じる必要がある。

魚類は陸上に暮らすヒトや家畜とは生活環境が大きく異なる。ウイルスの侵入門戸も異なる。変温動物であり実験動物としては扱いにくいように思われるが、適切な管理をすればマウスやラットよりも容易であり、多数の同腹飼育群が得られる利点がある。ニジマスを中心に実験動物としての系群の確立やクローンの樹立が進み、また魚類の培養細胞もすでに数多く樹立されている。魚類由来細胞は宿主の棲息温度に近い温度で培養しなければならないが、発育温度域が広く管理もしやすいなど多くの利点を有している。ウイルスの科が同じであれば抗ウ

イルス物質の作用は同一であり、ヒトや家畜に重篤な危害を及ぼすウイルスに対する抗ウイルス物質の検索等利用が広がっている。さらに魚類ウイルスや他の脊椎動物のウイルスを比較することでウイルスの進化の過程も明らかになってくると考えられる。今後の研究の益々の発展を期待したい。

文 献

- Kimura T, Awakura T. Current status of disease of cultured salmonids in Hokkaido, Japan. In: Proceedings from the International Symposium on Diseases of Cultured Salmonids, Sponsored by Tavelec Inc. Seattle, Washington, April 4-6. 1977, 124-160.
- Urawa S. A review of sockeye salmon production in the Nijibetsu River in eastern Hokkaido, Japan. *Tech. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery* 1991; **160**: 3-10.
- Yoshimizu M. Disease problems of salmonid fish in Japan caused by international trade. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1996; **15**: 533-549.
- Nishizawa T, Higashi S, Yoshimizu M. Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Dis. Aquat. Org.* 2006; **71**: 267-272.
- 山崎隆義, 原 武. 伝染性造血器壊死症, 「養鱒の研究」全国湖沼河川養殖研究会, 養鱒部会編, 緑書房, 東京. 1976; 83-88.
- Kasai H, Nomura T, Yoshimizu M. Surveillance and control of salmonid viruses of wild salmonid fish returning to the northern part of Japan, from 1976 to 2002. In: Proceedings of the 3rd FiSCUP Japan-Korea Joint Seminar on Fisheries Sciences, December 15-16, 2003, Jinju-Tongyeong, Korea. 2003; 142-147.
- Kimura T, Yoshimizu M, Tanaka M, Sannohe H. Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou*-I. Characteristics and pathogenicity. *Fish Pathology* 1981; **15**: 143-147.
- Kimura T, Yoshimizu M, Tanaka M. Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou*-II. Oncogenic nature. *Fish Pathology* 1981; **15**: 149-153.
- Winton JR, Lannan CN, Fryer JL, Kimura T. Isolation of a new reovirus from chum salmon in Japan. *Fish Pathology* 1981; **15**: 155-162.
- Oh MJ, Yoshimizu M, Kimura T, Ezura Y. A new virus isolated from salmonid fish. *Fish Pathology* 1995; **30**: 23-32.
- Wolf K. 「Fish virus and fish viral disease」Cornell University Press, New York 1988; 476.
- Wolf K, Quimby MC. Established eurythermic line of fish cell *in vitro*. *Science* 1962; **135**, 1065-1066.
- Fryer JL, Yusha A, K. S. Pilcher KS. The *in vitro* cultivation of tissue and cells of Pacific salmon and steelhead trout. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1965; **126**, 566-586.
- Amend DF, Yasutake WT, R. W. Mead RW. A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 1969; **98**: 769-804.
- Fryer JL, Lannan CN. Three decades of fish cell culture: A current listing of cell lines derived from fishes. *J. Tissue Culture Methods* 1994; **16**, 87-94.
- OIE World Organisation for Animal Health. 「Aquatic Animal Health Code」14th Edition, Paris 2011; 286.
- Kimura T, Yoshimizu M. Viral diseases of fish in Japan. *Annual Rev. Fish Dis.* 1991; **1**: 67-82.
- Yoshimizu M, Kasai H. Chapter 7, Oncogenic viruses and *Oncorhynchus masou* virus. In 「Fish Diseases and Disorders」Vol. 3, 2nd Edition: Viral, Bacterial and Fungal Infections (eds. P.T.K. Woo and D.D. Bruno), CAB International. 2011; 276-301.
- 江草周三監修, 若林久嗣, 室賀清邦編. 「魚介類の感染症・寄生虫病」恒星社厚生閣, 東京. 2004; 424.
- 小川和夫, 室賀清邦編. 「改訂・魚病学概論」恒星社厚生閣, 東京. 2008; 192.
- 畑井喜司雄, 宗宮弘明, 渡邊 翼. 「魚病学」学窓社, 東京. 1998; 157.
- 畑井喜司雄, 小川和夫. 「新魚病図鑑」緑書房, 東京. 2006; 295.
- Yoshimizu M. (2003) Control strategy for viral diseases of salmonids and flounder. In: Biosecurity in Aquaculture Production System: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables, C. S. Lee and P. J. O' Bryen (Eds.), World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 2003; 35-41.
- Muroga K. Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese Hatcheries. *Aquaculture* 2001; **202**: 23-44.
- 吉水 守, 木村喬久, 西澤豊彦. 日本国内で保管されている魚類由来株化細胞, 「動物細胞工学ハンドブック」日本動物細胞工学会編, 朝倉書店, 東京. 2000; 319-334.
- Yoshimizu M, Kamei M, Dirakubusarakom S, Kimura T. Fish cell lines: Susceptibility to salmonid viruses. In 「Invertebrate and Fish Tissue Culture」Kuroda, Y., E. Kurstak and K. Maramorosch (eds.), *Jap. Sci. Soc. Press*, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin. 1988; 207-210.
- 吉水 守. 魚類由来培養細胞のウイルス感受性, 日本誌 1997; **63**: 245-246.
- 吉水 守. 動物培養細胞および癌細胞の凍結保存—魚類培養細胞, 「凍結保存—動物・植物・微生物」酒井 昭編, 朝倉書店, 東京. 1986; 94-96.
- 吉水 守. 魚類培養細胞の凍結保存法, 「海洋生物のジーンバンク—系統保存・凍結保存」海洋 1990; **22**(3): 154-158.
- 小坂善信, 吉水 守. ホタテ貝の閉殻筋着色異常, ワークショップ「貝類の新しい疾病」, 魚病研究 1999; **34**: 222.
- Nagai T, Nakatsugawa T, Nishizawa T, Muroga K. Primary culture of hemocytes from Japanese Black Abalone *Nordotis discus discus*. *Fish Pathology* 1998; **33**: 147-148.
- 渡辺研一, 吉水 守. 大腸菌発現 VNN ウイルス外被タンパク質に対するマツカワの液性免疫応答開始時期, 魚病研究 2002; **37**: 92-94.
- 吉水 守, 笠井久会. 魚類ウイルス病の防疫対策の現状と課題, 化学と生物 2005; **43**: 48-58.
- Yoshimizu M. Control strategy for viral diseases of salmonid fish, flounders and shrimp at hatchery and seeds production facility in Japan. *Fish Pathology* 2009; **44**: 9-13.
- 望月万美子, 阿久津哲也, 鴻上 繁, 岡本信明, 吉水 守. 染色体操作により得られたニジマス 2 系統の耐病性ならびに再生産形質に見られた差異, 日本誌 2007; **73**: 844-850.
- Ahne W, Winton JR, Kimura T. Prevention of infectious diseases in aquaculture. *J. Veter. Med. B/Zentralblatt fuer Veterinaer-mezizin Reihe* 1989; **36**: 561-567.
- 木村喬久, 吉水 守. 水産養殖システムの殺菌, 「新殺菌工学実用ハンドブック」高野光男, 横山理雄監修, サイ

- エンスフォーラム, 東京. 1991; 220-226.
- 38) 吉水 守, 笠井久会. 種苗生産施設における用水および排水の殺菌, 工業用水 2002; 523: 13-26.
- 39) Kasai H. Kawana K. Labaiden M. Namba K. Yoshimizu M. Elimination of *Escherichia coli* from oysters using electrolyzed seawater. *Aquaculture* 2011; 319: 315-318.
- 40) 木村 稔, 三上加奈子, 干川 裕, 森 立成, 笠井久会, 吉水 守. 電解海水を用いた蓄養によるウニ内蔵からの *Vibrio parahaemolyticus* 除菌効果について, 日本誌 2006; 72: 1-5.
- 41) 吉水 守 (共著)「海水殺菌装置評価基準」マリノフォーラム 21, 東京. 1991; 220.
- 42) 吉水 守, 野村哲一. サケ・マス採卵親魚の病原微生物検査法, 魚と卵 1989; 158: 49-59.
- 43) Watanabe K. Nishizawa T. Yoshimizu M. Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis. aquat. Org.* 2000; 41: 219-223.
- 44) Mulcahy D. Pascho R.J. Adsorption to fish sperm of vertically transmitted fish virus. *Science* 1984; 225: 333-335.
- 45) Yoshimizu M. Sami M. Kimura T. Survivability of infectious haematopoietic necrosis virus in fertilized eggs of masu salmon and chum salmon. *J. Aquat. Anim. Health* 1989; 1, 13-20.
- 46) 小原昌和, 小川 滋, 笠井久会, 吉水 守. 養殖サケ科魚類の人工採卵における等調液洗卵法の除菌効果, 水産増殖 2010; 58: 37-43.
- 47) 渡辺研一・吉水 守. 海水のオゾン処理により生成されるオキシダントを用いた飼育器具類および受精卵の消毒, 魚病研究 1998; 33: 145-146.
- 48) 渡辺研一. 病原体の制御および宿主機能活用による病害防除技術の開発, 水産増殖部会, 2008.
- 49) 大迫典久, 吉水 守, 木村喬久. *Rhabdovirus olivaceus* (HRV)人工感染に及ぼす水温の影響. 魚病研究 1988; 23: 125-132.
- 50) 笠井久会, 渡辺研一, 吉水 守. 流水式海水電解装置による飼育排水の殺菌, 日本誌 2001; 67: 222-225.
- 51) 吉水 守, 木村喬久, 坂井 稔. サケ科魚類の稚仔魚期における腸内細菌叢の形成時期について. 日本誌 1980; 46: 967-975.
- 52) 吉水 守, 絵面良男. 抗ウイルス物質産生細菌による魚類ウイルス病の制御, *Microbes Environ.* 1999; 14: 269-275.
- 53) Mochizuki M, Kim HJ. Kasai H. Nishizawa T. Yoshimizu M. Virulence change of infectious hematopoietic necrosis virus against rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with viral molecular evolution. *Fish Pathology* 2009; 44: 159-165.
- 54) 望月万美子, 阿久津哲也, 鴻上 繁, 岡本信明, 吉水 守. 染色体操作により得られたニジマス2系統の耐病性ならびに再生産形質に見られた差異, 日本誌 2007; 73: 844-850.
- 55) 小原昌和, 傳田郁夫. 染色体操作による異質三倍体品種「信州サーモン」の開発, 水産育種 2008; 37: 61-66.
- 56) 吉水 守, 吉田夏子. 水産業で使用されている医薬品, 環境技術 2008; 37: 860-864.
- 57) 吉水 守・笠井久会. 水産用ワクチン注射装置の開発. 養殖 2004; 41(9): 82-83.
- 58) Direkbusarakom S. Herunsalee A. Yoshimizu M. Ezura Y. Antiviral activity of several Thai traditional herb extracts against fish pathogenic viruses. *Fish Pathology* 1996; 31: 209-213.
- 59) Direkbusarakom S. Tuangpan L. Yoshimizu M. Ezura Y. Protective efficacy of *Clinacanthus nutans* on yellowhead disease in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology* 1998; 33: 401-404.
- 60) Direkbusarakom S. Ezura Y. Yoshimizu M. Herunsalee A. Efficacy of Thai traditional herb extract against fish and shrimp pathogenic bacteria. *Fish Pathology*. 1998; 33: 437-441.
- 61) Kim HJ. Oseko N. Nishizawa T. Yoshimizu M. Protection of rainbow trout from infectious hematopoietic necrosis (IHN) by injection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) or poly (I:C). *Dis. Aquat. Org.* 2009; 83: 105-113.
- 62) Pakingking R. Jr. Takano R. Nishizawa T. Mori K. Iida Y. Arimoto M. Muroga K. Experimental coinfection with Aquabirnavirus and viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), *Edwardsiella tarda* or *Streptococcus iniae* in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathology* 2003; 38: 15-21.
- 63) Nishizawa T. Takami I. Kokawa Y. Yoshimizu M. Fish-immunization using a synthetic double-strand RNA Poly (I:C) an interferon inducer, offers protection against RGNNV, a fish nodavirus. *Dis. Aquat. Org.* 2009; 83: 115-122.
- 64) Nishizawa T. Takami I. Yoshimizu M. Oh MJ. Required dose of fish nervous necrosis virus (NNV) for Poly (I:C) immunization of sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Aquaculture* 2011; 311: 100-104.