

学 位 論 文 題 名

マツカワに発生したウイルス性神経壊死症の
防除対策に関する研究

学位論文内容の要旨

200 海里体制の定着に伴い、我が国の漁業は従来のとる漁業からつくり育てる漁業への転換が緊急の課題となっている。北日本の栽培漁業の有望対象種であるマツカワの種苗生産は、日本栽培漁業協会厚岸事業場が 1986 年に初めて成功し、その後 20 万尾単位の生産が可能となった。しかし、1993 年にウイルス性神経壊死症 (VNN) による稚魚の大量死が発生し、本種の栽培漁業は大きく立ち遅れた。本研究では、マツカワ稚魚に発生した疾病の防除対策確立を目指し、以下の検討を行った。

まず、第 1 章ではマツカワの栽培漁業の現状と問題点を整理した。その結果、疾病対策、特にウイルス病対策が重要な課題であることが明らかになった。

第 2 章では、異常遊泳と頭部の発赤を主徴とする仔稚魚の大量死を伴う疾病について検討し、脳および網膜に神経細胞の壊死による空胞変性が確認されること、病変部の電子顕微鏡観察により直径 27~28 nm のウイルス粒子が観察されること、抗 SJNNV (シマアジのウイルス性神経壊死症ウイルス) ウサギ血清を用いた蛍光抗体法により病変部に特異蛍光が観察されること、さらに SJNNV の RNA に特異なプライマーを用いた RT-PCR 法 (PCR) により同一分子量の増幅産物が得られることなどから、本疾病はシマアジの VNN 原因ウイルスと類似のウイルスによる VNN であることが明らかとなった。

次いで、マツカワの VNN 防除対策の技術開発の基礎となる原因ウイルスの検出法について検討した。まず、種苗生産現場において簡便で高感度に原因ウイルスを検出できる方法を検討したところ、核酸を Isogen で抽出し、酵素として Super Script II, EX Taq を使用して、変性、アニーリング、伸長の各反応をそれぞれの温

度で行う 3 段階 PCR が望ましいと考えられた。次に、魚類由来培養細胞の VNN ウイルスに対する感受性について検討した。32 種類の魚類由来培養細胞について調査したところ、SSN-1 細胞、SBK-2 細胞および SK 細胞を用いた場合に CPE が確認され、本ウイルスの分離に成功した。また、この細胞培養法、PCR および細胞培養法と PCR を組み合わせた方法の本ウイルス検出感度を比較したところ、7 日間培養した感染細胞を PCR により検査することがマツカワ受精卵のふ化日数から考えて最も精度の高い VNN ウイルス検出法と考えられた。さらに、ウイルス陰性を確認した卵および精液で人工授精を行うために、それらの短期保存法について検討した。卵では望ましい方法はなかったが、精液では開発された人工精漿に精液を懸濁することにより、4 日間保存が可能であることが明らかになった。

第 3 章では、第 2 章で親魚の生殖産物を PCR により調査したところ、雌雄ともに生殖産物から VNN ウイルス遺伝子が検出され、本疾病の主たる感染源が親魚であると考えられたため、親魚の選別による VNN 防除対策について検討した。第 2 章で PCR 陰性の卵と精液を用いて人工授精を行い、得られた PCR 陰性のふ化仔魚を用いて種苗生産を行ったところ、一部の仔稚魚に VNN が発生した。このことから、PCR による親魚選別のみでは VNN ウイルス保有親魚の検出が不十分であり、VNN を防除することができない場合が発生するものと考えられた。そこで、VNN ウイルスに対する抗体を検出して親魚を選別することによる VNN 防除対策について検討した。まず、抗体を検出する ELISA の抗原としての特異性、安全性を考慮してマツカワのウイルス性神経壊死症ウイルス (BFNNV) の外被タンパク質を用いることとし、分子生物学的な手法を用いて生産した。そのタンパク質を用いて BFNNV に対する抗体を検出する ELISA を開発し、本 ELISA を用いて親魚から抗体を検出することにより選別を試みた。その結果、抗体陰性と考えられる親魚およびそれらから得られた仔稚魚から VNN ウイルスは検出されず、抗体陽性と考えられる親魚およびそれらから得られた仔稚魚から VNN ウイルスが検出されたことから、本 ELISA による親魚選別が VNN の防除に有効であると考えられた。さらに、マツカワに対する免疫の可能性について検討した。親魚に本タンパク質を用いて免疫したところ、15 ヶ月にわたって抗体価が高い状態が続き、血清に BFNNV に対する中和活性も認められた。

第4章では、飼育用排水の殺菌による VNN 防除技術について検討した。まず、種苗生産に使用する用水の殺菌法を検討し、オゾン処理装置を選定した。海水にオゾンを接触させるとオキシダントが発生するが、このオキシダントの魚毒性とその除去法について検討した。オキシダントには魚毒性が認められ、活性炭を用いて除去する必要があると考えられた。オゾン処理海水とろ過海水を用いてマツカワを飼育したところ、オゾン処理海水を用いて飼育した仔稚魚の成長が早く、生残率が高かった。また、ろ過海水で飼育した仔稚魚から VNN ウイルスが検出される例もあり、オゾン処理海水の VNN 防除に対する有効性が示唆された。次に、オキシダント海水を用いた飼育器具類の消毒法について検討した。0.5 mg/L のオキシダント海水に 30 分浸漬することにより、大部分の飼育器具類を消毒することができた。さらに、マツカワ受精卵の消毒法を検討したところ、モルラ期に 10 分間 0.5 mg/L のオキシダント海水に浸漬することにより、効果的で卵に悪影響を及ぼさない卵消毒が可能と考えられた。

種苗生産水槽で疾病が発生すると、病原体の数は爆発的に増加し、他の水槽への水平感染や環境汚染が懸念される。そこで、海水電気分解装置による飼育排水の殺菌を試みた。その結果、0.5 mg/L の塩素量となるように次亜塩素酸ナトリウムを生成させ、排水と 1 分間反応させることにより殺菌効果が認められた。また、この海水電気分解処理水による飼育器具の消毒を試みたところ、多くの器具類ではオキシダント海水と同様の消毒効果が得られた。ただ、ネット類では 4 倍の消毒時間を必要とした。

第5章では、抗ウイルス物質産生細菌を用いた VNN の生物制御技術について検討した。まず、生産された種苗の正常細菌叢について検討したところ、体表では *Alteromonas* と *Pseudomonas* が主体をなし、腸管では *Vibrio* と *Alteromonas* が主体をなした。次にヒラメおよびマツカワ腸管由来の抗ウイルス性細菌を、マツカワの腸管内に定着させることを試みた。抗 BFNNV 活性を有する細菌をアルテミアに添加してマツカワに給餌し、マツカワ腸管内細菌叢を調査した結果から、添加した細菌が少なくとも 1 ヶ月間は定着したことがうかがえ、腸管内容物に抗 BFNNV 活性が認められた。

以上の本研究で得られた成果を現場に応用した結果、日本栽培漁業協会厚岸事

業場におけるマツカワの種苗生産は、3年間にわたって VNN の発生は認められず、事業規模での VNN の防除が可能となった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 水 守
副 査 教 授 絵 面 良 男
副 査 助 教 授 田 島 研 一
副 査 助 教 授 山 崎 浩 司

学 位 論 文 題 名

マツカワに発生したウイルス性神経壊死症の 防除対策に関する研究

北日本の栽培漁業の有望対象種であるマツカワの種苗生産は、1986年に日本栽培漁業協会厚岸事業場で初めて成功し、その後20万尾単位の生産が可能となった。しかし1993年に異常遊泳と頭部の発赤を主徴とする仔稚魚の大量死が発生し、本種の栽培漁業は大きく立ち遅れた。本研究はその原因究明と防除対策を検討したものであり、特に評価される成果は以下のとおりである。

1. 病魚の脳および網膜の神経細胞に空胞変性を伴う壊死が観察され、電子顕微鏡観察により直径約28nmのウイルス粒子が多数観察された。蛍光抗体法により病変部に特異蛍光が観察され、RT-PCRにより魚類ノダウイルス特異遺伝子が検出された。これら病魚の病理組織学的、血清学および分子生物学的研究結果から、本疾病がウイルス性神経壊死症(VNN)であることを明らかにした。
2. マツカワのVNN防除対策の基礎となる原因ウイルスの検出法および培養法について検討し、現場で簡便かつ高感度にVNNウイルスを検出できるRT-PCR条件を設定するとともに、SSN-1細胞、SBK-2細胞およびSK細胞が本ウイルスに感受性を有することを明らかにした。このうちSSN-1細胞を用いた培養法とPCRを組み合わせる方法が、もっとも感度良くVNNウイルスを検出できることを明らかにした。
3. 雌雄共に親魚の生殖産物からVNNウイルス遺伝子が検出された場合、得られた仔稚魚に本疾病が発生したことから、本病の主たる感染源が親魚であることを明かにし、親魚選別の必要性を示した。
4. RT-PCR陰性の卵と精子を用いて人工授精を行い、得られたPCR陰性の孵化仔魚を用いて種苗生産を行っても、一部の仔稚魚にVNNが発生した。このこと

から PCR による親魚選別のみでは VNN ウイルス保有親魚の検出が不十分であり、VNN を完全に防除することができないことを示した。

5. 本病原因ウイルスに感染履歴のない親魚の選別に抗体検査が有効か否かを検討し、まず種苗生産現場での使用の安全性と反応特異性を考慮して、VNN ウイルスの外被タンパク質をコードしている遺伝子を大腸菌に組込み、大腸菌産生組換え外被タンパク質を得た。このタンパク質を抗原とした抗体検出 ELISA の条件設定を行い、本法が感染履歴のない親魚の選別に有効であることを明らかにした。
6. VNN の水平感染防止の観点から、飼育用水および飼育排水の殺菌法を検討し、用水の殺菌にオゾン処理が、排水の殺菌には海水の電気分解が有効であることを明らかにした。海水にオゾンを接触させるとオキシダントが発生し、魚毒性を示したが、活性炭により除去できることを明らかにした。オゾン処理海水と濾過海水を用いてマツカワを飼育し、オゾン処理海水を用いて飼育した仔稚魚の成長が早くかつ生存率も高いことを明らかにした。濾過海水で飼育した仔稚魚から VNN ウイルスが検出される例もあり、オゾン処理の有効性を明らかにし得た。さらに海水のオゾン処理時に生成するオキシダント海水は飼育器具類および卵の消毒にも有効であることを明らかにした。
7. 生産された放流用種苗の細菌叢を早期に安定化させるに際し、抗ウイルス物質産生腸内細菌を経口投与する方法が、VNN の生物制御にも有効であることを明らかにした。
8. 本研究で得られた成果を飼育現場に応用し、日本栽培漁業協会厚岸事業場でのマツカワの種苗生産は、過去 3 年間疾病の発生もなく順調に推移し、事業規模での VNN の防除が可能となった。

以上、本論文ではマツカワ仔稚魚に発生した大量死がウイルス性神経壊死症 (VNN) であることを明らかにし、本病の発生にウイルス保有親魚が関与していることを明らかにした。本病の防除には原因ウイルスの遺伝子検出のみでなく、親魚の感染履歴の把握が重要であること、さらに水を介した水平感染の防止も重要な課題であることを示し、飼育用水の殺菌にオゾン処理が、排水の殺菌には海水の電気分解が有効であることを明らかにした。

これらの成果により、マツカワの種苗生産は順調に推移し、事業規模での VNN の防除が可能となった。本研究は、今後の魚類ウイルス病の防疫、防除技術を講じる上で極めて重要な知見を与えたものであることから、審査員一同は、本論文が博士(水産学)の学位論文として十分な内容を有するものであると判定した。