

## 学位論文の要旨

論文題目 海産魚の種苗生産過程に発生するウイルス性神経壊死症の防除に関する研究

西岡豊弘

日本の水産業における漁獲量は1984年の1261万トンにピークを減らし、2013年では470万トンになった。このような漁獲量の減少を踏まえ、我が国では水産資源の持続的利用を施策とし、水産資源の維持培養を図る栽培漁業が実施されている。栽培漁業では放流用の種苗を確保するために、海産魚介類の仔稚を飼育する種苗生産が実施されており、生産された種苗は養殖業へも提供されている。しかし、この種苗生産過程では仔稚が大量死亡する事例が頻繁に認められ、中でも疾病の発生は種苗の安定生産に大きな支障となっている。

本研究では、種苗生産過程で発生する疾病のうち、最も被害が大きいベータノダウイルスを原因とするウイルス性神経壊死症 (viral nervous necrosis: VNN) を取りあげ、栽培漁業や養殖業の新規対象魚種として注目されているキジハタ、アカアマダイ、クロマグロについて本疾病の防除法を検討した。

### 第1章 緒論

研究の背景となる栽培漁業と養殖業について詳述し、それらの種苗生産において多発する疾病が種苗の安定供給に支障を来していることを示した。特に、魚類では VNN の発生が大きな問題であることを指摘し、本病についての既報の知見を整理した。

### 第2章 種苗生産対象種および種苗生産過程における疾病の発生状況

種苗生産過程で問題となっている疾病について把握するために、まず、1984年から2009年までの「栽培漁業種苗生産、入手・放流実績(全国)」資料を基に、種苗生産対象種について調査した。この間、2000年以降に総種苗生産数は減少したが、魚類16種、甲殻類8種、介類18種で100万個体以上の種苗が生産され対象種の種類数に大きな変化はなかった。次に、種苗期疾病情報事業および種苗期疾病連絡協議会での報告資料を基に、疾病や大量死亡の発生状況について2000～2009年度の内容を取りまとめた結果、ウイルス病が26%、細菌病が37%、真菌病が8%、寄生虫病が12%、不明が17%であった。不明を除く各原因別の発生状況を1989～1999年度の発生状況と比べると、ウイルス病と真菌病がやや減少した一方で、新たな魚種での発生が報告された細菌病と寄生虫病が増加した。複数年で報告された疾病は、VNN、マダイイリドウイルス病(RSIVD)、筋萎縮症、滑走細菌症、棘抜

け症（仮称）、細菌性腹部膨満症、ビブリオ病、細菌性腸管白濁症、スクーチカ症、甲殻類の真菌症があり、疾病の種類も2000年以前と大きな変化はなかった。しかし、VNNでは1989～2009年度までに、5目21魚種で発生があり、キジハタ、クエ、シマアジ、ヒラメでは10年以上の期間で発生が継続していたことから、種苗の安定生産を妨げる最も重要な疾病であると位置付けた。

### 第3章 キジハタにおけるベータノダウイルスの感染状況

移動範囲が限定的であることから栽培漁業の対象種として重要なキジハタを対象としVNN防除対策を検討した。本種ではVNNの発生が11年間にわたって報告されている（第2章）。防除対策としてヨード剤による受精卵消毒や用水の紫外線処理により仔魚期のVNNの発生は少なくなったが、放流までの育成期間中にVNNが発生し、親魚生殖腺からウイルスが検出されないため、その感染経路は解明されていない。

本研究において、VNNに感染耐過したキジハタ稚魚からは3年後もPCRによりベータノダウイルス（RGNNV）遺伝子が検出されることから、これらの耐過魚は不顕性感染の状態にあることが明らかとなった。また、日本近海4海域で採取した132個体の天然キジハタを検査した結果、RT-PCRで4.5%、nested PCRで33.3%の魚がRGNNV陽性となり、親魚候補となる天然キジハタのウイルス感染を確認した。分離した天然キジハタ由来RGNNVをキジハタ稚魚に対して注射感染させたところ、それらはキジハタ病魚由来ウイルスと同等の病原性を示した。これらの結果から、キジハタのVNNは不顕性感染した親魚からの垂直伝播によって起こると考えられた。これらの天然キジハタの組織別の検査では、網膜と脳からの検出率は31.1%であったが、生殖腺は0%であったことから、親魚選別を行うための検査組織として生殖腺は適当でないと考えられた。瀬戸内海の4か所で漁獲された天然キジハタのnested PCRによるウイルス検出率は5.6%～72.9%と漁獲海域により差が認められた。以上の結果から、防除対策として、感染率が低い海域から親魚を搬入し、養成期間が短い親魚群から受精卵を得て卵消毒には電解海水を用いることを提案した。合わせて親魚に与えるストレスを低減する産卵誘発法の開発の必要性を示した。

### 第4章 アカアマダイにおけるウイルス性神経壊死症の防除対策

沿岸漁業の重要な水産資源で商品価値が高いアカアマダイを対象とした。2004年冬季に種苗生産した稚魚が、水面付近や水底で回転遊泳する異常行動を示して死亡する個体が認められた。病魚の脳に空胞が認められ、PCR法でRGNNV遺伝子型のウイルス、また抗ベータノダウイルス血清を用いた蛍光抗体法でベータノダウイルス抗原が検出されたことから、VNNによる死亡であると判断した。疫学調査において、親魚として用いる天然アカア

マダイが PCR 陽性となり、一部の個体からウイルスが分離されたことから、VNN の発生は垂直伝播によると推定した。自然感染したアカアマダイ稚魚を異なる 2 水温で飼育した結果、死亡率と PCR 検出率は 14°C 飼育が 6.1%と 35%であったのに対し、21°C 飼育では 60%と 85%と高かった。また、分離したウイルスをマハタ稚魚に注射感染したところ、マハタ病魚由来ウイルスと同等の死亡率を示し、天然アカアマダイ由来ウイルスの病原性が確認された。防除対策として、nested PCR 陰性の親魚を用い、受精卵を電解海水で消毒し、かつ電解処理海水を用いて飼育することが有効であることを明らかにした。また、人工卵巣腔液で未受精卵を洗浄し nested PCR 陰性の雄精子で人工授精することにより、VNN の発生を大幅に低減できることを示した。

## 第 5 章 クロマグロにおけるウイルス性神経壊死症の防除対策

養殖種として世界的に注目されているクロマグロを対象とした。本種では種苗生産技術が未だ確立されていないため、仔稚魚期の減耗が大きい。大量死亡事例について検討した結果、死亡魚（稚魚）に VNN に特徴的な脳や網膜の空胞変性が認められ、抗-ベータノダウイルス血清を用いた蛍光抗体法により病変部に特異蛍光が確認された。E-11 細胞により、死亡魚 1 個体当たり  $10^{5.3}$  TCID<sub>50</sub>/g ~  $10^{9.6}$  TCID<sub>50</sub>/g のウイルスが分離され、RGNNV 遺伝子型のウイルスが PCR 法により検出されたことから、VNN が大量死亡の一要因であると推定した。PCR 法を用いた疫学調査では、天然幼魚や養成親魚、受精卵およびふ化仔魚からベータノダウイルスが検出されたことから、VNN は親魚からの垂直伝播によると結論づけた。本種の養成親魚は巨大で人為的な取り扱いが不可能なため、既報の防除対策である PCR 検査による親魚の選別ができない。そこで、受精卵消毒の有無や使用薬剤および用水の処理方法について検討した結果、電解海水で卵消毒し電解処理海水で卵管理や仔魚飼育を行うと、VNN 発生数は低下して稚魚の生産数が増加した。これらの方法はクロマグロの VNN 防除法として有効であると考えられた。今後は、親魚からのウイルス伝播を低減するため、産卵制御技術を開発する必要がある。

## 第 6 章 ウイルス感染源としての餌料魚の重要性

既報の VNN 防除対策を実施したシマアジ種苗生産において、ベータノダウイルス（遺伝子型 SJNNV）による VNN が発生した。種苗生産に使用した親魚ならびに生産に使用された餌料生物について PCR 検査を行った。その結果、養成親魚の餌料用に冷凍保管していた天然マアジの 55%からウイルスが検出され（RT-PCR）、シマアジ病仔魚から検出されたものと RNA2 の塩基配列（T4 領域）が一致した。このことから、天然マアジがシマアジ仔魚のウイルス感染源であると推定した。そこで、既報の防除対策に加え、天然魚を養成親

魚の餌料として使用せずに種苗生産を行ったところ、VNN は発生せず稚魚を生産することができた。また、3 ヲ所に餌料用に保管されていた天然マアジを PCR 検査した結果、それらいずれからも高率に SJNNV が検出された (nested PCR 陽性率 : 40%)。さらに、天然マアジから分離したウイルスをマアジ仔魚およびシマアジ仔魚に浸漬感染させた結果、シマアジ病魚由来 SJNNV と同等の強い病原性を示す株が確認された。日本とヨーロッパの病魚および天然マアジ由来の SJNNV についてそれらの RNA2 T4 領域の塩基配列を比較した結果、強い病原性を示す株は、病魚由来株の配列に近いクラスターに分類された。以上のことから、従来の対策に加えて、餌料用魚を介した感染にも注意をはらう必要がある。

## 第 7 章 総合考察

第 1 章から第 6 章において得られた主要な知見に基づき、種苗期の VNN 防除法について総合的に考察した。