

# ヒラメ種苗生産期における VNN 防除対策-1

杉本善彦・沢田健蔵

ウイルス性神経壊死症(viral nervous necrosis : 以下 VNN)は,1980 年代後半からみられるようになった極めて致死性の高い病気で,イシダイ,キジハタ,シマアジなど数種の種苗生産対象魚種に発生している。本県でも,鳴門分場におけるキジハタの種苗生産過程において発生事例がある。今年度徳島県栽培漁業センターにおけるヒラメの種苗生産過程において発生した大量死が本症によるものと判断されたので,その状況と講じた対策について報告する。

## 1.大量死の発生状況と診断

### 材料および方法

徳島県栽培漁業センター内で継代飼育された親魚から採卵し,飼育中のヒラメ稚魚に,孵化後 60 日目から大量死が発生した。

瀕死魚を採集し,体表および鰓の顕鏡と,内臓からの細菌分離を試みた。培地は BHI (ブレインハートインフュージョン)寒天培地(2%NaCl)と Zobell 培地を用いた。検査尾数は 12 尾で平均体長は 25mm,平均体重は 0.25g であった。

ウイルス検査は,10%中性ホルマリン固定サンプルおよび冷凍サンプルを作成し,広島大学生物生産学部水族病理学研究室(中井敏博助教授)に以下の検査を依頼した。

- 1) PCR 法によるウイルス核酸の検出
- 2) パラフィン切片を作成しヘマトキシリン・エオシン染色による病理組織観察
- 3) SJNNV(シマアジのウイルス性神経壊死症原因ウイルス)に対するウサギ抗血清を用いた蛍光抗体法による観察
- 4)FHM,EPC 細胞を用いたウイルス分離

### 結果および考察

これらの検査魚には,外部症状は特になく,体表および鰓に寄生虫や長桿菌は認められなかった。BHI 寒天培地では,12 尾中 9 尾から細菌が分離された。これらは単一なコロニーではなく菌数も少なかった。優先種については,薬剤感受性試験を行った。その結果,オキシリン酸,ニフルスチレン酸およびフロルフェニコールに高感受性,オキシテトラサイクリンおよびアンピシリンには低感受性であった。栽培漁業センターにおいては,この時すでに,オキシリン酸およびニフルスチレン酸(薬浴)の投薬が

行われていたものの、効果が表れていないことから、この菌が死亡原因になっているとは考えにくかった。また、他の分離された菌についても、分離菌数が少ないこと、分離率が低いことから同様であった。

ウイルス検査については、広島大学から次のような報告があった。

- 1) PCR 検査により、ウイルス核酸の存在が認められた。
- 2) 網膜(顆粒層)および脳組織に VNN に特徴的な空胞形成が認められた。
- 3) 蛍光抗体胞により、上記の病変部に広範囲にわたって顕著な特異蛍光が認められた。
- 4) FHM, EPC 細胞ともに CPE は観察されなかったことから、ビルナウイルス等のウイルスは検出されなかった。

以上の結果から、今回の大量死の原因は VNN によるものと考えられた。

## 2. 親魚のウイルス検査

### 材料および方法

今回の VNN の発生については、シマアジにおける知見により、親魚からの感染が最も疑われたため、養成中の親魚候補群を含めて、全数を処分した。その際、今回の生産に使用した親魚から、生殖巣の一部を採集し、PCR 法によって、ウイルス遺伝子の検出を試みた。

供試したサンプルは 50 尾分(雄 40 尾, 雌 10 尾)で、平均全長は 51.1cm 平均体重は 1,750g であった。

PCR 法による SJNNV の構造タンパク質遺伝子(RNA2)の検出は、Nishizawa et al. の方法により行った。すなわち、生殖巣の一部に DEPC 処理蒸留水を加えて攪拌、遠沈し、上清を回収して Tween20 とプロテイナーゼ K で処理後、クロロホルム・フェノールで核酸を抽出し、SJNNVRNA2 遺伝子の T4 領域(430bp)の増幅のためのプライマーを用いて PCR を 30 サイクル行った。反応後、1.5%アガロースゲル-TAE 電気泳動により PCR 産物を確認した。

### 結果と考察

検査した 50 尾のサンプルのうち 5 尾(雄 3 尾, 雌 2 尾)から SJNNV RNA2 の T4 領域に相当する約 430bp の増幅産物が得られた。

シマアジの VNN については、その感染源は親魚と考えられており、生殖巣のウイルス検査による親魚の選別が本疾病の防除法の一つになり得ることが実証されている。ヒラメを含めて、他の魚種の VNN についてはその感染源は明らかにされていないが、今回 VNN が発生したヒラメの産卵親魚の生殖巣から高率に原因ウイルスの遺伝子が検出されたことから、今回の発生における主な感染源は、親魚であった可能性が高いと考えられる。ただし、シマアジの VNN は孵化後数日間で発症するのにに対して、今回のヒラメにおける発症は、孵化後 60 日目と極めて遅かったことからその感染経路については、卵を介しての垂直感染以外に、飼育水および飼育器具等による水平感染の可能性も高いと思われる。