

博士(水産科学) 佐藤 純

学位論文題名

クルマエビのホワイトスポット病
(white spot disease: WSD) の防除対策に関する研究

学位論文内容の要旨

クルマエビのホワイトスポット病 (white spot disease : WSD) は、種苗生産および養殖生産において最も重要なウイルス感染症の一つである。種苗生産過程での WSD 防除対策はほぼ確立されたが、中間育成場や養殖施設においては、飼育環境中に生息する甲殻類から、あるいは飼育海水を介しての水平伝播が起こる可能性があり未だ解決されていない。一方で、WSSV 感染耐過エビ類が再感染に対し抵抗性を獲得すること（免疫様現象）が明らかにされている。本研究では、これらの免疫様現象を利用した水平伝播防除技術の開発を行った。

まず第 1 章では、種苗生産過程における WSD の発生状況と対策に関する疫学的調査を行い、WSSV (white spot syndrome virus) の感染経路を検討した。初年度の 1996 年は親エビのウイルス検査結果に基づく選別を実施しなかった。翌 1997 年は生検法により得られた卵巣卵を試料として PCR により WSSV の検出を行い、その結果に基づき親エビ選別を行った。得られた卵は、1996 年は海水での卵洗浄を、また 1997 年には紫外線海水とヨード剤を用いて卵消毒を行った。その結果、1996 年の種苗生産では WSD の発生は認められなかつたが、種苗を配布した中間育成場において 16 事例中 8 事例で WSD の発生が認められた。産卵に供した一部の親エビの胃上皮について調べた結果、7 月以降に WSSV の検出率が高まる傾向を示した。一方、親エビの選別と卵消毒を行った 1997 年には、種苗生産および中間育成のいずれにおいても WSD は発生しなかつた。これらの事例から、種苗生産過程における WSSV の主たる感染経路は垂直伝播の可能性が高いと判断された。

次いで第 2 章では、親エビからの垂直感染予防の観点から実施されている受精卵のヨード剤による消毒の安全性と効果について検討した。ヨード剤による安全な消毒方法の把握を目的に、卵の発生段階の違いによるヨード剤の影響と異なる有効ヨウ素濃度および浸

漬時間による消毒処理の影響を調査した。卵の消毒試験では、発生段階が 2 細胞期、128 細胞期、胚形成以降の 4 ステージおよび卵内ノープリウス期の 2 ステージの計 8 ステージについて、有効ヨウ素濃度 5 mg/L への 5 分間浸漬の影響を調べた。対照区はヨード剤未処理とした。受精卵への影響は、ふ化率と形態異常の発生状況を観察して判断した。さらに、有効ヨウ素濃度 0, 2.5, 5.0 および 10 mg/L のろ過海水にそれぞれ 5, 10, 15 および 20 分間浸漬し、ふ化率への影響と浸漬後の卵表面の生菌数を計数した。その結果、卵の消毒試験では、正常ふ化率は各発生段階ともヨード処理区と対照区で顕著な差は認められなかつたが、128 細胞期だけがヨード処理の有無にかかわらず低下する傾向が認められた。また、有効ヨウ素濃度と浸漬時間の試験では、ヨウ素濃度 2.5 mg/L で 20 分以上、5 mg/L で 15 分以上、10 mg/L で 5 分以上の浸漬が、対照区と比較してふ化率の低下が認められた。卵表面の生菌数は、ヨウ素濃度 5 mg/L への 5 分間浸漬で 90% 減少することが確認された。

第 3 章では、WSSV の病原性試験に基づく適正な攻撃強度の算出を行い、大腸菌で発現した WSSV の構造タンパク質である rVP26 と rVP28 を経口投与したクルマエビの WSSV への防御効果について検討した。rVP26 と rVP28 を 10 $\mu\text{g/g}$ shrimp/日で配合飼料に混合し、平均体重 0.6 g あるいは 6.8 g のクルマエビに 15 日間投与した。対照区には、大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来タンパク質を 25 $\mu\text{g/g}$ shrimp/日で同様に投与した。経口投与終了 10 日後に、病エビの筋肉、磨碎液あるいは血リンパを用いて経口、浸漬および注射で攻撃試験を実施した。試験区と対照区の累積死亡数は、 χ^2 検定により比較した。その結果、0.6 g のクルマエビを用いた場合、経口攻撃試験における各区の累積死亡率は、対照区 90%、rVP26 投与区 63% および rVP28 投与区 60% で、対照区と両投与区との間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。浸漬攻撃においても、対照区および rVP26 投与区の累積死亡率は、それぞれ 100% および 57% で、両区に有意差が認められた ($P < 0.01$)。一方、6.8 g のクルマエビを用いた場合、経口攻撃では、対照区の累積死亡率は 31% であったが、rVP26 と rVP28 投与区で死亡は認められなかつた。浸漬攻撃では、対照区 57%、rVP26 区 21% および rVP28 区 22%、また注射攻撃では、対照区 93%、rVP26 区 31% および rVP28 区 52% と、いずれの攻撃法においても投与区の死亡率は対照区に比べ有意に低かつた ($P < 0.01$ および 0.05)。以上の結果から、rVP26 および rVP28 の経口投与により WSSV に対する防御効果が誘導されることが示された。

最後に第 4 章では、rVPs の経口投与による感染防御の持続期間、免疫記憶および特異性について検討した。これまでに、WSSV rVPs を経口投与したクルマエビに感染防御効果

が誘導され、追加投与による防御効果も得られることを明らかにした。本章では、ホモあるいはヘテロの rVP を追加投与することで、クルマエビに認められる免疫様現象の記憶および特異性について検討を行った。平均体重 80 mg のクルマエビに rVP26, rVP28 (10 μ g/g-shrimp/day) および PBS を含む配合飼料を 15 日間連続投与した後、初回投与から 45, 55 および 106 日後に浸漬法により WSSV で攻撃した。さらに、106 日後に初回投与した rVPs のホモあるいはヘテロの rVP を 7 日間追加投与し、初回投与より 113 日後に同様の方法で攻撃を行い、感染防御能の変化を比較検討した。rVPs 投与区の WSSV 攻撃に対する防御効果は、55 日でピークとなり、106 日後には低下した。一方、rVP26 投与区に rVP26 あるいは rVP28 を追加投与した区の RPS は各々 100% および 33% であったが、rVP28 投与区に rVP26 あるいは rVP28 を追加投与した区の RPS は各々 42% および 67% となり、ホモ rVP を追加投与区の RPS がヘテロ rVP 追加投与区の RPS に比べ有意に高くなった。なお、rVP 非投与区に rVP26 あるいは rVP28 を投与したときの RPS は各々 44% および 0% であった。以上の結果から、クルマエビに認められる免疫様現象には、改めて特異性とある程度の記憶があると考えられた。

以上、種苗生産過程における WSD 防除技術の確立までの過程を発生状況、受精卵消毒および産卵用親エビの選別の各対策別に検討し、現時点で考えられる最も有効な防除対策技術をとりまとめると、以下の通りである。1. 親エビの選抜、2. 卵消毒、3. 飼育水の管理。飼育水の殺菌管理が難しくなる天然海面を利用した養殖生産過程での対策としては、クルマエビの生体防御能を利用した水平感染対策が考えられ、rVPs の経口投与とブースターの必要性について検討したところ、WSSV に対する防御効果が誘導できること、さらに誘導される防御反応の発現時期および持続期間について明らかにした。今後は、防御反応の機序の解明を行い、効率的な防御効果の誘導手法の構築に結びつけたい。

学位論文審査の要旨

主査 教授 吉水 守
副査 教授 五嶋 聖治
副査 准教授 西澤 豊彦
副査 助教 笠井 久会

学位論文題名

クルマエビのホワイトスポット病 (white spot disease: WSD) の防除対策に関する研究

クルマエビのホワイトスポット病 (white spot disease: WSD) は、種苗生産および養殖生産において最も重要なウイルス感染症の一つである。種苗生産過程での WSD 防除対策はほぼ確立された。しかし、中間育成場や養殖施設では、飼育環境中に生息する甲殻類や飼育海水を介して水平伝播が起こる可能性があり、WSD 防除対策は未だ解決されていない。一方で、WSD 原因ウイルス (white spot syndrome virus, WSSV) 感染耐過エビ類が再感染に対し抵抗性を獲得すること (免疫様現象) が明らかにされている。本研究では、これらの免疫様現象を利用した水平伝播防除技術の開発を行った。

まず第 1 章では、種苗生産過程における WSD の発生状況と対策に関する疫学的調査を行い、WSSV の感染経路について検討した。初年度の 1996 年は親エビ選別を実施しなかつたが、翌 1997 年は親エビ卵巣卵を対象として PCR による WSSV 検出結果に基づき親エビ選別を行った。また、1996 年は海水での卵洗浄のみを、1997 年には紫外線海水とヨード剤を用いた卵消毒を行った。その結果、1996 年の種苗では、配布した中間育成場の 16 事例中 8 事例で WSD の発生が認められた。一方、親エビの選別と卵消毒を行った 1997 年には、種苗生産および中間育成のいずれにおいても WSD は発生しなかった。これらの事例から、種苗生産過程における WSSV の主たる感染経路は垂直伝播の可能性が高いと判断された。

次いで第 2 章では、親エビからの垂直感染予防の観点から、受精卵のヨード剤による消毒の安全性と効果について検討した。その結果、受精卵の発育段階別の消毒試験では、128 細胞期における正常ふ化率が低下する傾向が認められた。また、有効ヨウ素濃度と浸漬時間の試験では、ヨウ素濃度 2.5 mg/L あるいは 5 mg/L でそれぞれ 5 分の処理が安全であり、本処理条件で卵表面の生菌数が 90% 以上減少することが確認された。

第3章では、WSSVの病原性試験に基づく適正な攻撃強度に基づき、大腸菌で発現したWSSV構造タンパク質rVP26とrVP28を経口投与したクルマエビの感染防御効果について検討した。まず、rVPsを配合飼料に混合し10 μ g/g-shrimp/日で15日間投与した。投与対照区には、大腸菌由来のタンパク質を25 μ g/g-shrimp/日で同様に投与した。経口投与終了10日後に、病エビの筋肉あるいはその磨碎液を用い、経口、浸漬および注射法によりWSSV攻撃試験を実施した。その結果、経口攻撃では、rVP26とrVP28投与区RPS値が100%となり、浸漬攻撃でもそれぞれ71および70%に達した。注射攻撃では、rVP26投与区のRPS値が61%となった。以上の結果から、rVPsの経口投与によりWSSVに対する高い防御効果を誘導できることが確認された。特に、経口攻撃試験で高い防御効果が得られたことは、共食いによる水平的な感染の拡大を特徴とするWSDの実用的な防除対策の一つになると考えられた。

最後に、第4章ではrVP26およびrVP28の経口投与したクルマエビの感染防御の持続期間、免疫記憶および特異性について検討した。平均体重80mgの個体にrVPs(10 μ g/g-shrimp/day)およびPBSを含む配合飼料を15日間連続投与した後、定期的に浸漬法によりWSSVで攻撃した。さらに、106日後に初回投与したrVPsのホモあるいはヘテロのrVPを7日間追加投与し、初回投与より113日後に同様の方法で攻撃を行い、感染防御能の変化を比較検討した。rVPs投与区のWSSV攻撃に対する防御効果は、55日でピークとなり、106日後には低下した。一方、rVP26投与区にrVP26あるいはrVP28を追加投与した区のRPSは各々100%および33%であったが、rVP28投与区にrVP26あるいはrVP28を追加投与した区のRPSは各々42%および67%となり、ホモrVPを追加投与区のRPSがヘテロrVP追加投与区のRPSに比べ有意に高くなった。なお、rVP非投与区にrVP26あるいはrVP28を投与した時のRPSは各々44%および0%であった。以上の結果から、クルマエビに認められる免疫様現象には、改めて特異性とある程度の記憶があると考えられた。

以上、種苗生産過程におけるWSD防除技術の確立までの過程を発生状況、受精卵消毒および産卵用親エビの選別の各対策別に検討し、現時点で考えられる最も有効な防除対策技術をとりまとめると、以下の通りである。1. 親エビの選抜、2. 卵消毒、3. 飼育水の管理が重要であり、また、飼育水の殺菌管理が難しくなる天然海面を利用した養殖生産過程では先の対策に加え、クルマエビの生体防御能を利用したrVPsの経口投与と追加投与による水平感染対策を加える必要があると考えられた。