

熊本県水産研究センター研究報告

第4号

クルマエビ類の急性ウイルス血症（PAV：Penaeid acute viremia）に関する研究特集号

目 次

緒 言	1
第1章 病気の発生と病原体の推定	9
第2章 病理組織学的検討	17
第3章 病原体の電顕観察と簡易診断法	27
第4章 感染実験技法の確立	41
第5章 感染源の推定、原因ウイルスの不活化及び消毒法の開発	49
第6章 総合考察	65
謝 辞	70

平成 11 年 3 月

熊本県水産研究センター

クルマエビ類の急性ウイルス血症
(PAV : *Penaeid acute viremia*) に関する研究

中野 平二

1 9 9 6

※本論文は平成9年度東京水産大学学位審査論文である。

緒 言

クルマエビ類は商品価値が高く、計画生産が可能であることから日本、東南アジア、中南米の各地で盛んに養殖が行われている。

現在、産業的に養殖が行われている海産のエビ類は、*Penaeus vannamei*, *Penaeus stylirostris* (主産地; コスタリカ、パナマ、ホンジュラス、エクアドル), *Penaeus semisulcatus*=クルマエビ (主産地; タイ、台湾、サウジアラビア、イスラエル), *Penaeus japonicus*=クルマエビ (主産地; 日本、台湾、中国), *Penaeus monodon*=ウシエビ (主産地; フィリピン、パラオ、インド、タイ、台湾、マレーシア), *Penaeus chinensis*=コウライエビ (主産地; 中国、韓国) 等である。

我が国では、クルマエビがオガクズを用いた輸送で活きたまま流通が可能であることや、1960年代からクルマエビの人工種苗生産が開始されたことなどを背景としてクルマエビ養殖業は発展してきた。

日本のクルマエビ養殖業は、1889年頃に愛知県において、天然エビを採取し一定期間飼育した後に出荷する、いわゆる蓄養で始まった。蓄養は、9月に天然稚エビを採取して、生鮮あるいは塩蔵したカタクテイワシ、アジ等の雑魚を給餌して飼育後、12月から翌年4月に収穫を行う方式である。熊本県では、1902年に熊本県宇土郡三角町に最初のクルマエビ蓄養場が設置され、蓄養が開始された。

その後、1960年に香川県高松市生島で藤永元作によりクルマエビの人工種苗生産が開始された。熊本県でも、1965年には人工種苗生産が開始され、1969年になるとほとんどの業者が人工種苗を用いた養殖に移行した。以後、熊本県の養殖クルマエビの収穫量は、新規業者の参入による養殖経営体数の増加(1965年41経営体、1987年69経営体)や養殖池面積の増大(1965年412,000㎡、1987年2,626,000㎡)で、1987年には収穫量のピークを迎え、収穫量は912トンとなり、全国収穫量の31.6%をしめた(図1、図2 漁業・養殖業生産統計年報 農林水産省統計情報部)。

しかし、1987年以降ビブリオ病や、フサリウム症等の疾病が多発したため生産歩留まりが低下し、収穫量は減少傾向を示すようになった。一方、1990年頃から台湾からの生きクルマエビの輸入量が急増し(図3)、国産生きクルマエビの出荷盛期である11月から12月にこれらの輸入エビが市場に出回ることによって販売価格が低下した。このため1990年以降、収穫量の減少と販売価格の低下が同時に発生し、国内のクルマエビ養殖の採算性は急激に悪化した。

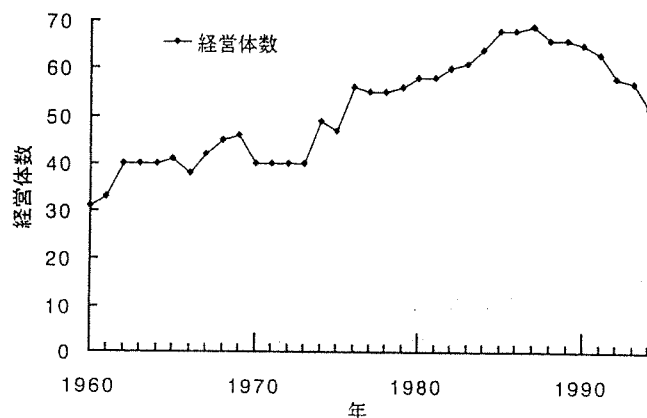


図1 熊本県におけるクルマエビ養殖経営体数の推移

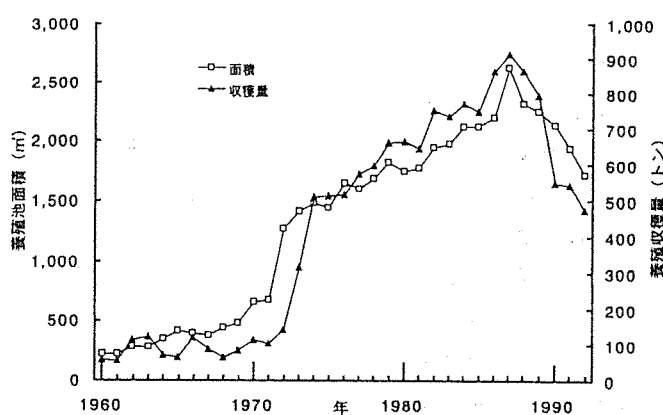


図2 熊本県における養殖池面積と養殖収穫量の推移

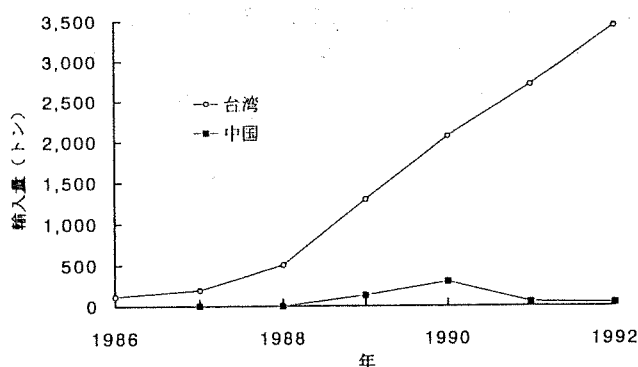


図3 台湾・中国からの生きクルマエビ輸入量の年変化(熊本県東京事務所調べ)

このような状況下で、1991年頃を境に従来の冬季一回の収穫から、同一池で冬季と夏季の二回収穫を行う二期作を実施し、生産増により収益を確保しようとする業者が増加した。二期作方式は、8~9月に屋内水槽で稚エビを種苗生産し、ポストラバ20~30日令となった種苗を、10月に中間育成池に移して飼育し、水温が16℃以下になる頃に給餌を止めて越冬させ、翌年の3、4月に養成池に放養して6~8月に体重15~25gのサイズで夏

季の収穫を行う。その後、池を清掃し、当年産の10g前後のエビを養成池に放養し、12月から翌年の3月に収穫する方式である。(図4)

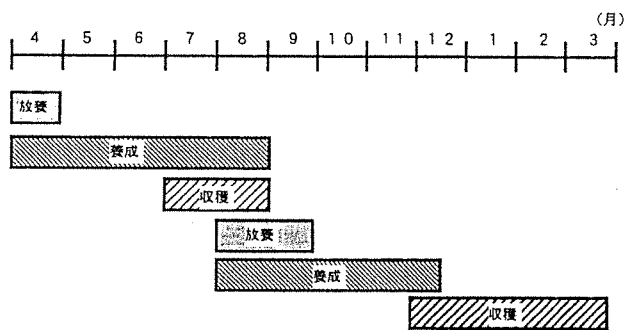


図4 二期作の模式例

二期作を行う場合、経営規模が大きい業者は越年用の種苗池を持ち、越年種苗の自家養成を行っていた。一方、零細な業者は越年用の池を持たないため、越年種苗を経営規模の大きい業者から購入する必要があったが、一般に越年種苗は高価であり、採算面での問題が大きかった。このため一部の業者は、種苗単価が国産種苗の1/2~1/3と安い台湾産、中国産種苗を用いて夏季収穫を試みた。この種苗は国産越冬種苗よりサイズが約2倍大きく、国産種苗に比べ放養直後の餌食いが良好で、成長が早く、養殖期間の短縮や大型のクルマエビを収穫できる利点があった。

外国産種苗を用いた夏季収穫の有利性は業者間で認識され、外国産種苗を使った二期作が熊本県内に急速に広がった。このような状況下で、クルマエビ類の急性ウイルス血症 (PAV) は発生した。

1993年5月に、熊本県下の養殖池で、養殖クルマエビに原因不明の大量死が突然発生した。大量死は県下の主要生産地域に拡大し、総死亡尾数は38,700,000尾(放養尾数の56.4%)に達し、県下のクルマエビ養殖業は重大な被害を受けた(第1章)。

この大量死は死亡率が非常に高く、多くの場合、短期間に急激な大量死が起こることが特徴であった。この原因として、脱皮不良や細菌の感染が疑われたが、井上ら(1994)により桿状の核内DNAウイルス(RV-PJ;後にPRDV)を原因とするウイルス症(クルマエビ類の急性ウイルス血症:PAV)であることが明らかにされた。

クルマエビ属エビ類のウイルス症については、Couch(1974)がピンクシュリンプ、*P. duorarum*の中腸腺にバキュロウイルスを発見し、BP=Baculovirus penaeiと命名し報告したのが最初である。その後、クルマエビ属エビ類に感染するウイルスとして報告されているのは、

MBV=Monodon baculovirus (Lightner and Redman, 1981), BMNV=Baculoviral mid-gut gland necrosis virus (Sano *et al.*, 1981), IHNV=Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (Lightner *et al.*, 1983), HPV=Hepatopancreatic parvo-like virus (Lightner and Redman, 1985), REO=レオ様ウイルス (Tsing and Bonami, 1984), TSV=Taura syndrome virus (Bonami *et al.*, 1995), YBV=Yellow head disease baculo-like virus (Boonyaratpalin *et al.*, 1993), WSBV=baculovirus associated with white spot syndrome (Chou *et al.*, 1995), PCBV=*P. chinensis* baculovirus (Zhan *et al.*, 1995), subgroup C of baculovirus (Baozhen *et al.*, 1995), SEMBV=Systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (Wongteerasupaya *et al.*, 1995) 等があり世界各地で報告がなされている。(図5)



図5 クルマエビ属エビ類養殖でウイルス症が発生した地域

これらのウイルスでクルマエビに感染するウイルスとされているのはBMNV、IHNV、REO、WSBVである。

BMNVは封入体を形成しない桿状の形態のウイルスで、1971年に日本国内での発生が報告された。BMNVはクルマエビ幼生で発生し大きな被害を与え、その死亡状況は死亡エビが観察されてから2~3日以内に急激に死亡する場合や、少数の死亡が継続して発生する場合もあり、累積の死亡率は多くの場合90%以上に達する(桃山, 1981)。BMNVは、熱、乾燥に対する抵抗性は低く、エタノール、塩素、ヨード剤、逆性石鹼、ホルマリン等の消毒剤がBMNVに対して不活化効果を持つことが報告されている(桃山, 1989)。また、中腸腺の生標本の押しつぶしによる簡易な診断方法が開発されている(Momoyama *et al.*, 1988)。

IHNVは実験的にクルマエビの幼生に感受性を有することが報告されている。IHNVは1981年にハワイの

種苗生産施設で飼育していた *P. stylirostris* に急激な死亡を引き起こし、その存在が確認された。*P. stylirostris* の場合、死亡状況は最初に死亡エビが出現してから35日後まで死亡が続き、10~20日後の間が死亡のピークである。また IHNV に *P. vannamei*、*P. monodon* も感染しやすく、内胚葉、外胚葉由来の様々な器官が壊死し、核内に Cowdry A型封入体が存在することが報告され (Lightner *et al.*, 1983)、さらに核酸分析の結果からその病原体はバルボウイルスに属することが報告されている (Bonami *et al.*, 1990)。

バキュロウイルスである MBV は 1981 年に *P. monodon* の老いた成エビで初めて確認された。MBV は *P. monodon* の全生涯にわたって観察されるが、幼生と老エビの場合特に重症となり高い累積へい死率を示すことが報告されている (Lightner, 1981)。MBV の標的器官は中腸腺や中腸で、その上皮細胞核内に球形の包埋体が形成されること、感染実験の結果から *P. stylirostris* と *P. californiensis* および *P. japonicus* は感受性を有しないこと、中腸腺の押しつぶし生標本をマラカイトグリーンで染色して検鏡する簡易診断ができることが報告されている (Lightner, 1988; 福田ら, 1988)。

中南米で被害が発生するタウラシンドロームは、エクアドルで 1992 年に始めて発生が報告された。タウラシンドロームには *P. vannamei* の幼生が感染し、感染したエビは体色が暗赤色になり、尾部は明瞭な赤色になり、その死亡率は 80~90% に達する (Chamberlian, 1994)。タウラシンドロームの病原体である TSV の形状は 20 面体で、*P. vannamei* のクチクラ上皮に感染し、ゲノムは 1 本鎖の RNA ウイルスであり、*in situ* hybridisation による検出法が検討されている (Bonami *et al.*, 1995)。

HPV は、1983 年以降中国渤海沿岸の種苗生産場と養殖池における *P. chinensis* の大量死の原因として確認され、ゾエア、ミス、ポストラバ期の幼生および稚、成エビの中腸腺に感染し、その上皮細胞等に大型で球形の好酸性あるいは好塩基性の封入体を形成することが報告されている (孫ら, 1996)。

YBV は 1988 年に台湾の *P. monodon* 養殖に大きな被害を与えたとされている (Chamberlian, 1994)。さらに 1990 年にはタイ南部で報告された。YBV は *P. monodon* に感染し体表、中腸腺、鰓の黄化といった外見的な病徴を示す。感染実験により非常に強い感染性を持つこと、皮下、造血器、リンパ様器官が標的器官であることが報告されている (Boonyaratpalin *et al.*, 1993)。

また著者らが 1994 年に PAV に関して報告 (第 1 章)

した後、類似の疾病がアジア各地で報告された。台湾では 1992 年から *P. japonicus*、*P. penicillatus*、*P. monodon* の急性の疾病 (White spot syndrome 病原体名 WSBV = Baculovirus associated with White spot syndrome) (Chou *et al.*, 1995) として、また中国では 1993 年から *P. chinensis* に同様の症状を引き起こす疾病 (病原体名 PCBV = *P. chinensis* baculovirus, subgroup C of baculovirus) (Zhan *et al.*, 1995; Baozhen *et al.*, 1995) が発生し、さらにタイでは 1992 年から WSBV、PCBV, subgroup C of baculovirus と形態が類似しているウイルス (SEMBV = Systemic ectodermal and mesodermal baculovirus) (Wongteerasupaya *et al.*, 1995) を原因とする大量死の発生が報告され、各報告で、宿主、病名、病原体名は異なるが、急激に高いへい死が発生すること、外骨格に白斑を形成すること、リンパ様器官やクチクラ上皮などの細胞が壊死すること、ろ過性病原体感染症であること、病原ウイルスの形態が桿状で核内で増殖すること等、これらの一連のウイルスは PAV を含め非常に類似性が高く、アジア地域のエビ養殖における大きな問題として注目される。

このように、近年クルマエビ属エビ類のウイルス性疾病が世界各地で多発しており、クルマエビ属エビ類の養殖に大きな影響を与えている。しかしこれらのクルマエビ属エビ類のウイルスの対策・予防法についての報告は、非常に少なく YBV の対策として、餌に雑魚を用いないこと、養殖池に注水する用水からエビ類を取り除き、72 時間以上放置した後使い、YBV の発生を予防できた (Chamberlian, 1994) ことが報告されているのみである。

さらに、PAV が発生した 1993 年の時点では、本疾病のようにサイズに関係なく感染し、発生から短期間で大量死が発生するウイルス症は我が国では報告されておらず、その防除対策についての知見もなかった。そのため被害を防止するための知見の収集が急務となった。

熊本県では、被害が発生した 1993 年度から水産庁養殖研究所、水産庁南西海区水産研究所、水産庁西海区水産研究所、山口県内海水産試験場と研究グループを組織し、この PAV 対策を行うために必要なウイルスの性状や、防除手法に関する知見を収集した。その成果をもとに、1994 年と 1995 年の 2 年間にわたり、クルマエビ養殖池を対象とした PAV の防除対策を実施した。その結果、1993 年に 150 トンまで減少した養殖生産量が 1995 年には約 400 トン (平成 7 年農林水産統計速報) に回復した。本研究はこの一連の対策において著者が主体的に研究を行い、得られた成果をとりまとめたものである。

本論文の第1章、第2章は既報の2編の公表論文を取りまとめたもので、第1章には、「1993年に西日本地域で発生した養殖クルマエビの大量死:疫学調査と感染実験」中野ら(1994)魚病研究29(2)を、第2章の病理組織学的検討には、「1993年に西日本地域で発生した養殖クルマエビの大量死:組織学的検討」桃山ら(1994)魚病研究29(2)、をそれぞれ割り当てた。第3章は、既報の4編の公表論文をもとに新たに取りまとめた。

本論文では、第1章で病気の発生状況と病原体の推定を、第2章では、PAVによって死亡したクルマエビの病理組織学的検討を行った。第3章では、第2章で得られた知見に基づいて、PAVの原因の特定、PAV原因ウイルスの形態の検討を行い、さらに疾病の迅速、簡易な診断方法について述べた。第4章では、原因ウイルスの病原性を明らかにするために必要な定量実験法を開発した。第5章では、防疫上重要と考えられる感染源の推定を行い、さらにウイルス対策に必要な、原因ウイルスの不活化についての知見と、その結果をもとにして、野外での消毒方法の実用化について記載した。最後に総合考察では、熊本県における防除対策の内容とその状況を示し、その結果と生産がどのように回復したのかについて述べた。

なお、本病は当初クルマエビの大量死として報告されたがその後病名が *Penaeid acute viremia*, PAV と提案された (Inouye *et al.*, 1996)。また、原因ウイルスの名称は、当初 Rod-shaped nuclear virus of *Penaeus japonicus*, RV-PJ の仮名が報告されたが (井上ら, 1994)、核酸分析の後に *Penaeid rod-shaped DNA virus*, PRDV の名称が Inouye *et al.* (1996) によって提案された。したがって本稿では、クルマエビの大量死と PAV 及び、RV-PJ と PRDV を同一語として扱っている。

引用文献

- Baozhen, P., R. Jiaming, S. Juying, Z. Guoying, G. Huiting, S. Yalin, Z. Guoxing and G. Zuxun (1995): The studies on baculovirus-caused disease of prawns (*Penacus chinensis* OSBECK) in Shanghai suburb. *Chinese Journal of Virology*, 11, 151-157.
- Bonami, J. R., B. Trumper, J. Mari, M. Brehelin and D. V. Lightner (1990): Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *Journal of General Virology*, 71, 2657-2664.
- Bonami, J. R., J. Mari, K. Hasson, L. Mohney and D. V. Lightner (1995): The Taura syndrome of penaeid shrimp: The etiological agent and diagnosis of the disease using gene probes. *John L. Fryer Retirement Celebration Oral*, U. S. A., 48p.
- Boonyaratpalin, S., K. Supamattya, J. Kasornchandra, S. Direkbusaracom, U. Aekpanithanpong and C. Chantanachooklin (1993): Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow head disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.*, 28, 103-109.
- Chamberlain, G. W (1994): Taura syndrome and China collapse caused by new shrimp viruses. *World Aquaculture*, 25, 22-25.
- Chou, HY., CY. Huang, CH. Wang, HC. Chiang and CF. Lo (1995): Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, 23, 165-173.
- Couch, J. A (1974): An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: ultrastructure, prevalence, and enhancement. *J. Invert. Pathol.*, 24, 311-331.
- 福田穎穂・桃山和夫・佐野徳夫(1988): 日本国内における *Monodon Baculovirus* 検出例. 日本水産学会誌, 54, 45-48.
- 井上 潔・三輪 理・大迫典久・中野平二・木村武志・桃山和夫・平岡三登里(1994): 1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死:電顕観察による原因ウイルスの検出. 魚病研究, 29, 149-158.
- Inouye, K., K. Yamano, N. Ikeda, T. Kimura, H. Nakano, K. Momoyama, J. Kobayashi and S. Miyajima (1996): The *Penaeid Rod-shaped DNA Virus* (PRDV), which causes *Penaeid Acute Viremia* (PAV). *Fish Pathol.*, 31, 39-45.
- Justo, C. C (1990): 世界のエビ類養殖 その基礎と技術. 緑書房, 東京, 4-5.
- 熊本県水産試験場(1985): 昭和58~59年度 組織的調査研究活動推進事業結果報告書 (天草・大矢野地域におけるクルマエビ養殖の実態把握とその安定化のための方策検討), 2-20.
- Lightner, D. V (1988): Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. In "Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture" (ed. by C. J. Sindermann and D. V. Lightner). Elsevier, Amsterdam, pp. 8-37.

- Lightner, D. V., and R. M. Redman (1981): A baculovirus caused disease of penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. *J. Invert. Pathol.*, **38**, 299-302.
- Lightner, D. V., and R. M. Redman (1985): A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *J. Invert. Pathol.*, **45**, 47-53.
- Lightner, D. V., R. M. Redman and T. A. Bell (1983): Infectious hypodermal hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease on penaeid shrimp. *J. Invert. Pathol.*, **42**, 62-70.
- 桃山和夫 (1981): クルマエビの伝染性中腸腺壊死症に関する研究-I, 発生状況及び症状. 山口内海水産試験場報告, 第8号.
- 桃山和夫 (1989): 消毒剤によるバキュロウイルス性中腸腺壊死症 (BMN) ウイルスの不活化. 魚病研究, **24**, 47-49.
- 桃山和夫 (1989): 紫外線、日光、熱及び乾燥によるバキュロウイルス性中腸腺壊死症 (BMN) ウイルスの不活化. 魚病研究, **24**, 115-118.
- Momoyama, K., and T. Sano (1988): A method of experimental infection of kuruma shrimp larvae, *Penaeus japonicus* Bate, with baculoviral mid-gut gland necrosis (BMN) virus. *J. Fish. Diseases*, **11**, 105-111.
- 中野平二・河邊 博・梅沢 敏・桃山和夫・平岡三登里・井上 潔・大迫典久 (1994): 1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死: 発生状況及び感染実験. 魚病研究, **29**, 135-139.
- 農林水産省統計情報部 (1971-1993): 昭和46年~平成3年漁業養殖業生産統計年報. 財団法人農林統計協会, 東京.
- 酒向 昇 (1992): えびに夢を賭けた男 藤永元作伝, 緑書房, 東京, 127-133.
- Sano, T., T. Nishimura, K. Oguma, K. Momoyama and N. Takeno (1981): Baculovirus infection of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan. *Fish Pathol.*, **15**, 185-191.
- 孫 修勤, 楠田理一 (1996): コウライエビの肝臓臓器パルボ様ウイルス病の組織学的研究. 水産増殖, **44**, 307-314.
- Tsing, A., and J. R. Bonami (1984): A new virus disease in the shrimp *Penaeus japonicus*. Abstracts of Premier Colloque International de Pathologie en Aquaculture Marine, France.
- Wongteerasupaya, C., J. E. Vickers, S. Sriurairatana, G. L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul and T. W. Flegel (1995): A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 69-77.
- Zhan, W., K. Yu and Q. Meng (1995): Study on baculovirus disease of *Penaeus chinensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, **2**, 22-28.

第1章 病気の発生と病原体の推定

1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死： 発生状況および感染実験

中野平二*¹・河邊 博*¹・梅沢 敏*²・桃山和夫*³
平岡三登里*³・井上 潔*⁴・大迫典久*⁵

(1994年3月3日受付)

Mass Mortalities of Cultured Kuruma Shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootiological Survey and Infection Trials

Heiji Nakano*¹, Hiroshi Koube*¹, Statoshi Umezawa*², Kazuo Momoyama*³,
Midori Hiraoka*³, Kiyoshi Inouye*⁴ and Norihisa Oseko*⁵

*¹ Kumamoto Prefectural Fisheries Research Center, Senouchi, Ohyano, Amakusa,
Kumamoto 869-36, Japan

*² Seikai National Fisheries Research Institute, Kokubu 49, Nagasaki 850, Japan

*³ Yamaguchi Prefectural Naikai Fisheries Experiment Station, Yamaguchi 754, Japan

*⁴ National Research Institute of Aquaculture, Inland Station, Tamaki, Mie 519-04, Japan

*⁵ Nansei National Fisheries Research Institute, Maruishi, Ohno, Saeki,
Hiroshima 739-04, Japan

(Received March 3, 1994)

From March to October in 1993, high mortality of more than 80% occurred among Kuruma shrimps, *Penaeus japonicus* (0.015–25.0 g in body weight) at farms in Hiroshima, Yamaguchi, Ohita, Kumamoto, Kagoshima and Okinawa prefectures in Japan. Abnormal red coloration or discoloration and white spot of the body were characteristic signs of the diseased shrimps. The high mortalities were noticed in all the shrimp farms that had imported juvenile Kuruma shrimps from China. This fact together with spreading pattern of the disease in shrimp farming areas suggested that the disease transmitted horizontally from the imported shrimps from China. No parasite or bacterium was found to be correlated with the disease. The disease was reproduced in healthy shrimps by injecting filtered (at 0.45 μm) homogenate of lymphoid organ of spontaneously diseased shrimps, suggesting the disease was caused by a virus.

1993年4月から10月にかけて、西日本各地のクルマエビ (*Penaeus japonicus*) 養殖場において行動が不活発で昼間も潜砂せず、食欲が減退し、体色の赤変ないし褪色と体表(外骨格)に白点の形成を主病徴とする原因不明の大量死が発生した。

我が国の養殖クルマエビに発生する疾病としては、これまでに中腸腺壊死症 (Sano *et al.*, 1981)、ビブリオ病 (高橋ら, 1985) と鰓黒病 (Egusa and Ueda, 1972) が知ら

れているが、今回の大量死はそれらの疾病に比べ死亡率が著しく高いこと、寄生虫、真菌、細菌検査で病死エビから本大量死の原因と考えられるような病原体が検出されなかったこと、外国産種苗を導入した養殖場を中心に発生していることなどから、日本では未知の疾病であることが強く疑われた。そこで筆者らはクルマエビを養殖している全ての県を対象として、この大量死の発生状況についてアンケート調査を行うとともに、熊本県下のクルマエビ養殖経営体について疫学的調査を行った。

また病死エビを用いて感染実験を行ったのでそれらの結果について報告する。

*¹ 熊本県水産研究センター

*² 水産庁西海区水産研究所

*³ 山口県内海水産試験場

*⁴ 水産庁養殖研究所玉城庁舎

*⁵ 水産庁南西海区水産研究所

材料および方法

1. 大量死発生状況

1993年7月から11月にかけて、クルマエビを養殖している全ての県17県を対象として各県の水産試験場に対して、外国産種苗の導入の有無、大量死発生の有無、累積死亡尾数、病死エビのサイズ及び国産種苗の大量死発生の有無について、アンケート調査を行った。

また熊本県下の全てのクルマエビ養殖経営体について、養殖池ごとに上記アンケート調査と同じ項目のほか、大量死の発生した月日、導入種苗の由来を電話及び面接により調査した。さらに、大量死の発生に際しては、常法により病原体検査を実施した。

2. 病原体検査

熊本県及び山口県で得られた病エビについて体重、体長を測定後、寄生虫や真菌等の寄生の有無を実体顕微鏡で調べるとともに、リンパ様器官または腹部筋肉からZobell 2216E寒天培地を用いて細菌の分離を試みた。培養は25°Cで24時間行い、培養後純培養的に出現したコロニーについては抗血清を用いてスライド凝集反応を行い *Vibrio* sp. PJ (Pena *et al.*, 1993) か否かを調べた。

3. 感染実験

感染実験は接種材料を変えて合計3回実施した。

感染実験 I

感染源：大分県及び山口県のクルマエビ養殖場で採取した自然発症個体各20尾からリンパ様器官を摘出し、10倍量の Hank's BSS を加えて磨碎し、5°Cで3000

rpm, 15分間遠心分離後、上清を孔径0.45 µmのフィルターで濾過して得られた濾液を接種液とした。

接種方法：大量死の発生していない鹿児島県奄美大島で飼育されていたクルマエビ(平均体重3.5g)を供試エビとし、腹部筋肉内に接種液を1尾あたり0.1mlずつ注射した。対照群には Hank's BSS を0.1mlずつ注射した。供試尾数は各区10尾とした。

実験期間中の水温は23°C~24°Cであった。

感染実験 II

感染源には、感染実験 I で、山口県産病エビの磨碎濾液接種によって3日後に死亡した5個体を用い、接種液の調製法、接種方法は実験 I と同様の方法で行った。

供試エビの平均体重は4.3g, 実験期間中の水温は23°C~24°Cであった。

感染実験 III

感染源には熊本県のクルマエビ養殖場で採取した自然発症エビを用いた。

供試エビには熊本県栽培漁業協会大矢野事業場で生産した健康なクルマエビ(平均体重1.8g)を用いた。接種液調製法、接種方法は感染実験 I と同様とした。なお対照区には天然産クルマエビのリンパ様器官を病エビと同様の方法で調製して得た磨碎濾液を注射した区と Hank's BSS を注射した区の2区を設けた。

実験期間中の水温は19.6°C~22.4°Cであった。

結 果

1. 大量死発生状況

西日本の発生状況

アンケート調査の結果を取りまとめて Table 1 に示した。

Table 1. Occurrences of mass mortality of the cultured kuruma shrimp in Japan in 1993

Prefecture	Total No. of farms	Introduction of foreign kuruma shrimp			Occurrence	Mass mortality			Dead shrimp	
		No. of farms	Export country	Month		No. of farms	Mortality	Month	Number (10 ⁶)	Body weight
Hiroshima	1	1	China	Apr.	Yes	1	100* ¹	Apr.	4.2	0.02-13.0
Yamaguchi	11	2	China	Mar.-Apr.	Yes	4	100	Apr.-Sept.	16.1	0.3 - 8.0
Ohita	5	1	China	Apr.	Yes	1	86.8-100	Apr.-Jul.	1.8	5.5 -11.0
Kumamoto	68	10	China	Apr.-May	Yes	50	50 -100	Mar.-Oct.	38.7	0.01-22.5
Kagoshima	15	1	China	Mar.	Yes	1	90 -100	May-Jun.	3.4	0.8 - 4.0
Okinawa	19	1	China	Apr.	Yes	1	100	Apr.-Jun.	10.2	2.0 -20.0
Others* ²	31	0	—	—	No	—	—	—	—	—

*¹ Survivals were killed with chlorine.

*² Others include following prefectures; Niigata, Ishikawa, Kyoto, Wakayama, Hyogo, Ehime, Kagawa, Tokushima, Saga, Nagasaki, Miyazaki.

大量死の発生は広島以西の6県（広島県，山口県，大分県，熊本県，鹿児島県，沖縄県）から報告があった。これらの県ではいずれも中国からクルマエビの種苗が導入されており，導入された中国産種苗には全ての例で大量死が発生していた。この中国産種苗は，中国福建省の種苗生産場でおがくず詰めにして廈門空港から福岡，大阪，名古屋に空輸され，その後西日本各地の養殖場に導入されていた。導入時のサイズは0.02～8gで，導入後早い発症例では翌日，遅い発症例でも4週間後には死亡が始まった。

一方，中国からクルマエビ種苗を導入しなかった県では大量死の発生はみられなかった。

また，死亡の状況には中国産と日本産種苗との間で差が認められ，中国産種苗では推定日間死亡率数%の死亡が継続する例が多かったのに対して，日本産種苗の場合には少数の死亡個体に気づいてから数日以内に大部分のクルマエビが死亡する例が多かった。しかし，累積死亡率には両者の間で特に差は認められず，全発症報告例（58例）の83%で累積死亡率は80%以上であった。

熊本県下の発生状況

養殖業者からの聞き取り調査によれば，今回の大量死は死亡率が非常に高く，短期間に急激な大量死が起こる場合が多いなど，他県の事例に一致する状況を呈した。

Fig. 1に熊本県大矢野町の一養殖地域における大量死の発生状況を示した。5月18日にA地区の中国産種苗導入池（導入日4月21日）で最初に大量死が発生し，その後，図示（Fig. 1, A地区拡大図）するように隣接する池へほぼ同心円状に広がり，5月18日から6月16日にかけてA地区の全ての養殖池で大量死が起こった。大量死はさらに近隣の地区にも広がり，6月18日～22日にかけてB地区，6月30日にはF地区，7月20日にはC地区，7月28日にはD地区，7月31日にはE地区で発生し，A地区の初発からほぼ2ヵ月の間に当該地域の全養殖池が大量死による被害を被った。

Fig. 2には熊本県下全域における月別発生件数と水温の変動を示した。大量死の発生件数は4月に8件の報告があり，5月，6月と急激に増加し，7月には26件とピークに達した。その後8月と9月も高い値を示したが，10月には3件に減少し，11月以降の報告はなかった。この

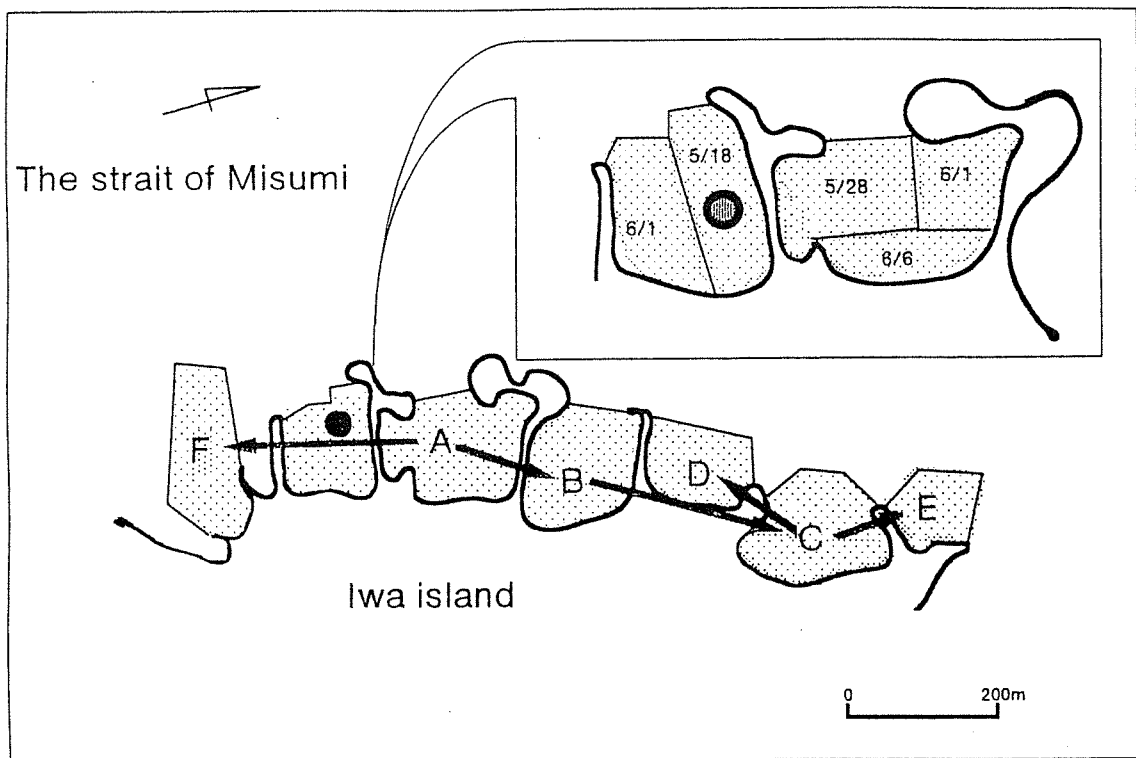


Fig. 1. Spreading of the mass mortalities of kuruma shrimps at Iwa-island region in Kumamoto prefecture. ●, The culture pond the introduced kuruma shrimp from China; →, presumable transmission route of the disease. Dates in the figure show the days when mortalities occurred.

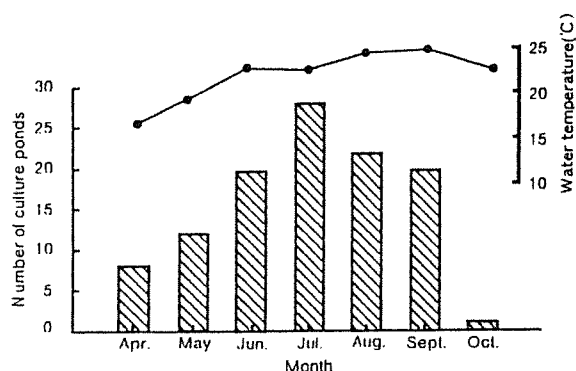


Fig. 2. Monthly changes in the number of the ponds in where mortality occurred in Kumamoto prefecture. Closed circles show changes in water temperature (°C).

間の総件数は127件にのぼった。またこの期間に死亡したクルマエビのサイズは0.01gから22.5gで、大量死は稚エビから未成エビまでの広い範囲に及んだ。

2. 病原体検査

本大量死の原因と考えられるような寄生虫や真菌は観察されなかった。病エビからの細菌分離結果を Table 2 に示した。病エビからの細菌の分離状況は月によって異なり、最も高い9月でも53.5%であった。これらの個体からはコロニーの形態が異なるいろいろな細菌が分離され、このうち *Vibrio* sp. PJ が分離された個体の割合は5月が1.6%、6月が13.7%、7月が8.9%、9月が35.7%であった。*Vibrio* sp. PJ 以外の細菌については菌種を特定することはできなかった。

3. 感染実験

結果を Table 3 に示した。接種区では、感染源として用いたエビの経歴とは関係なくいずれの区でも大部分のクルマエビが接種後4日以内に死亡し、10日後には全て死亡した。それらの死亡個体には体色の赤変または褪色及び外骨格に白点が認められた。一方対照区では、Hank's BSS 接種区はもとより、天然産クルマエビのリンパ臓器の磨碎濾液注射区においても死亡個体や体色の

Table 2. Detection of *Vibrio* sp. PJ from moribund kuruma shrimp in farms in Kumamoto and Yamaguchi prefectures

Month	Number of shrimp examined	Body weight (g)	Detection rate (%)		
			<i>Vibrio</i> sp. PJ	Other Bacteria	Total
April	12	9.4-16.9	0	0	0
May	63	3.9-25.0	1.6	33.3	34.9
Jun	102	0.3-21.2	13.7	15.7	29.4
July	56	0.1-18.6	8.9	41.1	50.0
August	39	0.3- 4.4	0	46.2	46.2
September	28	0.9-22.5	35.7	17.8	53.5
October	5	19.3-22.9	0	0	0

Table 3. Mortality of kuruma shrimp by intramuscular inoculation of the filtrate of lymphoid-organ homogenate prepared from various sources

Experimental group	Sources of inoculum		No. of shrimp used	Number of dead shrimp										Total	Mortality (%)
	Shrimp	Sampling place		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*1		
I	Spontaneously diseased shrimp	Yamaguchi	10	1	2	7								10	100
	Spontaneously diseased shrimp	Ohita	10	2	6	2								10	100
	Control (Hank's BSS)		10											0	0
II	Experimentally infected shrimp	Yamaguchi	7	1	1	1	1	1	1			1	7	100	
	Control (Hank's BSS)		7										0	0	
III	Spontaneously diseased shrimp	Kumamoto	9	3	6								9	100	
	Control 1 (Hank's BSS)		10										0	0	
	Control 2 (non-infected shrimp)		9										0	0	

*1 Days after inoculation

異常は認められなかった。

考 察

今回西日本で発生した養殖クルマエビの大量死は発生状況や死亡エビの外部病徴から全て同一の疾病によると考えられる。病原体検査ではクルマエビのビブリオ病原菌である *Vibrio* sp. PJ が分離される場合もあったが、その検出率は低く、*Vibrio* sp. PJ が本大量死の原因とは考えられなかった。また *Vibrio* sp. PJ 以外の分離菌についてはコロニーの形態から複数の菌種であることが推測され、これらは特定の病原体というより、瀕死エビに二次的に侵入したか、あるいは細菌の分離過程で混入したものと考えられる。さらに病死エビからは本大量死と密接に関連すると考えられるような寄生虫や、真菌も観察されなかった。

自然発症エビの磨砕濾液の筋肉注射では、自然発症個体と同様の体色の赤変を呈してクルマエビが死亡し、さらにそのようにして得られた実験感染エビの磨砕濾液の筋肉注射により、再度同様の結果が得られた。これらの結果は、本大量死が濾過性病原体によって引き起こされたことを強く示唆している。

大量死発生状況調査によれば大量死は中国産種苗導入県にのみ発生し、導入していない県には発生していないこと、中国産種苗導入養殖池を中心としてほぼ同心円状に発生が見られることなど中国産種苗の導入と密接に関連している。さらに、国内のクルマエビ養殖業界では、現在まで今回のような劇的な大量死をもたらすクルマエビの疾病の経験はないことを考慮すると、今回の大量死原因病原体は中国産種苗とともに日本に持ち込まれた可能性が高い。

要 約

1. 1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死に関連してクルマエビ養殖を行っている17県を対象に、その発生状況を調べるとともに、病エビを用いて

感染実験を行った。

2. 大量死の発生は中国産種苗の導入と密接に関連していた。

3. 死亡率は発生例の約8割が80%以上であり、死亡エビのサイズは0.01g~22.5gと範囲は広がった。

4. 大量死の原因と考えられるような細菌、真菌、寄生虫は検出できなかった。

5. 自然発症及び実験感染クルマエビの磨砕濾液の筋肉注射によりクルマエビは容易に死亡し、死亡エビは自然発症個体と同様の症状を呈した。

6. 以上の結果より、今回の大量死の原因としては濾過性病原体が強く疑われ、それは中国産クルマエビとともに日本に持ち込まれたものと推定された。

謝 辞

抗 *Vibrio* sp. PJ 血清の分与及び、細菌検査について種々御教示していただいた広島大学室賀清邦教授ならびに、中井敏博助教授に深謝する。また、アンケート調査に際しご助言いただいた水産庁南西海区水産研究所佐古浩室長ならびに、実験材料を提供していただいた大分県水産試験場福田 稔氏に感謝する。

文 献

- Egusa, S. and T. Ueda (1972): A *Fusarium* sp. associated with black gill disease of the kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **38**, 1253-1260.
- Pena, D. I. D., T. Tamaki, K. Momoyama, T. Nakai and T. Muroga (1993): Characteristics of the causative bacterium of vibriosis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, **115**, 1-12.
- Sano, T., T. Nishimura, K. Oguma, K. Momoyama and N. Takeno (1981): Bacurovirus infection of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* in Japan. *Fish pathol.*, **15**, 185-191.
- 高橋幸則・下山泰正・桃山和夫 (1985): 養殖クルマエビから分離された *Vibrio* 属細菌の病原性ならびに性状. *日水誌*, **51**, 721-730.

第 2 章 病理組織学的検討

1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死： 病理組織観察

桃山和夫^{*1}・平岡三登里^{*1}・中野平二^{*2}・河邊 博^{*2}
井上 潔^{*3}・大迫典久^{*4}

(1994年3月1日受付)

Mass Mortalities of Cultured Kuruma Shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Histopathological Study

Kazuo Momoyama^{*1}, Midori Hiraoka^{*1}, Heiji Nakano^{*2}, Hiroshi Koube^{*2},
Kiyoshi Inouye^{*3} and Norihisa Oseko^{*4}

^{*1} Yamaguchi Prefectural Naikai Fisheries Experiment Station, Yamaguchi 754, Japan

^{*2} Kumamoto Prefectural Fisheries Research Center, Senouchi, Ohyano-cho, Amakusa-gun,
Kumamoto 869-36, Japan

^{*3} National Research Institute of Aquaculture, Inland Station, Tamaki, Mie 519-04, Japan

^{*4} Nansei National Fisheries Research Institute, Maruishi, Ohno-cho, Saeki-gun,
Hiroshima 739-04, Japan

(Received March 1, 1994)

In 1993 very high mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, outbreaked in Japan, forcing many shrimp farms to be temporarily closed.

Moribund shrimp exhibited red coloration or discoloration and small white spots on the body. Degenerated cells characterized by hypertrophied nuclei, being stained homogeneously with hematoxylin, were observed in various tissues originated from meso- and ectoderm, such as cuticular epidermis (most frequently), connective tissue, lymphoid organ, antennal gland, hematopoietic tissue and nervous tissue. Hemocytic encapsulations, ranging from 20 to 50 μm in diameter, of necrotic cells were also frequently observed in many shrimp examined. No difference in histopathological characteristics between spontaneously diseased and experimentally infected shrimp was recognized. Moreover, the same histopathological changes were observed in a kuruma shrimp which was sampled from the imported package from China, sacrificed one day after arrival in Japan.

Histopathological comparison of this disease with the already-known diseases of penaeid shrimp suggested that this is a new infectious disease in penaeid shrimp of which etiological agent might be a virus.

1993年に西日本で、体色の赤変ないし褪色と体表（外骨格）の白点の形成を主病徴とする養殖クルマエビ、*Penaeus japonicus*、の大量死が発生し、多数の経営体が休業に追い込まれるなど、極めて甚大な被害を生じた。クルマエビ養殖業界ではこのような劇的な大量死の経験は過去になく、業者からの検査依頼が相次いだ。

著者らは本現象解明のため、疫学的調査、病原体検査、感染実験、病理組織観察、電子顕微鏡観察など一連の調査研究を行ってきた。ここでは病理組織観察の結果について報告する。

材料および方法

1. 観察材料

自然発症個体

中国から輸入された（以下中国産と記す）、または、日本で生産された（以下日本産と記す）クルマエビ種苗を

^{*1} 山口県内海水産試験場

^{*2} 熊本県水産研究センター

^{*3} 水産庁養殖研究所玉城庁舎

^{*4} 水産庁南西海区水産研究所

Table 1. Source of spontaneously diseased kuruma shrimp used for histopathological examination

Group	Origin of shrimp	Date of sampling	Number of shrimp examined	Mean body length (cm)
I	China	May 10, 1993	4	7.8
II	China	May 14	3	8.8
III	Japan	Jul. 26	3	3.8
IV	Japan	Aug. 30	6	8.7
V*	China	Apr. 9	7	7.5
VI*	China	Apr. 27	2	8.0

* Group V and VI, showing no external clinical signs, had been imported 3 and 1 day(s) before fixing, respectively. In these populations no mass mortality was observed when shrimp were sampled.

Table 2. Source of experimentally infected^{*1} kuruma shrimp used for histopathological examination

Experimental group	Origin of inoculum ^{*2}	Shrimp			
		Mean body length (cm)	Number examined	Days after inoculation	Condition of shrimp
I	China	5.6	5	4-7	moribund
II	Japan	6.9	6	10	survived
III-1 ^{*3}	Japan	6.9	3	1	
III-2 ^{*3}			3	2	

^{*1} Intramuscular injection.

^{*2} Lymphoid organ, heart and gill were pooled.

^{*3} Shrimp were randomly sampled.

用いて養殖中に大量死が発生した際に得られた衰弱個体を用いた (Table 1)。

実験感染個体

感染源に中国産または日本産クルマエビを用い、中野 (1994) の方法にほぼ準じて実施した合計 3 回の磨砕濾液筋注法による感染実験において接種 1, 2 日後に無作為に抽出された個体、瀕死個体、実験終了時の生残個体 (Table 2) を主な観察材料とした。

中国から輸入直後の個体

中国から輸入直後に保菌検査を目的として研究室へ搬入された外見的異常の認められない衰弱個体 (Table 1, group V & VI) も材料の一部に加えた。

2. 観察方法

生鮮標本について外見的異常の有無等を観察した後、鰓および頭胸部を Davidson 液で固定した。頭胸部の薄切部位はほぼ正中線上の縦断面とし、常法により厚さ約 5 μ m のパラフィン切片を作成後、Mayer の Hematoxylin-Eosin 染色、PAS-Hematoxylin 染色、Azan 染色、Giemsa 染色および Feulgen 反応を適宜実施して病理組織観察に供した。

結 果

1. 自然発症および実験感染個体

自然発症個体 (中国産および日本産クルマエビとも) と実験感染個体との間に症状の差は認められなかった。

(1) 生鮮標本

病エビには 2 種類の顕著な肉眼的異常が認められた。その一つは体色の軽い赤変と褪色であり、実験感染個体の大部分はこのような体色の異常を示したが、養殖場における死亡個体では体色の異常が認められないものが多かった。

もう一つの異常は、外骨格における大きさ数 mm 以下の多数の白点の形成 (Fig. 1) であった。白点は顕微鏡下では菊の花紋のように観察され、外骨格表面の薄い透明層と、その直下の外骨格内のやや厚い不透明層から構成されていた (Fig. 2)。多くの白点では、不透明層は透明層よりやや小さく、ほぼ同心円状に位置していたが、Fig. 2 の左の白点に見られるようにその一部が透明層の輪郭の外側にはみ出しているもの、全く観察されないかあるいはわずかにしか認められないものなど、必ずしも白点の構造は一定していなかった。低倍率の透過顕微鏡下では不透明層は青味を帯びて観察される場合があっ

養殖クルマエビ大量死の病理組織

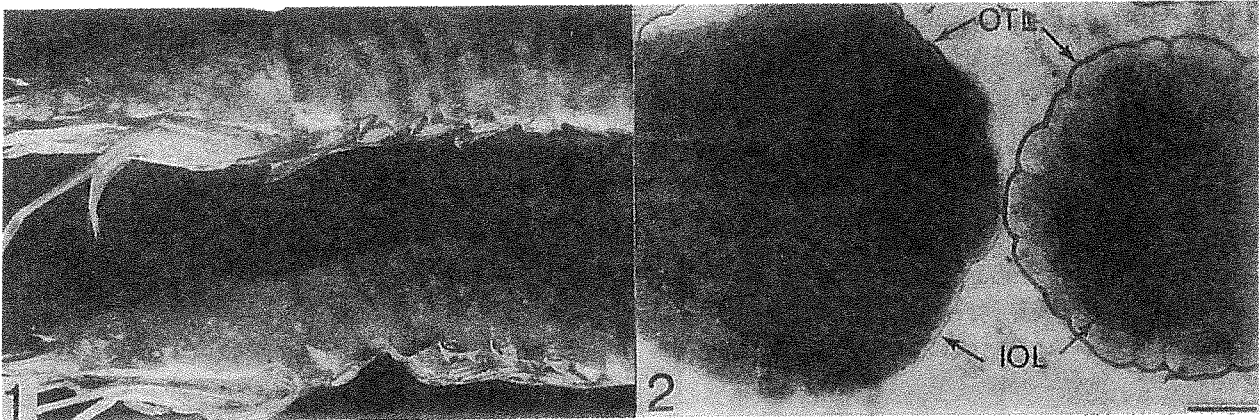
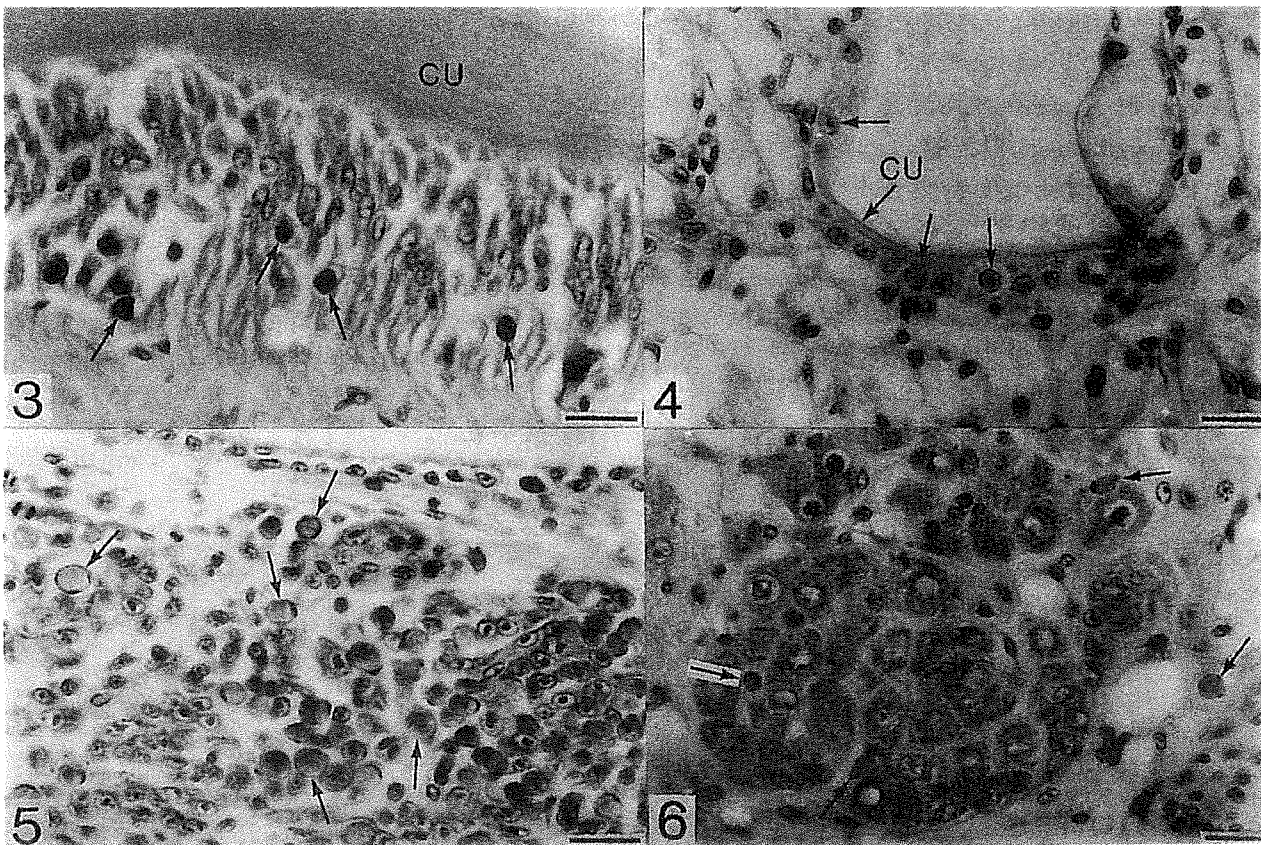


Fig. 1. External appearance of spontaneously diseased kuruma shrimp. Note many white spots on the body.
 Fig. 2. Photomicrograph of the white spots. White spots usually consist of larger outer transparent layer (OTL) on and smaller inner opaque layer (IOL), which is darkly seen in the picture, in the exoskeleton, as shown in the right white spot. But in the left white spot a part of the opaque layer protrudes out of the border of the transparent layer. Bar length = 200 μ m.



Figs. 3-6. Photomicrographs of some different tissues showing degenerated cells having hypertrophied nuclei (arrows). HE stain. Bar length = 20 μ m. 3: Cuticular epidermis under the cephalothorax exoskeleton of an experimentally infected shrimp. CU: cuticle. 4: Cuticular epidermis in the gill of an experimentally infected shrimp. CU: cuticle. 5: Stem cells in the hematopoietic tissue of an experimentally infected shrimp. 6: Glial cells in the brain of a spontaneously diseased shrimp.

た。また、透明層部分が幾重にも重なっているものもみられた。白点は白さの程度が顕著でないものでは肉眼的に認め難い場合も多く、特に実験感染個体の大部分がそうであった。この場合、外骨格を皮下組織から剥がし解剖顕微鏡下に置くことにより、比較的容易に白点を観察することができた。これらの白点は酸で容易に溶解した。

なお、このような白点は本大量死が発生していない養殖場の概ね健康と判断されたクルマエビにも小数ながらしばしば観察され、特に外骨格表面の顕微鏡的大きさの

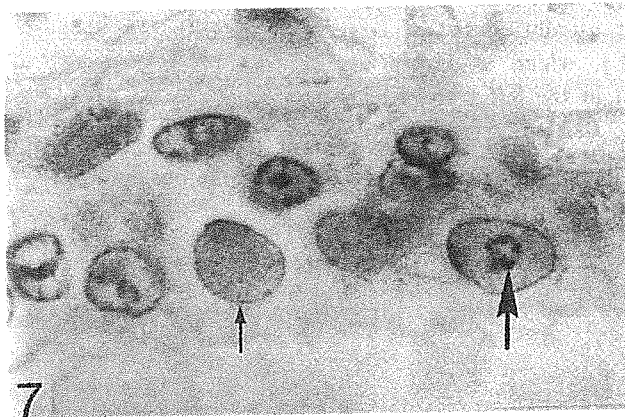


Fig. 7. Photomicrograph of hypertrophied nuclei of cuticular epidermis in the stomach of an experimentally infected shrimp. An arrow indicates a typically hypertrophied nucleus stained homogeneously with hematoxylin. A bold arrow indicates granule-like particles in the center of the hypertrophied nucleus. HE stain. Bar length = 10 μ m.

透明層は外傷部分や脱皮殻には多数認められた。

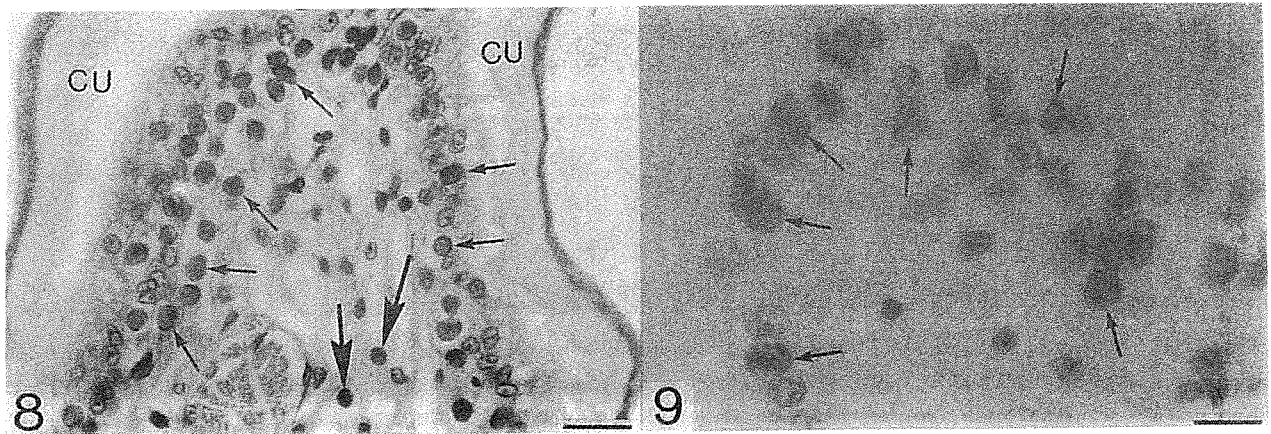
(2) 組織標本

組織学的異常は皮下組織、結合組織、リンパ様器官、鰓、触角腺、造血組織、心臓、中枢神経など中・外胚葉起源の様々な組織や器官で観察されたが、中腸腺、筋肉、外骨格には明瞭な病変は認められなかった。病変は病理組織学的には用いた個体によって若干様相が異なり、以下に述べる宿主無反応型と宿主反応型と考えられる2型に大きく分類することができた。

なお、小数個体で短桿菌の増殖果がリンパ様器官等に観察されたが、真菌や寄生虫等は観察されなかった。

宿主無反応型

病変部における宿主の反応が乏しいもので、自然発症群 III および実験感染群 I, III-2 の全と、自然発症群 I の一部の個体で観察された。クチクラ層下の上皮細胞 (Figs. 3 and 4)、結合組織細胞、リンパ様器官細胞、触角腺上皮細胞、血球、造血組織幹細胞 (Fig. 5)、神経膠細胞 (Fig. 6) など様々な組織の種々の細胞で核の肥大、核小体の偏在・扁平化、核質の核膜周辺部への移行および核内無構造化を特徴とする細胞病理変化が観察された。このような異常核の中心部には Hematoxylin および Feulgen 反応で濃染される顆粒状の物体が集合している像もしばしば観察された (Fig. 7)。しかし、異常核の肥大の程度や染色性などは細胞の種類によってかなり異なっていた。封入体は核内にも細胞質内にも認めることはできなかった。異常核が観察された組織のなかでその出現割合と肥大の程度が最も著しかったのは胃の上皮細胞層 (Fig. 8) で Feulgen 反応も強い陽性を示した (Fig. 9)。重



Figs. 8 and 9. Severely affected cuticular epidermis in the stomach of a spontaneously diseased shrimp. 8: Nuclei of the epithelial cells are hypertrophied (arrows). Such nuclei (bold arrows) are also seen in the cells of loose connective tissue. CU: cuticle. HE stain. Bar length = 20 μ m. 9: Hypertrophied nuclei (arrows) are densely and homogeneously stained with Feulgen reaction. Bar length = 10 μ m.

篤な病変を示す個体では著しい血球数の減少が認められた。

リンパ様器官では、細胞核の肥大・無構造化を呈する変性細胞が比較的少なかったのに対して、本器官の固有の構造である鞘構造 (Oka, 1969) の崩壊が目立った (Fig. 10)。また、しばしば核分裂像も観察された。接種1日後に採材された実験感染群 III-1 の1個体では、リンパ様器官細胞に異常は認められなかったが、鞘をとり囲んでいる結合組織細胞に異常核が観察され、その部分では鞘の崩壊が始まっていた (Fig. 11)。

宿主反応型

病変部における宿主の積極的細胞性反応が認められるもので、自然発症群 I, II, IV および10日間の感染実験終了時に生残していた実験感染群 II の大部分の個体で観察された。

宿主無反応型で多数観察された肥大・無構造核は胃およびその周辺の疎性結合組織、鰓、触角腺で少数観察された一方、これらの組織では変性・壊死細胞を血球が被包している像 (Figs. 12 and 13) が普通に観察された。この結節様構造物の大きさは20~50 μm の範囲のものが

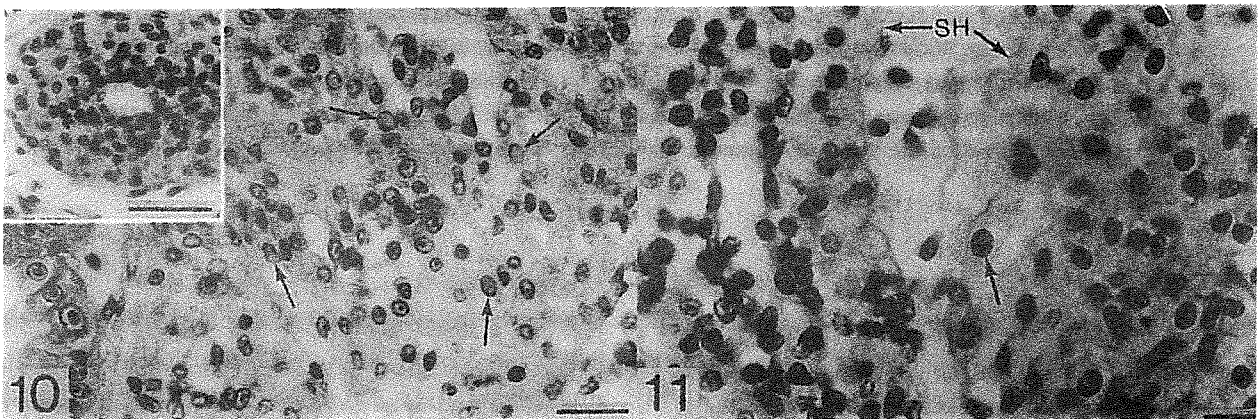


Fig. 10. Lymphoid organ of an experimentally infected shrimp. The sheaths have markedly degenerated, while typically hypertrophied nuclei (arrows) are not so many as in some other tissues such as the stomach epithelium. HE stain. Bar length = 20 μm . Inset: Lymphoid organ of a healthy shrimp. HE stain. Bar length = 30 μm .

Fig. 11. Lymphoid organ of an experimentally infected shrimp fixed 1 day after inoculation. Note the collapsing of the right sheath around the degenerated connective tissue cell having hypertrophied nucleus (arrow). Lymphoid organ cells look normal. SH: Sheath. HE stain. Bar length = 10 μm .

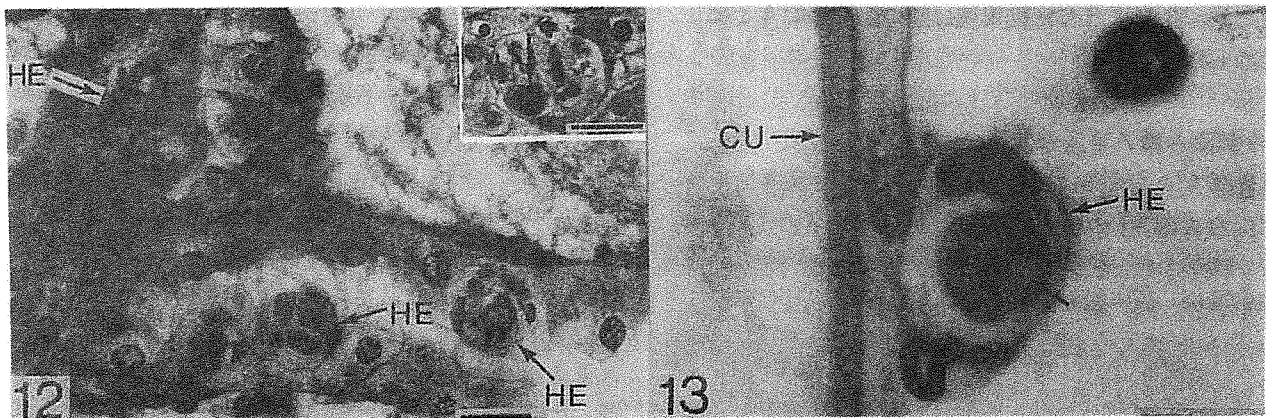
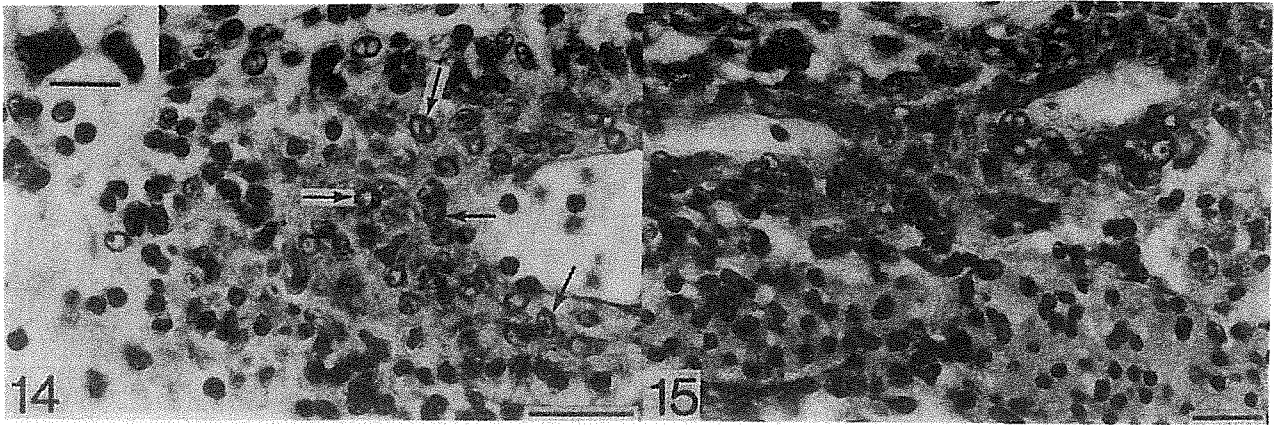


Fig. 12. Antennal gland of a spontaneously diseased shrimp, showing hemocytic encapsulations (HE) in the epithelium. Inset: A hypertrophied nucleus (arrow) can be seen in the hemocytic encapsulation formed in the antennal gland epithelium. HE stain. Bar length = 20 μm .

Fig. 13. A hemocytic encapsulation (HE) in the gill sinus of a spontaneously diseased shrimp. An arrow indicates a necrotic cell having hypertrophied nucleus. CU: Cuticle. HE stain. Bar length = 10 μm .



Figs. 14 and 15. Lymphoid organ of a spontaneously diseased shrimp. 14: Severe hemocytic infiltration is seen at the collapsing peripheral area of the sheath. Nuclei of many lymphoid organ cells are hypertrophied (arrows), but the nucleoplasm does not show a homogeneous appearance as found in the degenerated cells of the cuticular epidermis as shown in Fig. 7. HE stain. Bar length=25 μ m. Inset: Foreign bodies laden phagocytes. HE stain. Bar length=10 μ m. 15: Mass of cellular aggregation in the sinus is seen lower half of the picture. Boundaries between the cells are indistinct. HE stain. Bar length=20 μ m.

ほとんどで、中心部分にはしばしばメラニン色素の沈着が認められた。また、多くの個体で Hematoxylin 好性で Feulgen 反応陰性の異物を細胞質内に内包している血球や食細胞が多数観察された (Fig. 14)。

リンパ様器官では、鞘をとり囲んでいる膠原線維の配列の乱れと消失に伴う鞘構造の崩壊とそこへ著しい数の血球が浸潤している像、およびリンパ様器官細胞の核の肥大が目立った (Fig. 14)。しかし、肥大核には宿主無反応型で観察されたような核内無構造化は認められなかった。また、鞘と鞘との間隙を細胞境界不明瞭な細胞の集団が埋め尽くしている像 (Fig. 15) も多くの個体で観察されたが、このような細胞集塊は鰓の血管等にもしばしば認められた。

2. 中国から輸入直後の個体

検査群 V には特に異常を観察することができなかったが、検査群 VI の 1 個体で、自然発症および実験感染個体で観察された核の肥大と核内無構造化を特徴とする変性細胞が、胃、触角腺、鰓等で明瞭に認められた。

考 察

今回観察した自然発症 (中国産および日本産とも) および実験感染 (感染源として用いたクルマエビが中国産または日本産であるか否かには関わりなく) クルマエビの間には症状に差は認められず、これらは全て同一の疾病であり、ある種の濾過性病原体によって引き起こされ

たものと推測される。

本疾病は肉眼的には体色の赤変と外骨格の白点形成が特徴的であったが、それらの異常を組織学的に病変として観察することはできなかった。体色の赤変は軽度の場合が多く、また白点については概ね健康と判断されるクルマエビにもしばしば観察されることから、これらの肉眼的異常で本疾病を診断することは困難である。

本疾病の病理組織像は、胃をはじめとするクチクラ層下の上皮細胞層、結合組織、リンパ様器官、造血組織など様々の組織ないし器官における種々の細胞の核の肥大と無構造化を伴う細胞の変性によって特徴づけられることが明らかとなった。リンパ様器官では、それらの肥大・無構造核が比較的少なかったのに対して、その固有の構造である鞘構造の崩壊や血球浸潤、リンパ様器官細胞核の肥大など重度の病変が見られた。これらの病変は、鞘をとり囲んでいる結合組織細胞の壊死と深く関わっているものと考えられる。観察材料は、病変部における宿主の反応が乏しいタイプと顕著なタイプの 2 型に大きく分けることができたが、前者は急性型、後者は慢性型を意味していると考えられる。慢性型の個体では、大きさ 20~50 μ m のしばしばメラニン色素の沈着を伴った結節様構造物が普通に観察されたが、ビブリオ病の特徴的病変とされる黒色小結節 (江草ら, 1988) とは、結節中心部に細菌の増殖巣が認められないことで明らかに区別される。

現在、クルマエビ属エビ類からは 13 種のウイルスが

報告されている (Lightner *et al.*, 1992; Nadala *et al.*, 1992; Boonyaratpalin *et al.*, 1993)。これらのなかで、細胞病理学的に著しい核の肥大をもたらすウイルスは BP (Couch, 1974), BMNV (Sano *et al.*, 1981), MBV (Lightner *et al.*, 1983a) および PBV (Lester *et al.*, 1987) が知られているが、これらのバキュロウイルスは標的器官が中腸腺 (腸を含む) に限られており、今回病変が観察された組織や器官とは全く異なっている。IHHNV (Lightner *et al.*, 1983b) は主として皮下組織と造血組織に壊死を引き起こす Parvo-like ウイルス (Lightner *et al.*, 1992) で、クルマエビにも実験的には比較的強い病原性を有すること (Lightner *et al.*, 1992)、台湾にも存在が確認されていること (Lightner *et al.*, 1987)、更に台湾から多数のクルマエビ種苗が日本へ輸入されていること、などからその日本への持ち込みが懸念されているが (Momoyama, 1992)、IHHNV 感染細胞では肥大核内に Eosin 好性の Cowdry type A と呼ばれる封入体が形成されることにより今回の疾病とは明らかに区別される。極く最近タイの養殖ウシエビ, *Penaeus monodon* から発見された YBV (Boonyaratpalin *et al.*, 1993) は稚エビから未成エビまで広い範囲のエビに強い病原性を有すること、大量死は多くの場合数日間という短期間に生ずること、侵される細胞は皮下組織、結合組織、造血組織、リンパ様器官など外・中胚葉起源の様々な組織で認められること、感染核の肥大も観察されることなど、今回の疾病と似た点が多い。しかし、YBV 感染エビでは本疾病で最も顕著であった胃のクチクラ層下の上皮細胞層における病変については全くふれられていないこと、Ferulgen 反応陽性の細胞質内封入体が観察されていることなど重要な相違点も多く、両疾病は異なるものと判断される。以上のことから本疾病はクルマエビ属エビ類ではこれまでに報告のなかった新しい疾病であると考えるのが妥当であろう。

本大量死の原因はこれまで述べてきた如く濾過性病原体の関与が強く疑われるが、その由来については、中野ら (1994) は疫学的調査結果に基づいて、中国から輸入されたクルマエビ種苗とともに日本へ持ち込まれたのではないかと推測している。今回の検査で中国から日本へ到着したその翌日に採材された 1 個体に、本疾病を特徴づける細胞核の肥大と核内無構造化を示す変性細胞が明瞭に観察されたことは極めて注目に値する。養殖業者からの聞き取り調査によれば、養殖種苗用クルマエビは現地でオガクズとともにダンボール箱に詰められ、空路福岡または大阪空港を経由して直ちに各養殖場へ搬入される。輸送に要する日数は 1~2 日間で、この間梱包が解か

れることはない。本疾病の細胞病理学的特徴が電子顕微鏡観察によってウイルス感染と密接に関連していることが証明されれば、この 1 尾のクルマエビはそのウイルスが中国に存在していたことの有力な証拠となる。

要 約

1. 1993 年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死に関連して、自然発症個体、実験感染個体および輸入直後の採材個体について病理組織観察を行った。
2. 自然発症および実験感染個体間で症状に差は認められず、両者は同一の疾病であると判断された。
3. 病エビの肉眼的な異常な体色の赤変ないし褪色と外骨格における大きさ数 mm 以下の白点の形成であった。
4. 白点は基本的には外骨格標本の薄い透明層とその直下の外骨格内のやや厚い不透明層とから構成されていた。
5. 本疾病の病理組織像は皮下組織をはじめ、中・外胚葉起源の様々な組織における種々の細胞の核の肥大と無構造化を伴う細胞の変性によって特徴づけられた。
6. 本疾病はクルマエビ属エビ類の新しい疾病であると考えられ、その原因としては濾過性病原体が疑われた。
7. 中国から輸入翌日に採材されたクルマエビに本疾病の特徴的病理組織像が明瞭に観察され注目された。

文 献

- Boonyaratpalin, S., K. Supamattaya, J. Kasornchandra, S. Direkbusaracom, U. Aekpanithanpong and C. Chantanchooklin (1993): Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow head disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.*, **28**, 103-109.
- Couch, J. A. (1974): An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: ultrastructure, prevalence, and enhancement. *J. Invert. Pathol.*, **24**, 311-331.
- 江草周三・高橋幸則・伊丹利明・桃山和夫 (1988): クルマエビのビブリオ病の病理組織学的研究. *魚病研究*, **23**, 59-65.
- Lester, R. G. J., A. Doubrovsky, J. L. Paynter, S. K. Sambhi and J. G. Atherton (1987): Light and electron microscopic evidence of baculovirus infection in the prawn *Penaeus plebejus*. *Dis. Aquat. Org.*, **3**, 217-219.
- Lightner, D. V., R. P. Hedrick, J. L. Fryer, S. N. Chen, I. C. Liao and G. H. Kou (1987): A survey of cultured penaeid shrimp in Taiwan for viral and other important diseases. *Fish Pathol.*, **22**, 127-140.
- Lightner, D. V., B. T. Poulos, L. Bruce, R. M. Redman, J. Mari and J. R. Bonami (1992): New developments in

- penaeid virology: Application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas. In "Proceedings of the Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States" (ed. by W. Fulks and K. L. Main). The Oceanic Institute, 234-253.
- Lightner, D. V., R. M. Redman and T. A. Bell (1983a): Observations on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeus monodon* Fabricus. *Aquaculture*, **32**, 209-233.
- Lightner, D. V., R. M. Redman and T. A. Bell (1983b): Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invert. Pathol.*, **42**, 62-70.
- Iomoyama, K. (1992): Viral diseases of cultured penaeid shrimp in Japan. In "Proceedings of the Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States" (ed. by W. Fulks and K. L. Main). The Oceanic Institute, 185-192.
- Nadala, E. C. B. Jr., Y. Lu, P. C. Loh and J. A. Brock (1992): Infection of *Penaeus stylirostris* (Boone) with a rhabdovirus isolated from *Penaeus* spp. *Fish Pathol.*, **27**, 143-147.
- 中野平二・河邊 博・梅沢 敏・桃山和夫・平岡三登里・井上 潔・大迫典久 (1994): 1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死: 発生状況および感染実験, *魚病研究*, **29**, 135-139.
- Oka, M. (1969): Studies on *Penaeus orientalis* Kishinoue—VIII. Structure of the newly found lymphoid organ. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **35**, 245-250.
- Sano, T., T. Nishimura, K. Oguma, K. Momoyama and N. Takeno (1981): Baculovirus infection of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan. *Fish Pathol.*, **15**, 185-191.

第3章 病原体の電顕観察と簡易診断法

感染症の場合、病原体の特定が先ず要求される。第1章、第2章で大量死の発生状況と、死亡エビの病理組織学的検討がなされ、その結果から、本量死はウイルス感染が原因である可能性が高いと考えられた。このため電子顕微鏡観察で本大量死原因の究明を行った。また、簡易で迅速な診断法の開発は、養殖池での早期診断を可能にするとともに、後述のウイルス消毒試験等におけるウイルス感染性確認試験の簡便・迅速化が可能となる。また、それら消毒法等に関する知見がなければ、本病の防除対策は策定し得ない。そこで、迅速性と簡便性を優先させたウイルス感染確認法（暗視野顕微鏡観察法）と、特殊な設備は必要であるが、より特異的診断を可能とするためのネガティブ染色法による病原体粒子確認法について検討した。

第1節 電子顕微鏡によるウイルスの検出

感染実験の結果、ひん死個体のリンパ様器官磨砕液の0.45 μ mフィルター濾液により感染が成立し、さらに病理組織的観察の結果から、本疾病はろ過性病原体が原因と推定されたので、電子顕微鏡によるウイルスの検出を試みた。

材料及び方法

1 供試クルマエビ

熊本県下の養殖池で採取した、自然発症クルマエビ8個体（平均体重5.5g）と、第1章の方法で作成した実験感染クルマエビ11個体（平均体重9.2g）及び、対照として熊本県水産研究センターで飼育した健康エビ3個体（平均体重7.7g）を用いた。

2 電子顕微鏡観察

2%グルタルアルデヒド液（0.2Mリン酸緩衝液希釈）で、約3ヶ月間冷蔵保存した自然発症5個体から、リンパ様器官を切り出し、1%オスミウム酸で後固定し、0.1Mカコジル酸緩衝液で洗浄、エタノール系列脱水の後、Spurr樹脂に包埋した。また、10%リン酸緩衝中性ホルマリン液で固定した3個体から、リンパ様器官を切り出し、蒸留水で一晩洗浄後に1%オスミウム酸で後固定し、同様に洗浄脱水処理を行い、Spurr樹脂に包埋した。

実験感染個体はリンパ様器官と胃の2種の臓器をKarnovsky液と、1%オスミウム酸（カコジル酸緩衝液使用）で二重固定を行い、常法により0.1Mカコジル酸緩衝液で洗浄後、エタノール系列で脱水、Spurr樹脂に包

埋した。樹脂包埋材料はウルトラミクロトーム（RCM・MT6000）を用いて、超薄切片及び準超薄切片（以降、樹脂切片と表記）を作成した。超薄切片は酢酸ウラニル溶液とクエン酸鉛溶液による二重染色の後、電顕（JEL JEM100CX）観察に供し、樹脂切片は1%トルイジンブルー溶液で染色し、光顕観察に供した。

結果

自然発症個体の観察の結果、グルタルアルデヒド液で固定したリンパ様器官では、鞘構造の崩壊が顕著で、リンパ様器官細胞の壊死像がみられた（図3-1）。また、細胞崩壊部に桿状のウイルス粒子が観察された（図3-2）。これらのビリオンは直径約84nmのヌクレオカプシッドとそれをとりまくエンベロープから構成されていた。しかし、ホルマリン固定材料の電子顕微鏡観察では、形態やサイズが、電顕像に一致するヌクレオカプシッドが観察されたものの、エンベロープの観察が困難な場合もあった。

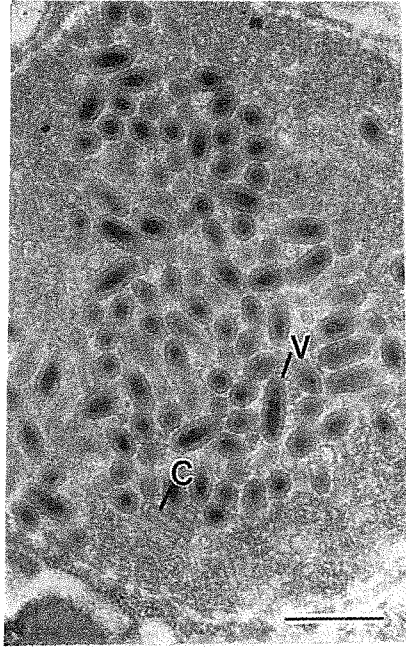
実験感染個体の胃の樹脂切片では、上皮細胞層に核がやや腫大し、染色質が核の縁辺部に遍在するとともに、中央部の染色性が低下した細胞や、極端に腫大した核内にトルイジンブルーに濃染する顆粒状物質を含む細胞が観察された。また、粗結合組織にも核の腫大と染色質の遍在、核中央部の染色性低下を呈する細胞が観察された（図3-3）。これらの細胞を電顕観察すると、上皮細胞層の腫大した核内の、トルイジンブルーで顆粒状に濃染する部位にウイルスが密集し、部分的には結晶状の配列がみられた（図3-4）。粗結合組織の細胞では、核内に多数の空胞と電子密度の高い物質が観察された。

また、実験感染個体のリンパ様器官の電顕観察でも、細胞変性像は胃の場合とほぼ一致し、核の腫大、染色質

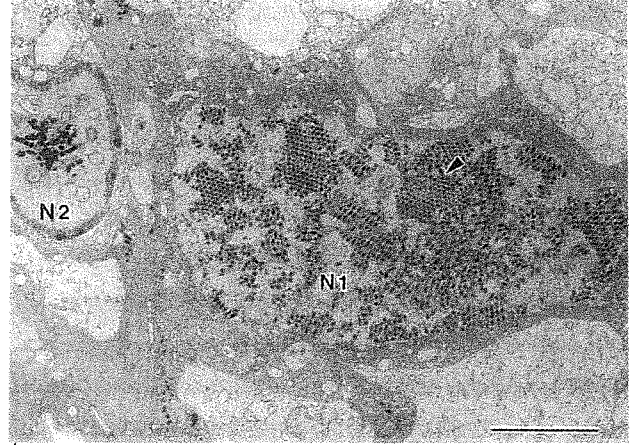


◀はウイルス粒子を示す。スケールは1 μ m

図3-1 電顕観察像：リンパ様器官



Cはカプシッド、Vはビリオン スケールは400nm
 図3-2 電顕観察像：リンパ様器官



◀は結晶状のウイルス粒子を示す。N1は図3-3の◀2、
 N2は図3-3◀3を示す。スケールは3μm

図3-4 胃の上皮の電顕観察像

方、対照群のエビにはウイルスは確認されなかった。以上より、病理組織学的に本症の主症状と考えられる胃の上皮細胞やリンパ様器官の細胞変性、すなわち核の腫大、染色質の核縁辺部への遍在と内部の無構造化がウイルスの増殖と密接に関係することは明らかである。

また、本疾病で死亡したクルマエビから細菌や真菌、寄生虫など特定の病原体が検出されないこと（第1章）、病エビの胃の上皮細胞やリンパ様器官に顕著な細胞変性が見られ、自然発症エビと実験感染エビの病理組織変化が一致すること、実験感染エビの変性核内に形態学的に自然発症エビのものと同じウイルスが観察されること、さらに対照群のクルマエビでは上記の細胞変性やウイルス粒子が観察されないことから、一連のクルマエビの大量死は当該ウイルスの感染によって起こったと考えられる。

第2節 原因ウイルスの形態学的検討

第1節の電子顕微鏡観察で観察された、本疾病の原因と考えられるウイルスについて形態学的検討を行った。

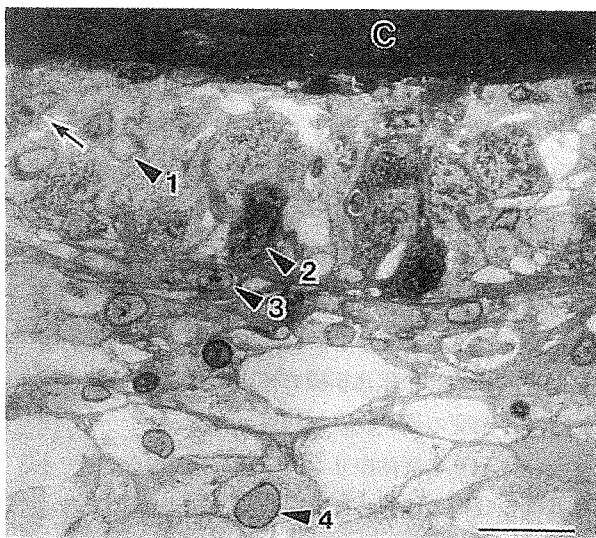
材料及び方法

1 供試クルマエビ

ウイルスに未感染の稚エビ（平均体重9.2g）に、第1章で述べた方法で自然発症エビの磨砕濾液を筋肉内に接種し、3~4日後に取り上げ供試エビとした。

2 電子顕微鏡観察

人工感染エビから胃とリンパ様器官を取り出し、2%グルタルアルデヒド液（0.2Mリン酸緩衝液希釈）で固定後、1%オスミウム酸で後固定し、0.1Mカコジル酸緩衝



◀はウイルス感染細胞を示す。←は正常細胞を示す。
 スケールは5μm

図3-3 胃の上皮の光顕観察像

の核周辺への遍在が起り、細胞核内には自然発症個体に見られたと同様のウイルス粒子が観察された。一方、胃の上皮細胞と異なり、変性したリンパ様器官の細胞では、核膜槽が拡大し、核内のウイルス粒子の量は少ない傾向にあった。

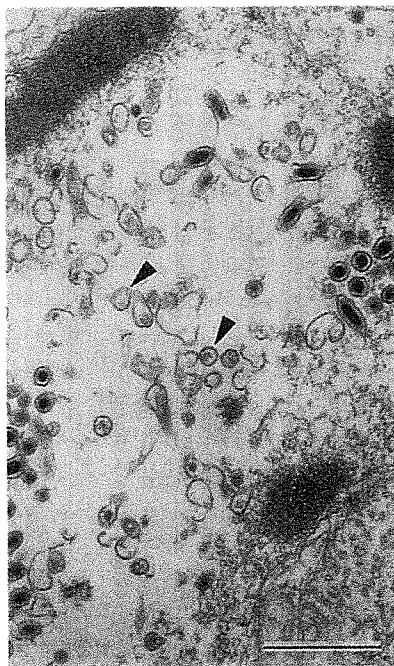
考察

自然発症、実験感染いずれの個体においても、胃の上皮細胞やリンパ様器官を構成する細胞で、細胞変性を引き起こしている部位に桿状のウイルスが確認された。一

液で洗浄、エタノール系列脱水の後、Spurr 樹脂に包埋した。樹脂包埋材料はウルトラミクローム (RCM・M T6000) を用いて超薄切片を作成し、酢酸ウラニル溶液とクエン酸鉛溶液による二重染色の後、80KVで電顕 (J EOL JEM100CX) 観察を行った。

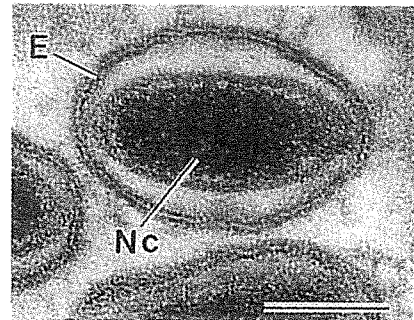
結 果

胃の上皮細胞の変性した細胞核は、中央が電子密度の低い繊維様基質からなり、その中にエンベロープに被覆されたビリオンが散在し、“capsid originator” (Johnson, 1988) やカプシッド (直径 $61 \pm 5 \text{nm}$: 30 粒子の平均)、de novo に形成されるエンベロープを被覆しつつあるヌクレオカプシッド等、ビリオンの成熟過程を観察することができた。また、一部の核にはウイルス粒子の他、エンベロープに類似構造の膜によって形成される小胞も見られた (図3-5)。このようなビリオンの増殖は、胃とリンパ様器官とも核のみで見られ、細胞質では観察されなかった。また、核及び細胞質いずれにも、ある種のバキュロウイルス感染症に見られる包埋体や、その他の封入体に類する形態は認められなかった。成熟したウイルス粒子のビリオンは直径が約 130nm (30 粒子の平均) で、やや楕円形を呈する桿状のヌクレオカプシッドと3層構造のエンベロープからなり、エンベロープはヌクレオカプシッドを緩やかに被覆し、ヌクレオカプシッドとエンベロープの間には間隔が見られた。また、ビリオンの縦断



◀は小胞を示す。スケールは80nm
図3-5 PRDVの小胞とビリオン

面は楕円形を呈し、エンベロープにはしばしば、部分的な褶曲が見られた。(図3-6)ヌクレオカプシッドは直径が約 $84 \pm 6 \text{nm}$ (30 粒子の平均) で、長さは $226 \pm 29 \text{nm}$ (30 粒子の平均) であった。



Nc:ヌクレオカプシッド, E:エンベロープ, スケールは100nm
図3-6 成熟したPRDV粒子

考 察

本ウイルスは核内で増殖することから、DNAウイルスと推測される。またウイルスのヌクレオカプシッドが楕円形であることや、ウイルスの大きさから、本ウイルスがDNAウイルスのバキュロウイルスあるいはそれに近縁のウイルスであることが推測される。

クルマエビ類に病原性を持つウイルスと当該ウイルスを比較すると、バキュロウイルスに属するBPおよびMBV、PBVは感染細胞中に核多角体と呼ばれる特異な包埋体を形成する点が異なり、またヌクレオカプシッドの形態が真の円柱状で楕円形でなく、直径が当該ウイルスより小さい。またBMNVとYBVは包埋体を形成しない点で本ウイルスと一致するが、ヌクレオカプシッドの形態が真の円柱状である点と、ヌクレオカプシッドのサイズが異なる。さらに、YBVは核および細胞質で増殖する点も当該ウイルスと異なっている。また、これらのウイルスではウイルスの増殖過程で感染核内に小胞が形成されない。したがって、上記の5種のウイルスと本ウイルスは別種と考えられる (Table 3-1)。

ワタリガニの一種 *Carcinus maenas* の血液から発見された桿状のウイルス (Johnson, 1988) および、オーストラリアのクルマエビ養殖池で *Penaeus esculentus* と *P. monodon* の交配種に発生した疾病の原因ウイルス (PHRV) (Owens, 1993) と本ウイルスは、ビリオンの形態や成熟過程の特徴が共通するが、これらのウイルスは、ビリオンのサイズなどで本ウイルスと異なる。

最近、タイにおいて、*P. monodon* の Systemic ecto-

Table 3-1. PRDV, penaeid baculovirus and some other rod-shaped viruses of crustaceans

Viral species	Host	Tissue infected	Occlusion bodies	Average diameter capsid/nucleocapsid*	Loose envelope	Vesicle in nucleus	Nucleocapsid a true cylinder	Source
PRDV	<i>Penaeus japonicus</i>	Cuticular epidermis, connective tissue, lymphoid organ	no	61/84	yes	yes	no	This paper
BP	<i>Penaeus spp.</i>	Hepatopancreas, anterior mid-gut	yes	50/50	yes	no	yes	Couch (1974) Liglitner <i>et al.</i> (1983)
MBV	<i>Penaeus spp.</i>	Hepatopancreas, anterior mid-gut	yes	42/42	no	no	yes	ffghrneret <i>al.</i> (1983)
PBV	<i>Penaeus plebejus</i>	Hepatopancreas, mid-gut	yes	?/40	no	no	yes	Lester <i>et al.</i> (1987)
BWV	<i>Penaeus japonicus</i>	Hepatopancreas	no	?/36	no	no	yes	Sano <i>et al.</i> (1981)
YBV	<i>Penaeus monodon</i>	Lymphoid organ, hepatopancreas	no	?/45	no	no	yes	Boonyaratpalin <i>et al.</i> (1993) Chantanachooklin <i>et al.</i> (1993)
PHRV	Hybrid (<i>Penaeus esculentus</i> × <i>Penaeus monodon</i>)	Hemocytes, hypodermis, hematopoietic tissue	no	50/85	yes	yes	no	Owens (1993)
RV-CM	<i>Carcinus maenas</i> (American)	Hemocytes, hemopoietic tissue	no	67/100	yes	yes	no	Johnson (1988)
Baculo-B	<i>Callinectes sapidus</i>	Hemocytes, hemopoietic tissue	no	57/80	yes	yes	no	Johnson (1988)
Baculo virus un-named	<i>Carcinus maenas</i> (European)	Hemocytes, connective tissue	no	50/77	yes	yes	no	Bazin <i>et al.</i> (1974)

* Measurements in nm and based on thin sections.

dermal and mesodermal baculovirus (SEMBV, Wongteerasupaya *et al.*, 1995)、台湾において *P. japonicus*, *P. monodon*, *P. penicillatus* 等の Baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV, Chou *et al.*, 1995)、さらに中国において *P. chinensis* に感染する subgroup C baculovirus (Baozhen *et al.*, 1995) が相次いで報告されている。これらのウイルスは、ビリオンの付属器の有無など形態的に若干の違いが認められるものの、それ以外のビリオンの形態、これらのウイルスに起因する疾病の症状及び我が国における PAV 発生時の疫学的知見から、PRDV とこれらのウイルスの類似性は高いと考えられ、今後、これらのウイルスに関する分類学的検討が急がれる。

なお、病エビ血液よりショ糖密度勾配遠心により精製されたウイルスから抽出した核酸の解析結果から、本ウイルスは遺伝子として DNA を有し、本ウイルスは ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) のウイルス分類に関する第 6 回報告 (Murphy *et al.*, 1995) に示される無脊椎動物の未分類 DNA ウイルス群に属すると報告された (Inouye *et al.*, 1996)。このウイルス群には従来 Non-occluded baculovirus あるいは Nudibaculovirus の属名が与えられ、バキューロウイルス科に属するとされてきた一群のウイルスが含まれ、その代表種として *Oryctes rhinoceros virus* が挙げられている。

第 3 節 暗視野顕微鏡観察によるウイルス粒子の検出

PAV の診断は、病エビの組織標本を作成後、光学顕微鏡を用いて、腫大した核や均質化した核を確認した後、透過型電子顕微鏡により、病変部にウイルス粒子を確認し、確定診断を行っている。

PAV の防疫のためには、養殖現場において、迅速に診断を行う必要があるが、前述した方法では病エビの組織固定が必要なこと、透過型電子顕微鏡が必要とされることから、迅速診断には適していない。このため、組織標本の作製が不要で、光学顕微鏡のみで迅速に診断が可能な診断法について検討した。

材料及び方法

1 供試クルマエビ

山口県内の PAV が発生した養殖池から入手した自然感染エビ 11 尾 (平均体重 20.0g) と、第 1 章で述べたウ

イルス感染液を筋肉内に接種して人工的に感染させたエビ 9 尾 (平均体重 1.9g) を供試した。

2 暗視野顕微鏡観察 (以下暗視野観察と記載)

1) 血液の暗視野観察

心臓からシリンジで採取した血液一滴を、清浄なスライドグラスに滴下し、カバーグラスをのせ、湿式暗視野コンデンサーを用い暗視野観察を行った。

2) 胃の暗視野観察

罹病エビから胃を切り出し、10%中性ホルマリンで固定した後、先細のピンセットでクチクラ上皮を胃から取り除き、スライドグラス上に滴下した 10%ホルマリン液上に胃の上皮を広げた。余分な固定液はカバーガラスの縁から濾紙で吸収した。暗視野観察は胃の色素細胞が少ない部分の上皮で行った。

また、暗視野観察と組織観察でのウイルス感染の検出率の比較を行うため、胃の標本を 2 つにわけ、一つは暗視野観察に供し、残りは組織切片を作成し、暗視野観察と組織観察でのウイルスが感染した細胞の検出率を比較した。

3) 供試サンプル保存状態別の暗視野観察

エビの保存状態が暗視野観察に与える影響を検討するため、5℃と -20℃で保存した供試エビの胃の上皮細胞を用いて、ウイルスが感染した細胞の検出の有無を比較した。

結 果

1 血液の暗視野観察

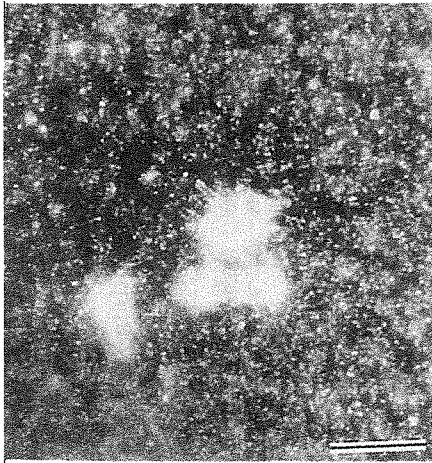
感染エビの血液中に、大きさがほぼ一定の多数の微細粒子 (約 0.5 μm) が認められた (図 3-7)。第 4 節で後述するように、この微粒子は、電子顕微鏡観察でウイルス粒子であることが確認された。また、血球の減少と血液の凝集能の低下が病エビの血液で顕著であった。

健康なエビの血液中でも、少数の微粒子が観察された (約 0.5~2.0 μm)。しかし、これらの粒子は、大きさが不均一で、上記粒子とはみなされなかった。

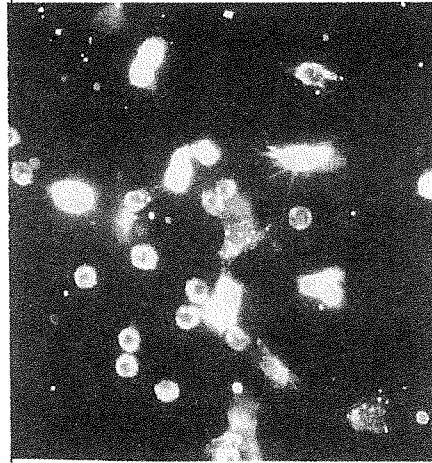
2 胃の暗視野観察

胃の上皮細胞上で、直径 10~15 ミクロンの白色の輪郭の明瞭な、楕円形の塊が認められた (図 3-8)。この塊は、健康なクルマエビでは認められなかった。

暗視野観察と組織標本の観察による感染核 (以後、暗視野観察の感染核は前述した胃の上皮細胞の白色の塊を指し、組織標本の観察での感染核は第 2 章で述べた、核の肥大、核小体の偏在・扁平化、核質の核膜周辺部への移行及び核内無構造化した核を指す。) 検出率の比較では



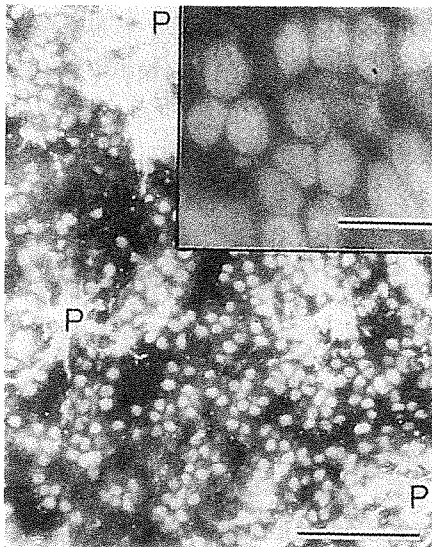
感染エビ血液



正常エビ血液

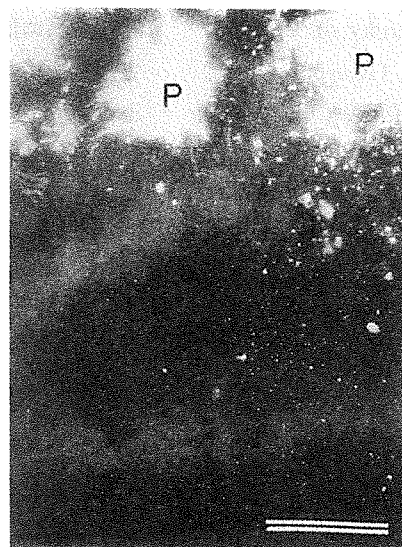
スケールは20 μ m

図3-7 PRDV感染エビ血液の暗視野観察像



感染エビ

スケールは100 μ m、拡大図中のスケールは20 μ m。Pはエビの色素を示す。



正常エビ

図3-8 PRDV感染エビの胃の上皮細胞の暗視野観察像

考 察

血液と胃の上皮細胞の暗視野観察で、ひん死エビから採取した血液では多数のウイルス粒子を検出することが可能であり、また胃の上皮細胞の暗視野観察で、ウイルスに感染した核を白い塊として確認することが可能であった。感染した核が白い塊に見えるのは、核内の数多くのウイルス粒子の存在により光が回折や乱反射するためと考えられる。

暗視野診断の特徴として、診断に要する時間が短く、必要な機器も光学顕微鏡のみであり、簡単で費用がかからない点があげられる。実際の診断に際しては、血液での暗視野診断は、習熟すれば1サンプルの採取に要する時間は1分以内で可能で、ウイルス粒子が存在する場合、暗視野観察でのウイルス確認も数分で行うことが出来るため、大量の個体の検査に有効である。また胃の上皮細胞を用いた暗視野診断法では死後変化により血液を採取出来ない状態の検査サンプルにおい

類似した結果が得られた (Table 3-2)。軽度の感染エビにおいては感染核が組織標本で検出されたが、暗視野観察では検出されない例があった。さらに、胃の観察において、組織観察で重度の感染個体と判断された個体で、暗視野観察では、検出されない例もあった。

3) 供試サンプル保存状態別の暗視野観察

暗視野観察でのウイルスに感染した核の観察は、5 $^{\circ}$ Cで6時間保存後でも可能であった。しかし、5 $^{\circ}$ Cで24時間後の保存及び-20 $^{\circ}$ Cで凍結保存したサンプルでは検出できなかった。

ても、検査が可能であるため、死亡したサンプルの検査に有効である。また5 $^{\circ}$ Cの冷蔵保存で5~6時間近く経過した検体での確認も可能であることから、養殖池が水産試験場等から遠距離の場所にある場合でも、血液が胃をクールボックスに入れ6時間以内で運搬するか、10%中性ホルマリンで固定後実験室に持ち込めばPAVの診断が可能である。

感染症の診断は、宿主種、サイズ、飼育水温、病徴等が当該疾病で知られている範囲にあることの確認と、いずれかの方法で病原体を検出することで行われている。病原体の検出には種々の技法が使われるが、本研究で示

Table3-2. Detection of virus particles and virus infected hypertrophic nuclei in spontaneously and experimentally infected shrimp by dark-field microscopy and histological observation.

		Spontaneously infected shrimp				Experimentally infected shrimp					
Farm	Sample	histological observation		Dark-field microscopy		Virus	Sample	histological observation		Dark-field microscopy	
		Infected nuclei*2	Virus particles*1	Infected nuclei*2	Infected nuclei*2			Infected nuclei	Virus particles	Infected nuclei	Infected nuclei
A	1	+	+	+	+	Non-inoculated	1	-	-	-	-
	2	+	+	++	++		2	-	-	-	-
	3	++	+	-	-		3	-	-	-	-
	4	++	+	++	++						
	5	++	+	++	++	Inoculated	1	+	-	-	-
B	1	++	+	++	++		2	+	-	-	-
	2	++	+	++	++		3	++	-	-	-
	3	++	+	++	++		4	++	+	-	-
	4	++	+	++	++		5	++	++	+	+
C	1	+	-	-	-		6	++	+	+	++
	2	++	++	++	++						

- : Not detected, + : Few detected, ++ : Many detected.

*1 In the hemolymph, *2 In the stomach cuticular epidermis.

した暗視野観察法では一定サイズの微粒子が多数観察されることをもってウイルス陽性としている。つまり、大きさが同様で光屈折率や光反射率が同様の粒子であれば全て陽性と判断される。しかしながら、検査個体外骨格に白斑の形成があり、急性なへい死があること、さらに飼育水温などの条件が PAV 発生条件に近いことなど、PAV である可能性が高いときに暗視野観察で陽性の結果が得られた場合、養殖現場等においては PAV であるとの認識を持って当該疾病に対して対処すべきであろう。また、感染実験においては、へい死、瀕死あるいは一見正常な個体におけるウイルス感染の確認のために応用する場合には、十分利用価値がある。特に血液からの検出ではウイルス血症を起こしていることが一目瞭然に判断でき、また胃上皮の感染核が確認できればウイルス増殖を *in situ* で確認できたことになる。(さらに、血中のウイルス粒子数あるいは感染細胞核の数の多少により、発症が本ウイルスの感染に起因しているか否かの指標となりうる可能性がある。)

一方、暗視野診断の欠点としては、軽い感染状態のエビを診断する事が出来ず、時には、重度の感染エビの感染核の検出にも失敗することがある。これは、胃の上皮細胞上に広く分布するエビの色素が、観察を困難にするためと考えられる。しかし、検出に失敗する割合は多くても 25%程度と見積もられることから 1 回の診断に際してはへい死、瀕死個体を 10 尾程度観察することで、大量へい死の流行期には検査群の感染の有無についての確実な診断を行うことが可能と考えられる。

暗視野診断法は、クルマエビの中腸腺壊死症 (BMN) の通常の検査としてすでに行われている。PRDV と BMNV (クルマエビの中腸腺壊死症原因ウイルス) の細胞変性は基本的には同じで、ウイルスの増殖は核内で行われ、封入体を作らず、核の腫大と均一化を起こす。BMNV は種苗生産期 (ラーバ期とポストラーバ期) に大きい被害を引き起こすウイルスであるが、BMNV と PRDV は、ウイルスの標的器官が異なることで判別可能である。BMNV は PRDV とは異なり、中腸腺と腸が標的器官であり、感染核が胃で観察されるか、中腸腺で観察されるかで、この 2 つの病気をはっきりと見分けることが出来る。

第 4 節 ネガティブ染色標本の電子顕微鏡観察によるウイルス形態の確認

第 3 節で述べた暗視野観察による PAV 診断法は、PRDV によって起こる胃の上皮細胞の核の腫大や核の無構造化等の病変が、暗視野観察で特徴的な白い塊として観察できることを利用したもので、迅速な診断が可能である。

しかし、前述のとおり、暗視野観察法では他のウイルスなど同様な大きさ・性質を持つ粒子の存在により診断結果を誤る可能性が残された。また、抗血清など、本ウイルスに特異的な検出プローブも現段階では開発されていない。本症の病原体であるウイルスは、桿状の特徴的な形態を有し、現在のところこのような形態のウイルスによる感染症は、本病を含めたアジアにおける一連の疾病 (第 1 章) 以外にはクルマエビ属において知られていない。従って、病徴その他、PAV であることと矛盾がない限り、ウイルスの特徴的な形態が確認できたならば、PAV と確定診断しても大きな矛盾はないと思われる。そこで、本節では組織の固定と超薄切片作成の手順を省略できるネガティブ染色法による電顕観察について、PAV 迅速確定診断技法としての適合性を検討した。

材料及び方法

1 供試クルマエビ

第 1 章で述べたウイルス感染液を筋肉内に接種して人工的に感染させたエビ 2 群 (平均体重 1.9g 及び 5.0g) を各 10 尾供試した。

2 ネガティブ染色

1) 血液

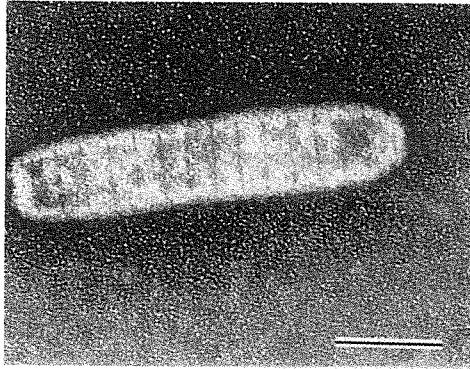
供試エビの心臓からシリンジで採血し、容積 1.5ml のマイクロチューブ内で、採取した血液と等量の 20%ホルマリンを混合し、500×g で 15 分間遠心処理した。その後、遠心上清を 18,500×g で 15 分遠心後、沈殿物を 0.2 ml の蒸留水でけん濁し、被検液を作成し、被検液 1 滴をパラフィルムに滴下後フォルムバール膜でコートしたグリッドをのせ、2%酢酸ウラニルで 1、2 分染色後、余分の染色液を濾紙で取り除き、風乾して、観察材料とした。

2) 胃

供試エビ 10 尾から胃を採取して 1 サンプルとし、10%ホルマリンで固定し観察材料とした。固定した胃は容積が 1.5 ml マイクロチューブ内で 1ml の蒸留水とともに、はさみで細断した後、血液と同様の処理を行い、電顕観察に供した。

結果

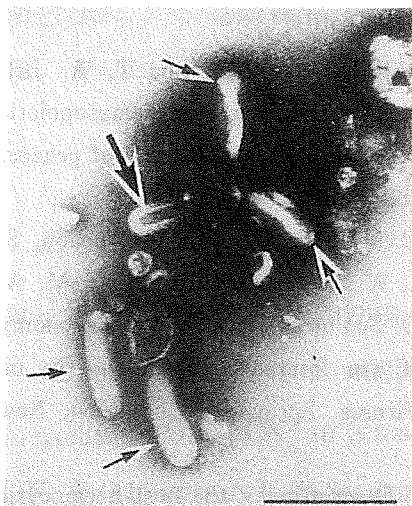
血液を処理しネガティブ染色を行ったサンプルの観察では、PRDVの粒子や、カプシッド数個からなる塊が観察された。また胃を処理しネガティブ染色を行ったサンプルの観察では、ウイルス粒子やカプシッドの多くは、胃の組織繊維にからまった状態で観察された(図3-9)。



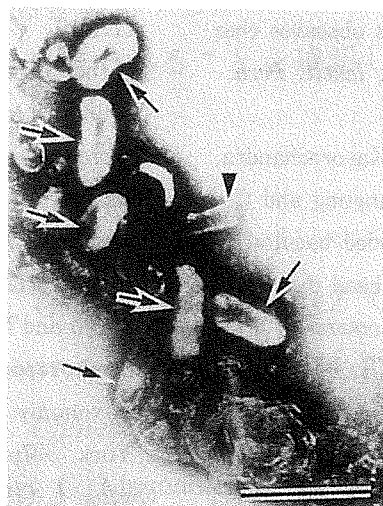
スケールは100nm

図3-9 ネガティブ染色による観察結果

ネガティブ染色法で観察したビリオンは桿菌様あるいは長楕円体の形態を有し、内部に棒状のヌクレオキャプシッドを有していた。ビリオンの大きさは直径は 130 ± 9 nm (30粒子の平均)で、ヌクレオキャプシッドは $226 \pm 29 \times 84 \pm 6$ nm (30粒子の平均)であった。この値は超薄切片で測定した値よりやや大きかった。また裸出したヌクレオキャプシッドは表面には規則正しい格子状の構造が観察され(図3-10)、厚さ約16nmでディスク状に断列する傾向があることなど、極めて特徴的な形態が示された。血液を処理したサンプルと胃を処理したサンプルに由来



血液



胃

← ビリオン、カプシッドを示す。スケールは100nm

図3-10 ネガティブ染色による観察結果

するウイルスの間には形態的な差異は認められなかった。

考察

現在のところ、PRDVと同様な形態を有し、かつ同様な病徴を示すウイルスあるいはウイルス病はクルマエビ属には知られていない。しかしながら、もし、クルマエビに同様な大きさを有するウイルスあるいはその感染が一般的な現象として存在するならば、ウイルス粒子の大きさなどの性状のみから陽性・非陽性を判断さざるを得ない暗視野観察法は、診断技法としての価値は低い。またクルマエビの病原体としてそのような性状を有するウイルスが他に存在しなくても、確定的な診断が求められたとき、すなわち、外骨格内側の白斑形成が不鮮明な場合や、経験的に想像できない飼育水温における発症などに遭遇した場合、より特異的なウイルス同定法が求められる。そこで、本節では本ウイルスの当該疾病発生に対する関与の有無について検討する技法として、ネガティブ染色法により特徴的な形態を有する本ウイルス粒子を検出し、検査対象個体の血中と胃組織における本ウイルスの存在を明らかにしようと試みた。その結果、病エビの血中と胃組織からは多数のウイルス粒子が確認された。ウイルス粒子は、エンベロープを有する桿菌様の形態で、裸出したヌクレオキャプシッドはディスク状に断列する傾向があることなど、極めて特徴的であることが示された。本ウイルスの培養に成功していないことに起因する特異的プローブ開発の遅れによって、確定診断技法が未発達の状態にある現状では、ウイルス粒子の特徴的な形態を診断するネガティブ染色法は最も実効性のある診断法と考えられた。また、本法は同然の設備として透過型電子顕微鏡を必要とするものの、標本採取から判定までに30~60分間を要するだけであり、また、操作の簡便性から、多数の個体を検査するのにも都合がよい。

要約

PAVの原因究明のため、電子顕微鏡によるウイルスの検出を試みた。その結果、自然発病と実験感染エビ双方において胃の上皮細胞やリンパ様器官を構成する細胞でウイルス粒子が確認され、対照群のエビにはそのようなウイルス粒子は確認されなかった。この結果から確認されたウイルスが本疾病の病原体であると考

えられた。さらに、電子顕微鏡で確認されたウイルスの形態学的検討を行った結果、本ウイルス (PRDV) は既知のエビ類に感染する5種のバキュロウイルスとは別種と考えられ、甲殻類の血球に感染するウイルスとは、ビリオンの形態や成熟過程の特徴が共通したが、ビリオンのサイズが異なった。一方、最近になって、タイ、台湾、中国から報告された *P. monodon*、*P. penicillatus*、*P. chinensis* のウイルス (SEMBV, WSBV, PCBV, subgroup C of baculovirus) はビリオンの形態や示される病徴等、PRDV との類似性が高く、分類学的比較検討を急ぐ必要がある。

また、光学顕微鏡を用いた PAV の迅速診断法について検討した結果、血液中のウイルス粒子と胃の上皮細胞のウイルスに感染した核を暗視野コンデンサーを用いて観察する暗視野観察診断法を開発した。つぎに、暗視野観察法では他のウイルスなど同様な大きさ・性質を持つ粒子の存在により診断結果を誤る可能性が残されたため、本ウイルスが桿状の特異的な形態を有することに着目し、ネガティブ染色法による電顕観察でウイルスの形態を確認する診断法の妥当性について検討し、PAV 迅速確定診断技法として利用可能であることを確認した。

引用文献

- Baozhen, P., R. Jiaming, S. Juying, Z. Guoying, G. Huiting, S. Yalin, Z. Guoxing and G. Zuxum (1995): The studies on baculovirus-caused disease of prawns (*Penaeus chinensis* OSBECK) in Shanghai suburb. *Chinese Journal of Virology*, **11**, 151-157.
- Bazin, F., P. Monsarrat, J. R. Bonami, G. Croizier, G. Meynadier, J. M. Quiot and C. Vago (1974): Particules virales de type baculovirus observees chez le crabe *Carcinus maenas*. *Rev. Trav. Instit. Pech. Marit.*, **38**, 205-208.
- Boonyaratpalin, S., K. Supamattya, J. Kasornchandra, S. Direkbusaracom, U. Aekpanithanpong and C. Chantanachooklin (1993): Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow head disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.*, **28**, 103-109.
- Chantanachookin, C., S. Boonyaratpalin, J. Kasornchandra, S. Direkbusarakom, U. Ekpanithanpong, K. Supamataya, S. Sriurairatana and T. W. Flegel (1993): Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. *Dis. Aquat. Org.*, **17**, 145-157.
- Chou, HY., CY. Huang, CH. Wang, HC. Chiang and CF. Lo (1995): Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **23**, 165-173.
- Couch, J. A (1974): An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: ultrastructure, prevalence and enhancement. *J. Invert. Pathol.*, **24**, 311-331.
- Francki, R. I. B., C. M. Fauquet, D. L. Knudson and F. Brown (1991): Classification and Nomenclature of Viruses Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Springer-Verlag Wien, New York, 121p.
- Inouye, K., K. Yamano, N. Ikeda, T. Kimura, H. Nakano, K. Momoyama, J. Kobayashi and S. Miyajima (1996): The Penaeid Rod-Shaped DNA Virus (PRDV), which causes Penaeid Acute Viremia (PAV). *Fish Pathol.*, **31**, 39-45.
- Johnson, P. T (1988): Rod-shaped nuclear viruses of crustaceans: hemocyte-infecting species. *Dis. Aquat. Org.*, **5**, 111-122.
- Johnson, P. T., and D. V. Lightner (1988): Rod-shaped nuclear viruses of crustaceans: gut-infecting species. *Dis. Aquat. Org.*, **5**, 123-141.
- Lester, R. J. G., A. Doubrovsky, J. L. Paynter, S. K. Sambhi and J. G. Atherton (1987): Light and electron microscope evidence of baculovirus infection in the prawn *Penaeus plebejus*. *Dis. Aquat. Org.*, **3**, 217-219.
- Lightner, D. V., R. M. Redman and T. A. Bell (1983): Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invert. Pathol.*, **42**, 62-70.
- Murphy, F. A., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo and M. D. Summers (1995): Virus Taxonomy Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Springer-Verlag Wien, New York, 507p.
- Owens, L (1993): Description of the first haemocytic rod-shaped virus from a penaeid prawn. *Dis. Aquat. Org.*, **16**, 217-221.

Sano, T., T. Nishimura, K. Oguma, K. Momoyama and N. Takeno (1981): Baculovirus infection of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan. *Fish Pathol.*, **15**, 185-191.

Wongteerasupaya, C., J. E. Vickers, S. Sriurairatana, G. L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul and T. W. Flegel (1995): A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 69-77.

第4章 感染実験技法の確立

第3章で本大量死の原因がウイルスであることを明らかにした。一般にウイルスの対策を策定するためには、消毒剤に対するウイルスの感受性、海水中でのウイルスの感染能力維持期間、ウイルスの乾燥耐性等のウイルスの性状を明らかにする必要がある。ウイルスの性状は株化細胞を用いて検討されることが多いが、本ウイルスは前述したとおり株化細胞での分離培養が現在まで成功していない。したがってウイルスの性状を明らかにするためには、PRDVの感染が原因で死亡したエビを用いた感染実験を行い、それらの知見を整備する必要がある。このため、クルマエビのサイズ別のPRDVに対する感受性と飼育水温がPRDVによるクルマエビの死亡に与える影響を明らかにし、その結果を基に、操作が簡便で、再現性が高い感染技法について検討した。

第1節 クルマエビのPRDVに対するサイズ別感受性

第1章の結果から、PRDVは0.01g～22.5gの非常に広い体重範囲のクルマエビに感染することが明らかになった。ここでは感染実験を行うために必要な適正供試エビサイズについて検討した。

感染実験では、実験の感度を高めるため、最も感受性の高いサイズのクルマエビを用いる必要がある。そこで、異なるサイズのクルマエビを用いて、感染実験を行いPRDVに対するクルマエビの感受性を各サイズにおけるLD₅₀値により比較し、供試エビの適正サイズについて検討した。

材料及び方法

1 供試クルマエビ

平均体重18.1g、8.5g、0.6gのPAVの発生が報告されていない養殖場産のクルマエビを一試験区あたり9～11尾用いた。

2 供試感染液

感染液は第1章に述べた方法で作成した。すなわち、熊本県で自然発症したクルマエビの頭部を中腸腺を除いてプールし、このプールした頭部に、10倍量のHanks' BSSを加え、ホモジナイズ後、3,000rpmで15分間4℃で遠心し、上清を450nmフィルターでろ過し、-80℃で保存して感染液とした。

3 感染方法

感染液を以下の濃度にHanks' BSSで希釈し試験区を

設定した。供試クルマエビの平均体重が18.1gの試験区（以下18.1g区と記載）では、10⁻⁰、10⁻²、10⁻⁴、10⁻⁶、10⁻⁸の5濃度、平均体重が8.5gの試験区（以下8.5g区と記載）では、10⁻³、10⁻⁵、10⁻⁷、10⁻⁹の4濃度、平均体重が0.6gの試験区（以下0.6g区と記載）では、10⁻¹、10⁻³、10⁻⁵、10⁻⁷、10⁻⁹の5濃度とした。また、感染液の腹部接種に伴うハンドリングストレスの影響を検討するため、それぞれの試験区ごとに、感染液と同量の0.45μmフィルターでろ過したHanks' BSSを筋肉内に接種し、対照区とした。

作成した感染液は、供試エビをオイゲノール100ppmで麻酔した後、供試エビの筋肉内に18.1g区、8.5g区のエビには0.1ml、0.6g区のエビには0.05ml接種した。供試クルマエビは接種後、容積100ℓの水槽に収容し、水温を24～28℃に保ち流水で飼育した。試験期間は7日または8日とし、飼育期間中は給餌を行わなかった。またへい死原因の確認は、第3章で述べた暗視野診断が可能な死亡エビについては、暗視野観察を行った。

4 クルマエビサイズごとの病原性の比較方法

試験期間中の死亡数からReed-Muench法で50%致死ウイルス希釈率を求め、次に供試エビの体重とウイルス液の接種量から、エビの体重あたりに接種した接種源組織重量に換算してLD₅₀値を算出した。計算式を以下に示した。

$$\text{LD}_{50}\text{値} = 50\% \text{致死ウイルス希釈率} \times (\text{接種源組織重量} / \text{供試エビ体重})$$

結果

感染実験結果を図4-1に示した。18.1g区ではウイルスを接種した翌日から死亡が始まり、ウイルス液接種後5日から7日に急激に死亡エビが増加した。

それぞれの試験区の試験終了時の死亡尾数は18.1g区が10⁻⁰ (9/9: 死亡尾数/供試尾数)、10⁻² (7/10)、10⁻⁴ (7/10)、10⁻⁶ (6/10)、10⁻⁸ (2/9)、8.5g区が10⁻³ (10/10)、10⁻⁵ (10/11)、10⁻⁷ (10/11)、10⁻⁹ (1/10)、0.6g区では10⁻¹ (10/10)、10⁻³ (10/10)、10⁻⁵ (10/10)、10⁻⁷ (10/10)、10⁻⁹ (0/10)であり、各区の死亡率は、18.1g区では原液を接種した区が100%で、以下濃度が下がるにつれ死亡率が低下し、10⁻⁸では最低の22.2%であった。このほかの区で最も死亡率が高かったのは、8.5g区が10⁻³ (死亡率が100%)、0.6g区では10⁻¹ (死亡率100%)であり、10⁻⁷以上の濃度の区は全て高い死亡率を示した。また全ての感染実験区では、ウイルス液の濃度が高い実験区ほど試験期間中の死

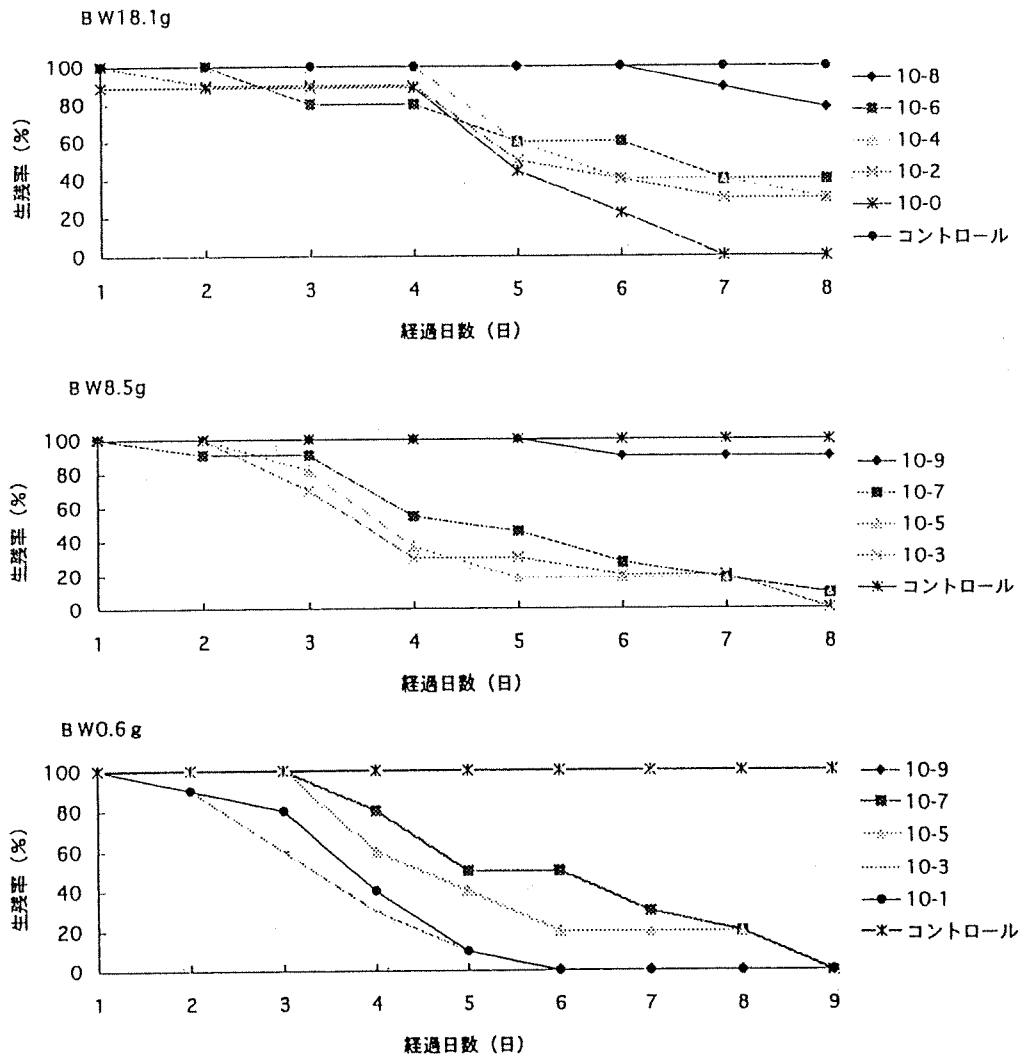


図4-1 感染実験結果

亡率が高い傾向を示した。さらに50%致死稀釈率は18.1gが $10^{-6.6}$ 、8.5gが $10^{-7.9}$ 、0.6gでは $10^{-8.0}$ と魚体重が増加するにつれて低下する傾向があったが、エビの体重あたりに接種した病エビ組織量に換算した LD_{50} 値は、18.1gが $10^{-8.9}$ 、8.5gが $10^{-10.8}$ 、0.6gでは $10^{-10.1}$ と十分に高く、広い範囲のエビが高い感受性を示した(図4-2)。

また、死亡したエビで暗視野診断が可能なサンプルを暗視野診断した結果、全てのサンプルで胃の上皮細胞でウイルス感染核を確認した。一方、各区の対照群の死亡率は0%であった。

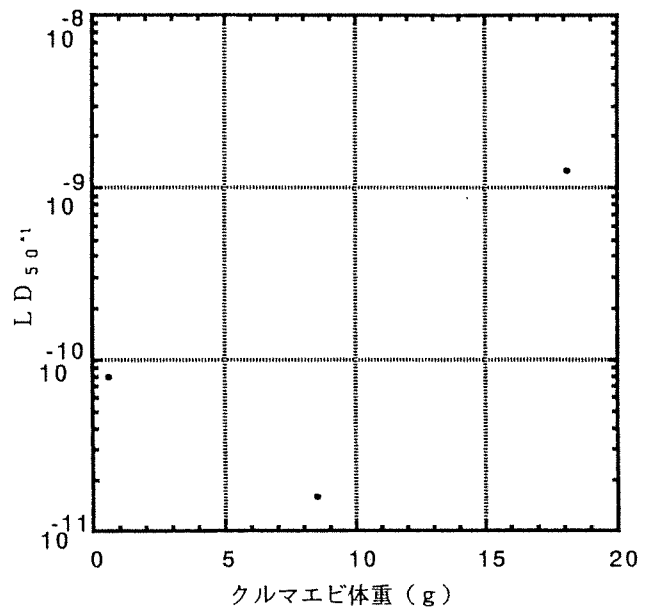


図4-2 体重と LD_{50} 値の関係

* 1 : LD_{50} 値は接種源組織重量 (g) / クルマエビ体重 (g) の換算値

考 察

今回の感染実験の結果、0.6gの小さなエビから18.1gのかなり大きいサイズのクルマエビがPRDVにより死亡し、エビの体重あたりに接種した病エビ組織量に換算したLD₅₀値も、18.1gが10^{-8.9}、8.5gが10^{-10.0}、0.6gでは10^{-10.1}と十分に高かった。このことからPRDVに対するクルマエビの感受性サイズの幅が非常に大きく、ほぼ養殖場内で飼育される全てのサイズに感受性を有すると判断された。したがって、感染実験に用いるクルマエビは、PRDVに対するクルマエビの感受性からは、どのサイズを用いても感染実験の結果には影響を与えないと考えられ、実験区の数や実験区のクルマエビ尾数と飼育施設的能力、感染確認方法等を考慮して検討すればよいと判断された。

第2節 PRDVによるへい死と飼育水温の関係

第1章の結果から、PRDVによる大量死は水温18℃～25℃の範囲で発生していることが明らかになった。効率的で精度が高い感染実験のためには、最も死亡、感染が起こりやすい水温帯でクルマエビを飼育する必要がある。そこで本節では、PRDVに感染させたクルマエビを異なる水温で一定期間飼育後、死亡状況と感染率を比較検討し、感染実験における適正飼育水温について検討した。

材料及び方法

試験1：飼育水温別死亡率の比較

1 供試クルマエビ

熊本県内のPAVの発生が報告されていない養殖場で飼育されていたクルマエビ、(平均体重14.8g)を一試験区あたり11尾用いた。なお、実験に際しては、事前に7日間でクルマエビを所定の水温に馴致し、外見上の異常や、行動異常が認められないものを用いた。

2 供試感染液

感染液は第1章に述べた方法で作成した。すなわち、熊本県で自然発症したクルマエビの頭部を中腸腺を除いてプールし、このプールした頭部に、10倍量のHanks' BSSを加え、ホモジナイズ後、3,000rpmで15分間4℃で遠心し、上清を450nmフィルターでろ過し、-80℃で保存した液を、フィルターろ過海水で200倍に希釈したのち、感染液とした。

3 感染方法

供試エビをオイゲノール100ppmで麻酔した後、供試ウイルス液を供試エビの筋肉内に0.1ml接種した。感染液接種の際のハンドリングストレスの影響を検討するため、感染液と同量の0.45μmフィルターでろ過した新鮮な海水を筋肉内に接種し、対照区とした。

4 クルマエビの飼育

クルマエビは容積100ℓの水槽で飼育した。試験区の飼育水温は、25℃、20℃、15℃(以下それぞれ、25℃区、20℃区、15℃区と記載)にヒーターで維持した。また、対照区は25℃で飼育した。試験区、対照区とも11日間流水で飼育し、期間中の死亡尾数を記録した。

試験2：飼育水温別感染率(ウイルス検出率)の比較

1 供試クルマエビ

熊本県栽培漁業協会で種苗生産されたクルマエビを、熊本県水産研究センターの3㎡水槽で飼育し、同一飼育群(飼育尾数200尾)の30尾を1サンプルとしてPCR法(木村ら、1996)でPAVの感染がないことを確認した後、供試した。

供試尾数は一試験区あたり10尾もしくは11尾(平均体重は1.72g)供試した。

2 供試ウイルス液

供試ウイルス液は第1章で述べた方法で作成し、-80℃で1年間保存したウイルス液を原液とし、フィルターろ過海水で200倍に希釈したのち、供試ウイルス液とした。

3 感染方法

供試エビをオイゲノール100ppmで麻酔した後、ウイルス液を供試エビの筋肉内に0.05mlずつ接種した。

4 クルマエビの飼育

試験区の飼育温度は、25℃、20℃、15℃、10℃とし(以下それぞれ、25℃区、20℃区、15℃区、10℃区と記載)、25℃区は容積100ℓの水槽で流水で飼育し、20℃区は容積100ℓの循環式調温水槽を用いブローア-空気を補給しながら止水で飼育し、15℃、10℃の2区はインキュベータ内に、容積30ℓと10ℓの水槽を設置し、ブローア-で空気を補給して飼育した。なお15℃区、10℃区の2区はあらかじめ所定の温度に調製した海水を1日1回交換した。

なお、試験開始に当たり、供試エビは所定の水温に1週間馴致し、外見上の異常や行動の異常が認められないものを供試した。各試験区はウイルス接種後3日間飼育した。この飼育期間は、平岡ら(未発表)が同様の感染実験を行い、感染後3日目に暗視野診断で感染確認が

可能であることを明らかにしているため、この期間に準じた。期間中は無給餌とし、水温と期間中の死亡尾数を記録した。

5 ウイルス感染確認

実験終了時に生存していたエビを無作為に5尾（5尾未満の場合は生残エビの全数）を取り上げ、第3章で述べた暗視野診断法で、胃の上皮細胞のウイルス感染細胞と、血液中のウイルス粒子を確認した。

結果

試験1：飼育水温別死亡率の比較

感染実験結果を図4-3に示した。水温25℃区ではウイルス接種1日後から死亡が始まり、接種5日後には死亡するエビが急激に増加し、死亡率は64%に達した。本実験区の試験終了時の死亡率は73%であった。20℃区ではウイルス接種4日後から死亡が始まり、接種8日後には死亡率が25℃区と同様に64%に達した。その後、死亡エビが増加し、試験終了時の死亡率は73%であった。一方、15℃区及び対照区では死亡するエビは認められなかった。

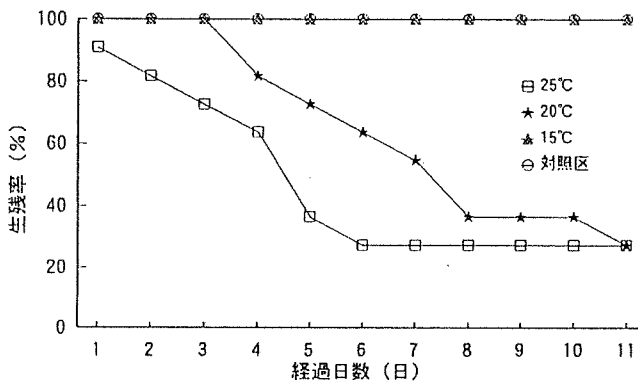


図4-3 温度別感染実験結果

試験2：飼育水温別感染率の比較

試験期間中の死亡数と試験終了時に生残したエビの感染率を表4-1に示した。水温25℃区では死亡率の実験結果と同様に、ウイルス接種1日後から死亡が始まり、取

表4-1 感染率結果

試験区	開始尾数	経過日数			死亡尾数	暗視野観察供試尾数	感染率 (%)
		1	2	3			
25℃	10	2*	1*	4*	7	3	100
20℃	10	0	0	0	0	5	60
15℃	11	0	0	0	0	5	0
10℃	10	0	0	0	0	5	0

* 死亡個体数

り上げ時の死亡率は70%であった。また20℃区、15℃区、10℃区では取り上げ時まで死亡したエビは認められなかった。取り上げ時の感染率は25℃区が100%、20℃区が60%であり、15℃区、10℃区ではいずれも感染率は0%であった。

考察

今回の死亡率の感染実験では、感染後の飼育水温が20℃以上の区が高い死亡率を示し、また感染率の実験でも、飼育水温が20℃以上の区が100%と60%の高い感染率を示した。

以上より、飼育期間が10日以内の場合では、水温が15℃以下ではPRDVの感染によるへい死が認められないため、感染実験におけるクルマエビ飼育水温は20℃～25℃の範囲であれば良く、さらに25℃区では接種後7日以内に供試エビは高い死亡率を示し、3日後には高い感染率を示すことから、25℃での感染試験は短時間で結論を得られ、ウイルスの不活化や安定性試験において、効率的な優れた方法といえよう。

要約

ウイルス対策を行うためには、ウイルスを取り除くための消毒法や、水中のウイルスの感染能力維持期間及び感染宿主範囲についての知見の収集が必要である。株化細胞で培養可能なウイルスであれば、株化細胞を利用してこれらの知見の収集が可能であるが、PRDVは現在培養可能な株化細胞が存在しない。従って、対策に必要な知見は感染実験により明らかにするために必要な、操作が簡便で、再現性が高い感染技法について検討した。

まずPRDVに対する宿主サイズ別感受性について検討した。その結果、第1章で述べた病エビの磨砕滅菌ろ液を筋肉中に接種することで、体重0.62g～18.1gのサイズの供試クルマエビを死亡させることができた。また磨砕滅菌ろ液のこのサイズのエビに対するLD50値は 10^{-89} ～ 10^{-108} であった。

つぎに感染実験で設定すべき水温範囲を検討するために、水温別の感染実験を行い、クルマエビのPRDVによるへい死と飼育水温の関係を死亡率と感染率により検討した。水温を20℃、25℃に設定した試験区では20℃区は11日目までに、25℃区は6日目までに73%の死亡率を示し、感染率の比較では感染3日目には水温を20℃、25℃に設定した試験区ではそれぞれ60%、100%の感染率を示した。これらの結果から、試験結果を死亡率で比

較する場合は水温 25℃で7日間飼育する必要があり、また試験結果を感染率で比較する場合は25℃で3日飼育する必要が認められた。

以上より、操作が簡便で、実験期間が短く、感染の有無の証明が容易かつ明瞭で、再現性が高い実験感染技法は以下の方法であると考えられた。まず、感染実験に用いるクルマエビサイズは次の4点を考慮して決定される。すなわち PRDV の感受性からは体重 22.5g 未満のエビを用いる必要があり、筋肉内に病エビの磨碎滅菌ろ液を接種するための下限サイズからは体重 1g 以上、また飼育水槽の規模の面からは容積が 100ℓ 程度の水槽で 10 尾程度飼育が可能な 20g サイズまでの範囲のエビを用いる必要がある。また感染確認を効率的に行うためには血液を採取し、血液の暗視野観察を行う必要がある。このためには採血が容易な 5g 程度サイズを用いる必要がある。以上より供試エビの体重範囲は 1~20g の範囲で、このほかに感染確認方法や飼育施設の制限により供試エビのサイズは決定される。

次に感染方法は、感染源として第 1 章で述べた方法で病エビの磨碎滅菌ろ液を大量に作成し、-80℃でストックした感染液を用いる。感染方法はクルマエビの腹部筋肉内に、病エビの磨碎滅菌ろ液を 10^{-6} 以上の濃度で接種することで、容易に感染が成立する。

また感染源接種後のクルマエビの飼育は飼育水温を 25℃に設定し、死亡率で比較する場合は7日、感染率で比較する場合は3日間飼育を行う。

感染確認方法は、供試クルマエビにウイルスを接種3日後ないし4日後に、5尾程度、供試クルマエビを取り上げ胃の上皮または血液の暗視野顕微鏡観察を行い、胃上皮細胞中の白色の感染核もしくは、血液中のウイルス粒子を確認し感染の有無を確認する。

引用文献

- 桃山和夫 (1990): クルマエビ稚仔のバキュロウイルス性中腸腺壊死症 (BMN) に関する研究. 山口内海水産試験場報告, 第 20 号.
- 大谷 明, 黒川正身 (1973): ウイルス学に必要な数値の扱い方, 「ウイルス実験学総論, 国立予防衛生研究所学友会編, 丸善株式会社, 東京」, 479-480.

第5章 感染源の推定、原因ウイルスの不活化 及び消毒法の開発

PAVの発病予防のためには、感染源を推定し、それら感染生物の養殖池内への侵入を防ぐことが重要である。養殖場周辺の生物からPRDVが検出された例としてPAV発生池内から採取した、イソガニ*Hemigrapsus sanguineus*、スジエビ類*Palaemon spp.*が報告されている(木村ら, 1996)。しかし、養殖場内で最も多く存在し、PRDVに感染する生物であるクルマエビ種苗の養殖場に導入される前のPRDV保有状況調査はなされていない。本章では養殖場に導入される前の種苗生産場で飼育中のクルマエビ幼生、及びクルマエビ受精卵、採卵用親エビのPRDV保有状況を調査し、クルマエビ種苗が導入された後、養殖場内での感染源となる可能性について検討した。

一方、養殖池内でどのようなメカニズムでPAVによる大量死が発生するかはいまだ不明であり、現実的な感染源の遮断対策としては、養殖池や器具類の消毒を行い、PRDVを一掃することが必要で、具体的な消毒法の開発が急務であった。

このため、PRDVが生体から放出された後の海水中での感染能力維持が可能な期間を推定し、ウイルスの乾燥による不活化経過を調べ、養殖池からのクルマエビの一斉取り上げと、養殖場の乾燥のPRDV不活化効果について検討した。また実際に養殖用機材、作業者の消毒に用いる消毒剤を選定するために、PRDVに対する各種消毒剤の効果について検討し、有効な消毒剤を選定した。さらに、PAVによる大量死の被害を最小限に食い止めるため、PAVが発生した養殖池から速やかに感染耐過エビを取り除くために必要な薬剤について検討し、その薬剤の廃液が他の生物に与える影響や、海洋汚染の有無について検討した。

第1節 感染源の推定

第1章で述べた疫学調査ではPAVの発生は、種苗を導入後に発生する事例、前年度に発生した池の生き残りエビを取り上げた後、塩素剤などによる消毒を行わず養殖を開始し再発した事例、養殖池の密集地区で、一つの池に発生した後、短期間に隣接した池に発生する事例の3タイプに分類される。最初の事例はPRDV保有種苗の存在を示唆し、第2の事例は養殖池中のPRDV保有生物の存在と水中でのウイルスの感染能力が維持される可能性を示している。また最後の事例は海水を介した感染やウイルス保有生物の移動による疾病の伝搬の可能性を示唆している。

PAVの発生を予防するためには、ウイルスの養殖場へ

の侵入防止が不可欠であり、種苗、養殖池中の不顕性感染生物等の感染源の推定を行い、ウイルス保有生物を養殖場内から取り除く必要がある。

養殖場内で飼育するクルマエビ以外の生物は養殖場の消毒、乾燥などの処理により取り除くことが可能であるが、消毒後導入するクルマエビ種苗がPRDVを保有している場合、池の消毒、乾燥などの処理は効果が認められなくなる可能性が高い。そこで本節では、種苗生産機関で成長不良、通常より低い生残率、急激な大量死等の異常が認められたクルマエビ幼生とその種苗生産に用いた採卵用クルマエビについてPRDV保有の有無の確認を行い、それらの事業場の1事業場について詳細な発生状況調査を行った。さらに、特定の種苗生産施設において定期的に採卵用クルマエビ、卵、クルマエビ幼生を連続的に採取しPRDV保有の有無を調査し、養殖場内での感染源となる可能性について検討した。なお本調査の開始にあたって、微量なPRDVの存在を検出可能なPCR法が木村ら(1996)により開発された。本法の検出限界はNested-PCR反応を行った場合、ウイルスゲノムとして10fgと非常に高いため、感染源の推定を行う場合のウイルスの検出には非常に有効と考えられた。そこで、微量のPRDVの検出が必要な場合はPCR法を用いてPRDVの検出を行った。

材料及び方法

1 種苗生産機関でのPAV発生状況調査

1) ウイルス検出方法

ウイルスの検出は、大量死が未発生の場合は、木村ら(1996)のPCR法で通常のPCRとNested-PCRの双方を行った。また、種苗生産場において急激な大量死が発生したサンプルについては、大量死原因の確定が必要であると考えられたため、ネガティブ染色でウイルス粒子の確認もしくは第3章で述べた暗視野診断で胃の上皮細胞の感染核を確認した。

2) 検査サンプル

1995年と1996年に成長不良、通常より低い生残率、急激な大量死等の異常が認められた九州各県に存在する種苗生産場の親エビ(日本近海で天然採保後エビ仲買業者を経由して導入された)、クルマエビ幼生(ノープリウス、ゾエア、ポストラーバの各ステージ)を検査サンプルとした。なお検査サンプルは凍結もしくは生鮮状態で搬入された。

PCRに供試したサンプルはエビ10尾の胃を取り出しひとまとめにして1サンプルとし、ノープリウス、ゾエ

ア、ポストラバはその全体を湿重量で0.1g分をひとまとめにして1サンプルとした。また、ネガティブ染色に供試したポストラバもその全体を湿重量で0.1g分をひとまとめにして1サンプルとした。

さらに、生鮮状態で持ち込まれたサンプル5尾を第3章の方法で暗視野診断を行った。

3) 発生状況調査

PAVが発生した熊本県内の種苗生産場の担当者に、池入れ尾数、水温、異常発生時のクルマエビの状況について聞き取り調査を行い、さらにPRDVの保有が確認された群について、大量死の発生の有無について聞き取り調査を行った。

2 種苗生産過程でのPRDVの検出

1) ウイルスの検査方法

検査対象が小さいサイズのクルマエビ幼生であること及び、多数のサンプルを一括して処理する必要があること、検査サンプル中のウイルスの密度が低いと予想されたことから、前述のPCR法で検査を行った。

2) 検査サンプル

熊本県栽培漁業協会で採卵用に購入した平均体重122.6gのクルマエビ283尾（産卵後生存した群56尾、採卵後死亡群22尾、未産卵群205尾）を採卵が終了した後に胃

を取り出し、9～10尾ずつをひとまとめにして、一つのサンプルとした。また種苗生産に用いた卵（6水槽分）と、その後6水槽で飼育したクルマエビ幼生をノープリウス、ゾエア、ミス、ポストラバの各ステージに達する時期に採取し、その全体を湿重0.1g量を1サンプルとして、PCR検査に供した。

2) PCR反応

供試材料は木村ら（1995）の方法で、前処理後PCR法検査に供した。なお、PCR法は通常のPCRとNested-PCRで行った。

結果

1 種苗生産機関でのPAV発生状況調査

結果を表5-1に示した。1995年～1996年の期間で、種苗生産機関での異常発生例で、PRDVが確認されたのは7例で、発生時期は4月、7月～10月で、感染が確認されたサイズと幼生のステージは親エビ、ノープリウス、ゾエア、ポストラバであった。これらPRDVの確認された事例では7例中6例で大量死が発生していた。

また発生事例中のG種苗生産場について発生状況の聞き取りを行いその結果を表5-2に示した。この養殖場では宮崎県より採卵用エビを4月17日に導入し、受精卵を

表5-1 種苗生産機関でのPAV発生状況

検査月	種苗生産場	検体サイズ	PCR検査結果	ネガティブ染色結果	大量死発生の有無
1995年 7月	A	ポストラバ26日令	未実施	陽性	有り
1995年 8月	B	BL: 3cm	1st+	未実施	有り
1995年 8月	C	BL: 15～25mm	1st+	未実施	有り
1995年 9月	D	ポストラバ22日令	未実施	陽性	有り
1995年 9月	E	ポストラバ33日令	未実施	陽性	有り
1995年 10月	F	BW: 4.82g	Nested+	未実施	未発生
1996年 4月	G	親エビ・ノープリウス・ゾエア	1st+	未実施	有り*

1st+: 1回目のPCR反応で陽性、Nested+: Nested-PCR反応で陽性

*: 詳細は表5-2に示す。

表5-2 G種苗生産場におけるPAV発生状況

月日	状況	サンプル名	Nested+PCR結果	
			供試サンプル数	陽性サンプル数
96/4/15	宮崎県より親エビを搬入	親エビ30尾	3	3
96/4/17	80トン水槽に卵を1000万粒収容		NT*	
96/4/19	ノープリウスに変態	ノープリウス	1	1
96/4/21	ゾエアに変態		NT	
96/4/23	死亡エビが確認される		NT	
96/4/25	死亡エビ増加。ミスに変態しない。		NT	
96/4/26	大量死発生	ミス	1	1

NT*: 未検査

通常の収容量の5倍に近い、80 m³水槽3面にそれぞれ1,000万粒収容した。4月19日にノープリウス、4月21日にゾエアに変態した後、4月23日より死亡エビが観察された。4月25日はゾエア変態5日であり通常はミスに変態する時期であるがこの時期においてもミスに変態しないまま、大量死が発生した。4月26日には3水槽のうち1水槽が全滅し、2水槽は50%以下の生残率になった。その後残りの2水槽のうち1水槽が全滅し、残った水槽は4月29日にミスに変態し、この時点での生残率は6.7%であった。この群はPCR検査の結果、親エビ、ノープリウス、ゾエアでウイルス陽性反応がNested-PCRで認められた。

2 種苗生産過程でのPCR法によるPRDVの検出

結果を表5-3に示した。検査サンプル数は採卵エビが31、受精卵が20、ノープリウスが4、ゾエアが9、ミスが2、ポストラバが23であり、1回目のPCRではPRDVの陽性反応は確認できなかった。しかし、Nested-PCRでは、採卵エビの31サンプル中2サンプルおよび受精卵20サンプル中1サンプル、ノープリウス4サンプル中1サンプル、ポストラバ23サンプル中3サンプルで陽性反応を確認した。採卵エビのNested-PCR反応の陽性サンプルは、採卵後死亡した群であった。

表5-3 PCR法によるPRDV陽性数（熊本県栽培漁業協会）

種類	平均体重範囲 (g)	部位	検査サンプル数	Nested 陽性* サンプル数
採卵用エビ	79.1~154.4	胃	31	2
受精卵	—	全体	20	1
ノープリウス	—	全体	4	1
ゾエア	—	全体	9	0
ミス	—	全体	2	0
ポストラバ	—	全体	23	3

Nested 陽性：各検査群毎のNested-PCR検査での陽性プール数。受精卵のサンプル数は1水槽に収容した卵から各水槽毎0.1gを1サンプルとした。

考 察

今回、種苗生産機関でのPAV発生状況調査の結果、成長不良や大量死が発生した事例においてPRDVが検出されたことからクルマエビ種苗が感染源の一つであることが推察される。クルマエビ属エビ類に感染するウイルス症の感染源についてはChen *et al.* (1989)が、組織観察で、天然の成エビ及び種苗生産用の親エビのMBV感染を報告し、桃山(1988)は、BMNVの種苗生産における感染源として疫学調査、組織観察、蛍光抗体法の結果

から、親エビが主要な伝染源であるとしている。またPAVの発症とクルマエビ種苗との関係については第1章で、1993年に日本国内でのPAVの発症は、PRDVが中国産種苗とともに持ち込まれた可能性が高いことを示した。さらに梅沢(1996)は1995年に行ったクルマエビ養殖業者へのアンケート調査の結果から、種苗生産機関でのPAVの発症について、特定の種苗生産場で生産したクルマエビが異なる配付先でPAV発生した例が4例あることを報告している。本調査結果と合わせると養殖場に導入されたクルマエビ種苗が感染源となっているものと思われた。

種苗生産過程での発生状況を検討すると、大量死が発生し、親エビからゾエアまでPRDV陽性反応が認められる例や、大量死が未発生で、各ステージで数回PRDV陽性反応が認められる例があった。これらから、種苗生産機関において異常が認められずに、PRDV感染クルマエビ種苗が出荷されることが推測される。したがって感染源の遮断のためには、種苗生産場においても複数のステージでPCR法によりウイルス感染の有無を調査し、一度でもウイルス陽性反応が認められた群は導入を行わないことが必要である。

さらに、感染源の遮断のためには前述したとおりPAV発生養殖場から採取したイソガニ *Hemigrapsus sanguineus*、スジエビ類 *Palaemon spp.* からPCR法によりPRDVが検出される(木村ら, 1996)ことから今後、養殖場周辺の生物についてもPRDVの存在の有無を検討する必要があると考えられる。

第2節 海水中での活性維持

ウイルスは宿主の生体内から放出されると一定期間後には感染能力を失うことが多い。PAV対策として養殖池から宿主であるクルマエビを全て取り上げ、養殖池内のPRDVを不活化させることが考えられる。この場合のクルマエビ取り上げ期間を設定するために、PRDVが宿主の生体から放出された後の海水中での活性維持期間を検討した。

材料及び方法

1 供試クルマエビ

熊本県内のPAV未発生養殖池から導入した平均体重7.0g~12.3gの健康なクルマエビを各区10~12尾用いた。

2 供試ウイルス液

供試ウイルス液は第1章で述べた方法で作成し、 -80°C で保存した感染液を滅菌ろ過海水で200倍希釈し、供試ウイルス液とした後容積2mlのマイクロチューブに1mlずつ分注し、アルミ箔で遮光後、 15°C 、 20°C 、 25°C 、 30°C に設定したインキュベーター内で4日、10日、20日、28日間保存した。

3 感染方法

ウイルス液の接種は、供試エビをオイゲノール100ppmで麻酔した後、その筋肉内に0.1ml接種した。供試クルマエビは接種後、100ℓ水槽に収容し、飼育水温を $24\sim 25^{\circ}\text{C}$ に保ち流水で飼育した。試験期間は3日ないし4日とし、飼育期間中は給餌を行わなかった。

4 感染確認

第3章で述べた暗視野観察法により感染確認を行った。

結果

結果を図5-1に示した。高温で保存した区ほど感染能力維持期間は短く、 30°C で保存した区（以下 30°C 区と記載）では4日後は100%の感染率を示したが、10日後には25%、20日後以降は0%と感染率は低下した。次に 25°C で保存した区（以下 25°C 区と記載）では4日後は供試エビが全滅し胃の上皮と血液の暗視野観察による感染確認が出来なかった。これ以降、10日後では20%の感染率、20日後、28日後はそれぞれ20%の感染率であった。 20°C で保存した区（以下 20°C 区と記載）では4日後は100%、10日後は60%の感染率、20日後、28日後は20%の感染率であった。 15°C で保存した区（以下 15°C 区と記載）では4日後は100%、10日後は40%の感染率、さらに20日後は40%、28日後は20%の感染率を示し、保存温度が低くなるほど、感染能力維持期間は長くなる傾向を示した。

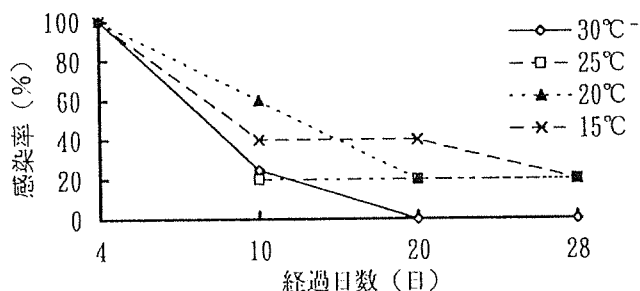


図5-1 海水中の感染能力維持期間・経過日数別感染率

考察

PRDVの海水中の感染能力維持期間は 30°C では20日以内、 25°C 、 20°C 、 15°C では28日以上であった。同じクルマエビのウイルス症であるBMNVの海水中の活性維持期間について桃山(1989)は、高温ほど速やかに不活化され、 30°C では4日、 25°C では7日、 20°C では12日、 15°C では20日以内に不活化されることを報告している。PRDVはBMNVに比べ、海水中の感染維持期間は長い結果が得られた。しかし 30°C で20日以内にウイルスが不活化したことは、二期作をやめ、高水温の夏期に約1か月休業すればウイルスの活性は大きく減少、あるいは完全に不活化されるものと思われる。ただし、生残エビにウイルスがいる場合には、より長期にウイルスが生存する可能性が大きい。

第3節 PRDV に対する各種消毒剤の効果

養殖池の壁や、底砂、養殖に用いる器具、機材の消毒を効果的に行うために、各種消毒剤のPRDVに対する不活化効果について検討し、PRDV対策に用いる消毒剤の選定を行った。

材料及び方法

1 供試クルマエビ

熊本、山口県内のPAV未発生養殖池から導入した、平均体重0.8g~9.9gの健康なクルマエビを各区6~10尾用いた。

2 供試ウイルス液

1) 塩素、ヨード、炭酸ナトリウム・過酸化水素付加物による不活化

供試ウイルス液は第1章の方法で作成し、 -80°C で保存した感染液を滅菌ろ過海水で4,000倍希釈した後、供試ウイルス液とした。

2) エタノールによる不活化

試験1と同じ -80°C で保存した感染液を滅菌ろ過海水で40倍希釈した後、供試ウイルス液とした。

3) 逆性石鹼による不活化

試験1と同じ -80°C で保存した感染液を滅菌ろ過海水で100倍希釈した後、供試ウイルス液とした。

4) 低濃度塩素、低濃度ヨードによる不活化

試験1と同じ -80°C で保存した感染液を、滅菌ろ過海水で 10^{-5} 倍に希釈し使用した。なお供試ウイルス液に含

まれる有機物の塩素およびヨードに対する影響を考慮し、あらかじめ、1ppmの塩素及び2.5ppmのヨウ素液が失活しなくなる供試ウイルス液の希釈倍率を測定した結果から、供試ウイルス液の上記希釈倍率を設定した。

3 供試消毒剤による処理方法

用いた消毒剤は、塩素剤（有効塩素12%含有 次亜塩素酸ナトリウム液 試薬特級）、ヨード剤（有効ヨウ素1%含有 イソジン液 明治製菓(株)）、エタノール（エチルアルコール99.5%）、逆性石鹼（塩化トリメチルアンモニウムメチレン10%含有 パコマ エーザイ(株)）、炭酸ナトリウム・過酸化水素付加物（日本パーオキサイド(株) 以下PC-Pと記載）の5剤とし、処理は以下の手順で行った。

1) 塩素剤

消毒剤の濃度は1、2.5、5、10、25、50、100ppmの7濃度を設定し、ウイルス液と次亜塩素酸ナトリウム液を混合後所定の濃度になるように容積50mlのメスフラスコ内で混合し、25℃に設定した恒温水槽に収容し、10分間放置した後速やかに取り上げ、あらかじめ算出した中和に必要な量のN/10またはN/100規定のチオ硫酸ナトリウムを混合し、作用を停止させた。混合した塩素剤、中和剤、ウイルス液の量を表5-4に示した。

2) ヨード剤

消毒剤の濃度は有効ヨウ素濃度で2.5、5、10、25、50、100ppmの6濃度を設定し、塩素剤と同様に処理を行った。混合したヨード剤、中和剤、ウイルス液の量を表5-4に示した。

表5-4 各種消毒剤によるPRDV不活化試験：薬剤等の使用量

試験消毒剤	消毒剤濃度 (ppm)	ウイルス液量 (ml)	消毒剤濃度 (%)	消毒剤液量 (ml)	中和剤量 (ml)
塩素剤	1.0	49.50	0.01	0.50	0.14*
	2.5	48.75	0.01	1.25	0.35*
	5.0	49.75	0.10	0.25	0.72*
	10.0	49.50	0.10	0.50	0.14
	25.0	49.50	0.25	0.50	0.35
	50.0	49.00	0.25	1.00	0.70
ヨード剤	100.0	49.50	1.00	0.50	1.40
	2.5	48.75	0.01	1.25	0.10*
	5.0	49.75	0.10	0.25	0.20*
	10.0	49.50	0.10	0.50	0.40*
	25.0	49.50	0.25	0.50	0.91*
	50.0	49.00	0.25	1.00	1.75*
	100.0	49.50	1.00	0.50	0.40

* : N/100規定チオ硫酸ナトリウム、無印はN/10規定チオ硫酸ナトリウムを用いた。

3) エタノール

消毒剤の濃度は10、20、30、40%の4濃度設定し、エタノールとウイルス液を混合後所定の濃度になるようにメスフラスコ内で混合し、25℃に設定した恒温水槽に収容し1分間放置し、その後速やかに取り上げ、100倍希釈し作用を停止させた。

4) 逆性石鹼（パコマ）

消毒剤の濃度は50、100、250、500ppmの4製剤濃度を設定し、パコマとウイルス液を所定の濃度になるように容積25mlのメスフラスコで混合後、25℃に設定した恒温水槽に収容し、10分間放置した後、滅菌ろ過海水で10倍希釈することにより作用を停止させた。

5) PC-P

消毒剤の濃度は100、500、1,000、5,000ppmの4製剤濃度を設定し、ウイルス液50mlとPC-Pをそれぞれ0.005、0.025、0.05、0.25gを容積50mlのメスフラスコ内で混合後、25℃に設定した恒温水槽に収容し60分間放置した。

4 感染方法

供試エビをオイゲノール100ppmで麻酔した後、所定濃度の消毒剤で処理したウイルス液を供試エビの筋肉内に0.1ml接種した。また不活化処理後作用を停止させた薬剤がクルマエビに与える影響を検討するため、ろ過海水にそれぞれの試験区での最高濃度の処理を試験区と同様に行い中和、希釈した液を0.1ml接種しネガティブコントロールとし、ポジティブコントロールとして400倍、1,000倍、4,000倍、100,000倍に希釈したウイルス液を接種した区を設けた。

5 感染確認方法

実験終了時（ウイルス液接種3日後）に生存していたエビを無作為に5尾（5尾未満の場合は生残エビの全数）を取り上げ、第3章で述べた暗視野診断法で、胃の上皮細胞のウイルス感染核と、血液内のウイルス粒子を確認した。

結果

結果を表5-5に示した。25℃で10分間作用させる条件では、塩素剤とヨード剤は低濃度で効果が認められ、塩素は1ppm、ヨウ素は2.5ppmと非常に低濃度でPRDVは不活化された。またエタノールでは30%以上、逆性石鹼（パコマ）では250ppm、PC-Pでは5,000ppmの濃度でPRDVは不活化された。またネガティブコントロールの感染率は0%であった。

表 5-5 消毒剤による PRDV の不活化効果

消毒剤の種類・濃度	濃度	接種ウイルス最終稀釈率	実験期間 (日)	実験期間中のへい死率 (%)	感染率 (%)	判定結果
次亜塩素酸ナトリウム (ppm)	100* ¹	1/4,000	3	0	0/5	+
	50	1/4,000	3	0	0/5	+
	25	1/4,000	3	0	0/5	+
	10	1/100,000	3	11	0/5	+
	5	1/100,000	3	0	0/5	+
	2.5	1/100,000	3	20	0/5	+
	1	1/100,000	3	10	0/5	+
	0* ²	1/100,000	3	60	4/4	-
イソジン液 (ppm)	100* ³	1/4,000	3	0	0/5	+
	50	1/4,000	3	0	0/5	+
	25	1/4,000	3	0	0/5	+
	10	1/4,000	3	0	0/5	+
	5	1/4,000	3	0	0/5	+
	2.5	1/100,000	4	29	0/5	+
		0* ²	1/100,000	4	86	1/1
エタノール (%)	40	1/4,000	3	0	0/5	+
	30	1/4,000	3	0	0/5	+
	20	1/4,000	3	13	5/5	-
逆性石鹼 (パコマ) (ppm)	500	1/1,000	3	0	0/5	+
	250	1/1,000	3	0	0/5	+
	100	1/1,000	3	40	3/5	-
	50	1/1,000	3	10	2/5	-
	0* ²	1/1,000	3	30	4/5	-
炭酸ナトリウム・過酸化水素物 (PC-P) (ppm)	5,000	1/4,000	3	0	0/5	+
	1,000	1/4,000	3	20	2/5	-
	500	1/4,000	3	20	2/5	-
	100	1/4,000	3	10	1/5	-
	0* ²	1/4,000	3	20	2/5	-

+ : 有効 (0/5 : 感染エビ数/供試エビ数) - : 無効 (1/5~5/5)

*1 : 有効塩素量 *2 : 無処理ウイルス液 *3 : 有効ヨウ素量

なおコントロール区の感染率は 0% (0/5) である。

考 察

PRDV は、塩素とヨウ素に対する感受性が非常に高く、エタノール、逆性石鹼でも不活化されることが明らかになった。桃山 (1989) の BMNV についての報告では、BMNV に対する各種消毒剤の不活化効果について、25℃ で 10 分間作用させた場合、塩素 5ppm、ヨウ素 25ppm、逆性石鹼 (塩化ベンザルコニウム) 100ppm、エタノール 30% でウイルスが不活化されると報告している。PRDV は BMNV と比較すると塩素とヨウ素に感受性が高いと考えられた。このようにウイルスによって消毒剤に対する耐性が異なることに対して、井上は (1994) 消毒剤のウイルスに対する作用機序は消毒剤がウイルスのタンパク

質または脂質、核酸と化学的に反応して、これを酸化・還元あるいは可溶化し、ウイルスの生物学的活性を失わせるとし、ウイルスの消毒剤感受性はウイルスの構造に関連し、ウイルスの種類により感受性は異なることを述べている。このことから PRDV と BMNV の消毒剤に対する耐性の差はウイルスの構造に起因すると考えられた。また本試験の結果から実際に消毒を行う場合は、養殖池での消毒剤は、周辺環境への影響を考慮すると外海に漏水がない全築堤式や陸上池方式の養殖池の場合は塩素剤が有効であると考えられた。また、外海に海水が流れ出す半築堤式養殖池の場合、水と反応して発生期の酸素で消毒する PC-P を 5,000ppm で使用する方法が他生物に対してより安全であると考えられる。PC-P は酸素系漂白剤・底質改良剤・酸素供給剤として商品化され、またすでにエビ養殖において底質改良剤として使用されている。本剤は水によく溶け、皮膚への刺激性が少なく、大腸菌への石炭酸指数は 1.8、腸炎ビブリオに対する石炭酸指数は 2.8 と除菌効果を有する。また日常の手足の消毒には、エタノールを 30% 以上の濃度で使用するか、逆性石鹼を 250ppm 以上の濃度で使用する

ことが有効である。さらに消毒にあたっては、消毒剤は有機物や洗剤類、水の硬度、pH による影響で効果低下を起こすため (井上ら, 1994)、有機物が非常に多い養殖池内の消毒や、機械、器具類消毒に際しては有機物に薬剤が消費される量を見込んで使用するなど、十分注意する必要がある。例えば Amend (1974) はサケ科魚類の伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV) の対策の場合、有効ヨウ素 12ppm でウイルスは不活化されるが、有機物の存在を考慮し、魚卵の消毒にあたっては有効ヨウ素 50ppm での使用を推薦している。

一方、種苗生産段階において第 1 節で述べたようにクルマエビ受精卵から PRDV が検出されている。桃山 (1988) は BMNV 防除の目的でヨード剤による消毒効果について、クルマエビ受精卵は 25℃、有効ヨウ素 5ppm、10 分間処理までは毒性が認められないと報告している。種苗生産場での PRDV の感染のメカニズムは不明であるが、BMNV に比べ、ヨード剤に対する感受性が高いこと

から PRDV 感染予防対策として有効ヨウ素 5ppm 以下での低濃度でのヨード剤による洗卵が可能であると考えられる。

第 4 節 乾燥による PRDV の不活化

桃山 (1989) は、BMNV の乾燥に対する耐性について、乾燥 1.5 時間後には不活化し、乾燥が BMNV に対して有効であると報告している。養殖クルマエビの PRDV 対策を検討する場合、BMNV と同様に乾燥に対する耐性が低いのであれば、養殖場の海水を排水し、その期間中に底砂を乾燥することにより、養殖池内の PRDV の不活化が可能と考えられる。そこで、乾燥による PRDV の不活化について検討した。

材料及び方法

1 供試クルマエビ

熊本県内の PAV 未発生養殖池から導入した平均体重 8.5g の健康なクルマエビを各区 10 尾用いた。

2 供試ウイルス液

供試ウイルス液は第 1 章で述べた方法で作成し、 -80°C で保存した感染液を希釈せずに供試ウイルス液とした。

3 乾燥

桃山 (1989) の方法に準じた。すなわち、感染液 0.5 ml を直径 9cm のろ紙に滴下し、ろ紙を並べたガラス管の上に置き、クリーンベンチ内で送風して乾燥し、所定時間経過後、はさみでろ紙を裁断し、ろ過海水 20ml の中に投入後、スターラで強くかき混ぜ、その上澄み液を感染液とした。乾燥時間は、感染液を滴下したろ紙の重量を一定時間毎に計量し、恒量に達した時を 0 時間とし、これ以降を乾燥時間とした。なお実験は、気温 26°C に調節された室内で行った。また、乾燥処理が供試エビに与える影響を検討するため、ろ紙を裁断し、ろ過海水 20ml の中に投入後、スターラで強くかき混ぜた上澄み液を対照液とし、さらに、感染液を直径 9cm のろ紙に滴下後、直ちにろ紙を裁断し、ろ過海水 20ml の中に投入後、スターラで強くかき混ぜ、その上澄み液を無処理感染区とした。

4 感染方法

感染はクルマエビをオイゲノール 100ppm で麻酔後、ウイルス液を筋肉内に 0.1ml 接種した。

5 感染確認方法

実験終了時 (ウイルス接種 3 日後) に生存していたエビを無作為に 5 尾 (5 尾未満の場合は生残エビの全数) 取り上げ、第 3 章で述べた暗視野診断法で、胃の上皮細

胞のウイルス感染核と、血液内のウイルス粒子を確認した。

結 果

結果を表 5-6 に示した。対照区では感染したエビは認められず、無処理区では 100 % の感染率、0 時間後では 60 %、1 時間後、2 時間後では 40 % の感染率であり、3 時間後では 0 % の感染率であった。

表 5-6 乾燥による PRDV の不活化

試験区	感染数/供試数	不活化効果
3 hr	0/5	+
2 hr	2/5	-
1 hr	2/5	-
0 hr	3/5	-
無処理	5/5	-
コントロール	0/5	-

+: 不活化効果あり

-: 不活化効果なし

考 察

PRDV は乾燥後 2 時間までは感染能力を維持していたが、3 時間の乾燥では不活化された。PRDV は 1.5 時間の乾燥で不活化する BMNV (桃山, 1989) に比べ、やや乾燥に対する耐性は高いと考えられた。しかし全築堤式及び陸上式クルマエビ養殖場においては、クルマエビ養殖終了後、完全に排水し、底砂を山状に盛り上げ、一定期間乾燥する作業が行われている。PRDV は 3 時間の乾燥で不活化することから、この作業を 1 回のみではなく、数回繰り返し、養殖場の底砂を完全に乾燥させることで、PRDV による大量死が発生した全築堤式、陸上式のクルマエビ養殖場内の PRDV の密度を低下させると推察できる。この乾燥によるウイルスの除去は、塩素剤などを用いる方法に比べ、作業の危険性が少なく、周辺環境への影響もない方法と考えられる。

第 5 節 感染耐過エビの養殖池からの除去法

半築堤式の養殖池が密集した地区で PAV による大量死が発生した場合、発生池を放置することは、周辺にウイルスを拡散させることになり、防疫上問題である。このような場合、感染した養殖池のクルマエビを全て除去

することが必要である。

クルマエビの除去は、曳き網、電気網等により取りあげる方法があるが、網での取り残しや、網で回収できないサイズのエビ等は、この方法のみでは全て取りあげることはできない。そこでこれらの手段の後、養殖池内に薬剤等を散布し感染しているクルマエビを殺処分せざる得ない。本節では数種の薬剤のクルマエビに対する毒性について検討し、殺処分するために必要な薬剤濃度と散布方法について示した。

材料及び方法

試験1：薬剤の検討

1 供試クルマエビ

平均体重 15.6g の健康なクルマエビを各区 4 尾用いた。

2 供試薬剤及び濃度

供試した薬剤は、PC-P（日本パーオキサイド(株)：120,000ppm、12,000ppm、1,200ppm）、過酸化水素（300ppm、30ppm、3ppm）、次亜塩素酸ソーダ（5ppm、0.5ppm）の 3 剤 8 濃度とした。

3 作用方法

ポリカーボネイト製容積 30ℓ の水槽に薬剤を加えた後に 20ℓ になるようにろ過海水を入れ、その中にクルマエビを収容し所定の薬剤を投入した。その後 2 時間無通気で放置した後、別水槽に移し流水で 24 時間飼育した。

薬剤の作用方法は、半築堤での散布を想定して設定した。すなわち半築堤養殖池において、最も干出時間が短い養殖池では最干時の前後 2 時間で海水が外海から流入する。よって作用時間は 2 時間とした。試験時の水温は 12.9℃～13.2℃であった。

4 効果確認

殺効果の確認は、薬剤の作用 5 分後、15 分後、30 分後、1 時間後、2 時間後、24 時間後に横転したクルマエビを計数して行った。

試験2：散布方法の検討

1 供試クルマエビ

平均体重 17.0g の健康なクルマエビを各区 4 尾もしくは 5 尾用いた。

2 供試薬剤及び散布量

供試した薬剤は、PC-P を用い、散布量は 630g/㎡、315g/㎡、158 g/㎡、79g/㎡ の 4 区とした。

3 作用方法

薬剤の作用方法は、半築堤で砂が露出する状況を想定し設定した。すなわち、ポリカーボネイト製容積 30ℓ の水槽の底に 2cm の厚さに砂を敷き、ろ過水を 20ℓ 入れ、

クルマエビを水槽に収容し、あらかじめクルマエビを潜砂させた。次に、水槽のろ過水を砂面が露出するまで排出し、砂面に PC-P を所定量散布後、水槽をゆっくり振とうさせ、砂、ろ過水、PC-P を混合し、2 時間無通気で放置した。2 時間経過後、砂から生残したクルマエビを取り上げ、別水槽に移し流水で 24 時間飼育した。試験時の水温は 12.5℃であった。

4 効果確認

殺効果の確認は、薬剤の作用 10 分後、30 分後、1 時間後、2 時間後、24 時間後に横転したクルマエビを計数して行った。また Behrens-Kaerber 法に準じて TL_m24 値を算出した。

試験3：処理水温の検討

1 供試クルマエビ

平均体重 22.8g の健康なクルマエビを各区 5 尾用いた。

2 供試薬剤及び散布量

供試した薬剤は、PC-P を用い、散布量は 200g/㎡、100g/㎡、50g/㎡、25g/㎡ の 4 区とした。

3 処理水温

水温は 20℃、25℃ の 2 水温とした。

4 作用方法

薬剤の作用方法は、容積 10ℓ のプラスチック製コンテナの底に 2cm の厚さに砂を敷き、ろ過水を 10ℓ 入れ、クルマエビを水槽に収容し、あらかじめクルマエビを潜砂させた。次に、水槽のろ過水を砂面が露出するまで排出し、砂面に PC-P を所定量散布後、水槽をゆっくり振とうさせ、砂、ろ過水、PC-P を混合し、2 時間無通気で所定の温度に設定したインキュベータ内に放置した。

5 効果確認

殺効果の確認は、薬剤の作用 1 時間後、2 時間後に横転したクルマエビを計数して行った。

結果

試験1：薬剤の検討

結果を表 5-7 に示した。PC-P を 120,000ppm で作用させた場合は 5 分後に 1 尾、30 分後に 3 尾横転し、4 尾全てが死亡した。また 12,000ppm でも同様に 5 分後に 1 尾、1 時間後に 1 尾、2 時間後に 2 尾となり全て死亡した。PC-P はこの 2 つの濃度で作用させた場合、クルマエビに対して高い毒性を示した。過酸化水素では 300ppm で作用させた場合に 1 時間後に 1 尾横転したが、それ以降横転する個体は見られず、これ以下の濃度では横転個体は見られなかった。次亜塩素酸ソーダでは 5ppm、0.5ppm では横転個体は見られなかった。なお横転した個体が回

表 5-7 消毒剤のクルマエビに対する毒性 1

消毒剤	濃度 (ppm)	横転数						合計 (死亡尾数/供試尾数)
		5分	15分	30分	1時間	2時間	24時間	
PC-P	120,000	1	0	3	—	—	—	4/4
	12,000	1	0	0	1	2	0	4/4
	1,200	0	0	0	0	0	0	0/4
過酸化水素	300	0	0	0	1	0	0	1/4
	30	0	0	0	0	0	0	0/4
	3	0	0	0	0	0	0	0/4
次亜塩素酸ソーダ	5	0	0	0	0	0	0	0/4
	0.5	0	0	0	0	0	0	0/4

表 5-8 消毒剤のダルマエビに対する毒性 2

消毒剤	散布量 g/m ²	横転数					合計 (死亡尾数/供試尾数)	TLm ₂₄ (g/m ²)
		10分	30分	1時間	2時間	24時間		
PC-P	630	0	1	1	1	1	4/4	102.7
	315	0	0	0	2	2	4/4	
	158	0	0	0	3	2	5/5	
	79	0	0	0	0	2	2/5	

復し生残した例はなかった。

試験 2 : 散布方法の検討

結果を表 5-8 に示した。PC-P 散布量が 630g/m² の場合は散布 30 分後から横転個体が出現し、1 時間後 1 尾、2 時間後 1 尾、24 時間後 1 尾で死亡率は 100%、また 315 g/m²、158g/m² の散布量では 2 時間後から横転個体が現れ、24 時間後には全て横転し死亡率は 100% であった。また 79g/m² の散布量では 24 時間後に 2 尾横転し、累積死亡率は 40% であった。さらに、この結果から算出した TLm₂₄ 値は 102.7g/m² であった。

試験 3 : 処理水温の検討

結果を表 5-9 に示した。PC-P 量が 200g/m² の場合は、処理水温が 20℃、25℃ のいずれの場合も、散布 1 時間後で供試したエビは全て死亡した。また PC-P 量が 100g

表 5-9 処理水温別の PC-P のクルマエビに対する毒性

処理水温 (°C)	散布量 (g/m ²)	横転数		合計 (死亡尾数/供試尾数)
		処理 1 時間後	処理 2 時間後	
20	200	5	—	5/5
	100	0	4	4/5
	50	0	1	1/5
	25	0	0	0/5
25	200	5	—	5/5
	100	5	—	5/5
	50	1	0	1/5
	25	1	0	1/5

/m² の場合は処理水温が 20℃ では 5 尾中 4 尾死亡し、25℃ では全てのエビが死亡した。以下 PC-P 量が 50g/m² の場合、処理水温が 20℃、25℃ のいずれも 5 尾中 1 尾死亡し、PC-P 量が 25g/m² の場合は処理水温が 20℃ では死亡したエビはなく、25℃ では 5 尾中 1 尾死亡した。

考 察

PC-P、次亜塩素酸ソーダ、過酸化水素のクルマエビに対する毒性について検討した。この 3 剤は実際に養殖池に散布する場合を想定して選定された。すなわち、PC-P は漂白剤、底質改良剤として用いられており、水と混合すると発生期の酸素を放出し、これが殺菌、消毒作用をもつ。また次亜塩素酸ソーダは種苗生産場などで実際にウイルスの消毒に用いられている。過酸化水素は、作用機序が PC-P と同様で、液状で使いやすい。

薬剤を使って半築堤式養殖池でクルマエビの殺処分をする場合には、出来るだけ薬剤の使用量が少なく、外海への影響がない薬剤を選定する必要があるが、水産用水基準 (1965) では塩素剤は 10ppm で海産魚が激しく狂奔し、カキでは 0.01~0.05ppm でろ水能力が減少すると記載されているように、塩素剤は魚毒性が非常に高い。このため、試験では半築堤養殖池に散布した後、外海水と混合して、魚毒性が問題にならないと考えられる濃度に希釈される塩素剤濃度でクルマエビに対する毒性を検討したが、十分な殺効果が得られなかった。

試験に供試した薬剤濃度で、PC-Pのみがクルマエビに対し殺クルマエビ効果が認められたので、殺処分には有効な使用量を検討するため、試験2を行った。この結果、水温が13℃の場合では、砂面が露出し、水分がある状態で158g/㎡のPC-Pを散布することでクルマエビに対する高い殺効果が得られ、養殖池でのクルマエビの殺処分剤としての有効性を確認できた。また処理水温別の殺効果について試験3で検討した。この結果、25℃の処理水温では100g/㎡で供試した全てのエビが死亡し、処理水温が高いほど低い濃度で殺効果が得られることが明らかになった。また、実際の使用に当たっては、周辺環境への影響を出来るだけ小さくすることを考慮し、使用量を少なくすることが必要である。したがって殺クルマエビ処理は水温20℃以上の高水温時に散布し、その散布量は100g/㎡以上が望ましいと考えられた。

第6節 PC-Pの他の生物に対する影響

第5節で養殖池でのクルマエビの殺処分剤として有効性が確認できたPC-Pについて、実際の養殖池で使用するために、散布後に外海に流出した状態で、他の生物に対する影響について検討した。

材料及び方法

1 供試生物

マダイ *Pagrus major* (平均TL13.5cm)、ヒラメ *Paralichthys olivaceus* (平均TL7.8cm) を各4尾、アサリ *Tapes (Amygdala) japonica* (平均殻長2.0cm)、ムラサキイガイ *Mytilus edulis* (平均殻長3.0cm)、アコヤガイ *Pinctada martensii* (平均殻長4.0cm) 各4個を供試した。

2 供試消毒薬及び濃度

PC-Pを容積200ℓのポリカーボネイト水槽の底面積(0.38㎡)にあわせて第5節で求められたTLm値の約2倍量である200g/㎡量(76g)を散布した。

3 作用方法

容積200ℓの上記ポリカーボネイト水槽の底に厚さ3cmに砂を敷き詰め、海水を砂面まで注入し、PC-Pを投入した。投入後砂と、ろ過海水およびPC-Pをよく混合し、2時間放置した。2時間経過後ポリカーボネイト水槽に、ろ過海水が2時間で満水になるように、すなわち、処理開始から4時間で満水になりオーバーフローするようにろ過海水を注入した。

100ℓのポリカーボネイト水槽にはあらかじめカゴを

設置し、その中に供試生物を收容し、エアーストンで通気をしながら使用済み薬剤を作用させた。試験中の水温は、冬季出荷エビ飼育の池整備期間の水温に合わせて18℃に設定した。

4 薬剤の影響の判定

24時間飼育し、供試生物の死亡の有無を確認した。

結果

表5-10に結果を示した。また図5-2に試験中の溶存酸素とpHの変化を示した。PC-P排水が流れ込む水槽の溶存酸素量は8.3~8.7mg/ℓ、pHは8.15~8.30の間であり特に異常は認められなかった。また開始直後、30分後、1時間後、2時間後、24時間後の観察では死亡した生物は見られず、魚類は正常に遊泳し、貝類も異常に外殻を開けたりする様子は見られなかった。

表5-10 PC-Pの他の生物に対する影響

供試動物	処理後経過時間 (hr)	経過後の死亡数					
		供試尾数	0	0.5	1	2	24
マダイ	4	0	0	0	0	0	0
ヒラメ	4	0	0	0	0	0	0
アサリ	4	0	0	0	0	0	0
ムラサキイガイ	4	0	0	0	0	0	0
アコヤガイ	4	0	0	0	0	0	0

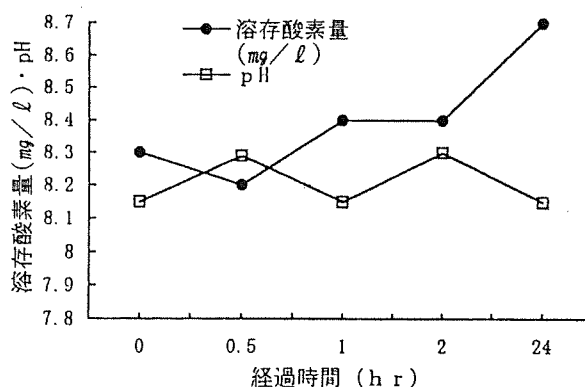


図5-2 試験中の環境変化

考察

半築堤式養殖池で消毒を行う場合、最も早い養殖池では最干潮から2時間後に海水が流入する。このためPC-Pで半築堤式養殖池を消毒する場合、処理開始後約4時間後に外海にPC-P排水が流出した場合に、外海の生物を重大な影響を与えないことが使用の条件である。今回の試験では実際の養殖池に近い状況で、生物を反応後のPC-P廃液で処理し、使用後のPC-Pが短期的に生物に与える

影響を検討した。その結果、遊泳異常や死亡などは認められなかった。

第7節 PC-P による野外試験

第5節、第6節で明らかになったPC-Pを用いての半築堤式養殖池の消毒方法について、実際に養殖池での野外試験を行い、消毒排水が短期的に環境に与える影響について検討した。

材料及び方法

1 試験実施場所

熊本県天草郡大矢野町の面積2,600㎡の半築堤式養殖池で試験を実施した。当該養殖池は水門が2箇所あり、試験時には水門に土嚢を積み、漏水を防止した。また養殖池の底面は平均潮位プラス130cmで、岸側から沖側に向かって水深が深くなる構造であった。池の構造を図5-3に示した。

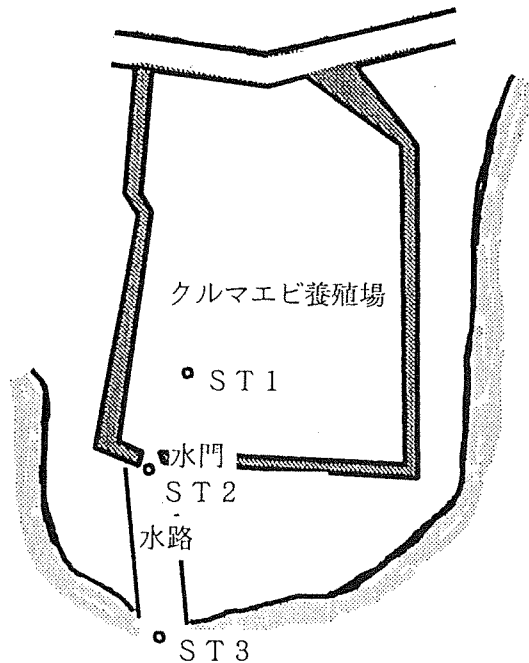


図5-3 試験実施場所平面図

2 消毒方法

消毒は次の順序で行った。まず最干潮の2時間前に養殖池の漏水個所に土嚢を設置し漏水を防いだ。次に、岸側の浅く砂面が露出した場所から徐々に、PC-Pを手撒きで100g/㎡の基準で散布した。散布した場所は速やかに、ホイールロードで、耕耘し、海水と砂とPC-Pを混合させた。

なお、試験は水温約14℃で行った。

3 生物への影響

養殖池の排水が流出する水路の養殖池の水門から4m離れた地点に、直径40cm、高さ21cmの籠3個にマダイ *Pagrus major* (尾叉長10.0cm, 6尾)、クサフグ *Takifugu niphobles* (尾叉長8.0cm, 1尾)、アサリ *Tapes (Amygdala) japonica* (殻長2.0cm, 40個)、アコヤガイ *Pinctada martensii* (殻長4.0cm, 4個)、アナアオサ *Uiva pertusa* (湿重200g)を収容し、試験開始から27時間後まで観察を行った。

4 外海への排水

養殖池内(ST1)、水門の外部(ST2)及び、養殖池から排水が流出する水路(ST3)で消毒開始20分前、直前、薬剤散布直後、散布1、1.5、2、3、5、7、9、17、19、21時間後に水温、溶存酸素、pH、過酸化水素濃度を測定した。水温はサーミスタ水温計、溶存酸素はカルバニ電極型DOメーター、pHはガラス電極式水素イオン濃度計、過酸化水素はヨウ素滴定法で測定した。

結果

カゴに収容した生物は死亡は見られず、マダイ、クサフグ、アサリ、アコヤガイ、ガザミ、マダコとも外観上の観察で正常な遊泳状況を示した。またアナアオサにも特に変色等の異常は見られなかった。

水質測定の結果を表5-11に示した。ST1では、水温が10.5~14.1℃の範囲、溶存酸素が9.2~25.5mg/l、pHが8.21~9.24、過酸化水素濃度が0~169.8mg/lであり、溶存酸素はPC-P散布30分後から増加し、pH、過酸化水素濃度はPC-P散布1時間後から増加し、散布5時間後まで高い濃度を示した。ST2では、水温が10.9~13.6℃の範囲で、溶存酸素が7.1~10.0mg/l、pHが8.15~8.32、過酸化水素濃度が0~4.7mg/lであり、溶存酸素はPC-P散布30分後にわずかに増加した後、散布前の濃度に戻った。過酸化水素濃度はPC-P散布1時間後から増加し、散布3時間後までやや高い濃度を示した。ST3では溶存酸素量が散布2時間後に10mg/lに上昇した以外は特に変化は見られなかった。

考察

野外実験においても、短期的な生物への影響は第6章の結果と同様で、PC-P排水が流入する場所に収容した生物に異常行動は認められなかった。これは、PC-Pが水と反応する場合、発生期の酸素を放出して、その発生期の酸素が殺菌・消毒作用を持つため、反応が終わると、排水は溶存酸素の高い海水となるためと考えられる。また、

表 5-11 野外試験水質測定結果

測定時間	時刻	潮位	ST 1				ST 2				ST 3			
			水温 (°C)	溶存酸素 (mg/l)	pH	過酸化 水素濃度 (mg/l)	水温 (°C)	溶存酸素 (mg/l)	pH	過酸化 水素濃度 (mg/l)	水温 (°C)	溶存酸素 (mg/l)	pH	過酸化 水素濃度 (mg/l)
散布開始前	14:10	220	12.1	9.8	8.23	0.0	11.9	9.8	8.3	0.0	11.6	9.8	8.24	0.0
散布開始直前	14:30	185	12.2	9.6	8.27	0.0	12.3	9.7	8.3	0.0	12.6	9.6	8.25	0.0
散布 30 分後	15:00	148	14.1	10.7	8.16	0.0	13.6	10.0	8.3	0.0	12.0	9.6	8.26	0.0
散布 1 時間後	15:30	120	14.1	19.3	9.24	169.8	12.2	8.4	8.2	4.0	11.6	9.2	8.20	0.0
散布 1.5 時間	16:00	90	13.8	23.5	9.20	104.7	12.1	8.9	8.2	4.0	11.9	9.4	8.22	0.0
散布 2 時間後	16:30	70	14.0	23.8	9.13	81.2	12.7	9.6	8.2	0.0	12.3	10.0	8.25	0.0
散布 3 時間後	17:30	50	12.8	25.5	9.05	72.4	11.8	9.0	8.3	4.7	11.8	9.8	8.27	0.0
散布 5 時間後	19:30	120	10.8	21.0	8.94	35.6	10.9	7.1	8.3	0.0	11.4	9.3	8.23	0.0
散布 7 時間後	21:30	260	11.0	9.5	8.28	0.0	11.0	9.1	8.3	0.0				
散布 9 時間後	23:30	340	10.7	9.2	8.26	0.0	10.9	9.1	8.2	0.0				
散布 17 時間後	7:30	160	10.5	9.5	8.28	0.0	11.0	9.6	8.2	0.0				
散布 19 時間後	9:30	276	11.1	9.4	8.25	0.0	11.0	9.2	8.2	0.0				
散布 21 時間後	11:30	336	11.8	9.2	8.21	0.0	11.0	9.2	8.2	0.0				

水質汚濁に係る環境基準及び水産用水基準ではそれぞれ pH は 7.8~8.3、7.8~8.4、DO は 5mg/l 以上、7mg/l 以上とされている。本試験において散布した養殖池内では溶存酸素、pH、過酸化水素濃度の上昇が認められたが、排水が外海へ流出する調査点の ST2 および 3 では、養殖池への PC-P 散布の影響と見られる水質変化はほとんど認められず、pH は ST2 : 8.15~8.32、ST3 : 8.20~8.27、DO は ST2 : 7.1~10.0mg/l、ST3 : 9.2~10.0 mg/l と環境基準を満たしていた。

要 約

PAV の感染源を遮断するために、養殖場に最も多く存在し、PRDV に感染する生物であるクルマエビ種苗の PRDV 保有状況を調査した。調査は種苗生産機関で異常が発生した事例について PCR 検査と発生状況調査を行い、また種苗生産過程のクルマエビの各ステージにおいて PCR 法により継続的にウイルスの存在を調べることによって行った。この結果、採卵エビ、受精卵、ノープリウス、ポストラーバで陽性反応を確認した。さらに、種苗生産機関での PAV 発生状況調査において 7 例で PRDV が確認された。発生時期は 4 月、7 月~10 月で、感染サイズは受精卵、ノープリウス、ゾエア、ポストラーバであった。また 1 例においては採卵エビからも PRDV が検出された。これら PRDV の確認がされた事例では 7 例中 6 例で大量死が発生しており、種苗生産段階での PAV 感染が明らかになった。

次に、PAV の対策について検討した。

まず、養殖池から宿主であるクルマエビを全て取り上げ、養殖池内の感染宿主を除去することで、PRDV の不活化が可能であるかを検討するため、PRDV が生体から放出された後の海水中の感染能力維持が可能な期間について検討した。この結果、高温で保存した区ほど感染能力維持期間は短く、30 °C で保存した区では 20 日後に不活化され、感染宿主の取り上げの有効性が示唆された。次に、養殖池等の消毒を効果的に行うために、各種消毒剤の PRDV に対する不活化効果について検討した。この結果、25 °C で 10 分間作用させる条件で、塩素剤は 1ppm 以上、ヨウ素は 2.5ppm 以上、逆性石鹼（パコマ）は 250ppm 以上、25 °C で 1 分間作用させる条件でエタノールは 30 % 以上、PC-P は 25 °C で 60 分間作用させる条件で 5,000ppm の濃度で PRDV は不活化された。

さらに養殖池の乾燥の効果を推定するため、乾燥による PRDV の不活化について検討した。この結果 PRDV は 26 °C 3 時間の乾燥で不活化される事が明らかになり、全築堤式、陸上式養殖場での底砂の乾燥の有効性が示唆された。

つぎに養殖池で PAV が発症した場合の生残クルマエビの殺処分を効率的で安全に行うため、殺処分に用いる薬剤種類と濃度、散布方法について検討した。この結果、養殖池でのクルマエビの殺処分は水温 20 °C 以上の高水温時期に、砂面が露出し、水分がある状態で 100g/m² 以上の PC-P を散布することが有効であることが確認できた。

また、PC-P 消毒後の排水が短期的に生物に与える影響について検討したが、PC-P の廃液で生物が死亡、狂奔な

どの異常行動は認められなかった。

さらにこの結果を実際の養殖規模で実施した場合の周辺環境への影響を検討するため、実際に養殖池での野外試験を行った。この結果、生物の死亡、狂奔などの異常行動は認められず、排水の pH、DO は環境基準を満たしていた。

引用文献

- Amned, D. F., (1974): Comparative toxicity of two iodophores to rainbow trout eggs. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **103**, 73-78.
- Chen, SN., PS. Chang and GH. Koh (1989): Observation on Pathogenicity and Epizootiology of *Penaeus monodon* Baculovirus (MBV) in cultured shrimp in Taiwan. *Fish Pathol.*, **24**, 189-195.
- 井上 潔 (1994): 消毒技法の基本, 「平成 4 年度 魚類防疫技術基盤確立事業基本マニュアル, 基本マニュアル専門委員会編, 社団法人 日本水産資源保護協会, 東京」, 139-145.
- 木村武志・山野恵祐・中野平二・桃山和夫・平岡三登里・井上 潔 (1996): PCR 法による PRDV の検出. 魚病研究, **31**, 93-98.
- 松江吉行 (1961): 公共用水域保全のための水質汚濁調査指針, 恒星社厚生閣, 東京.
- 桃山和夫 (1988): 数種消毒剤のクルマエビの受精卵及びノウプリウスに対する毒性. 山口県内海水産試験場報告, **18**, 1-5.
- 桃山和夫 (1989): 紫外線, 日光, 熱および乾燥によるバキュロウイルス性中腸腺壊死症 (BMN) ウイルスの不活化. 魚病研究, **24**, 115-118.
- 桃山和夫 (1989): バキュロウイルス性中腸腺壊死症ウイルス (BMNV) の感染組織および海水中での活性維持. 魚病研究, **24**, 179-181.
- 水産用水質基準専門委員会 (1965): 水産用水基準, 社団法人日本水産資源保護協会, 東京, 29 P.
- 水産用水質基準検討研究協議会 (1996): 水産用水基準, 社団法人日本水産資源保護協会, 東京, 6 P.

第6章 総合考察

水生生物のウイルス病では、水媒介性の水平感染やひん死・へい死個体の摂食による経口感染が容易に起こると推定される。従って高密度養殖環境下では少数の感染個体あるいは、ウイルスを有する個体から排出されたウイルスによる感染が爆発的に流行する危険が常にある。

1993年に西日本各地で発生したクルマエビの大量死は、病徴、宿主サイズ、大量死が急激に発生すること等の点において、それまで我が国で知られていたクルマエビ類の疾病のどれとも異なっていた。本病は熊本県では1993年の5月に、その他の西日本の5県でもほぼ同時に発生し、現在までクルマエビ養殖に被害を与え続けている。また著者らが1994年に本病に関して報告(第1章)した後、病徴や病原体の形態が酷似する疾病がアジア各地で次々に報告され、現在もアジア各地で大きな被害を与え続けている。被害、発病あるいは感染が確認された宿主は、*P. monodon* (Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Chou *et al.*, 1995)、*P. chinensis* (Zhan *et al.*, 1995; Baozhen *et al.*, 1995)、*P. japonicus*, *P. penicillatus* (Chou *et al.*, 1995)、*P. semisulcatus* (平岡ら 未発表)、等が報告されている。もし同じ病原体によるものであれば水族ウイルス病としては例を見ないほど宿主域が広い。

本研究はこの大量死の発生、被害状況について調べるとともに、診断法及び原因ウイルス (PRDV) の性状について明らかにし、その防除方法の確立を目的に行った。

まず、全国150のクルマエビ養殖場に対して行ったアンケート調査の結果から、PRDVが1993年の3月から4月に中国産種苗とともに日本に持ち込まれた可能性が高いことを明らかにした。また、病エビから大量死と密接に関連すると考えられるような細菌は分離されず、寄生虫や真菌も観察されないこと、磨砕ろ液を用いて感染実験を行い、実験感染エビが自然発症エビと同様の症状を呈して死亡することを見出し、本疾病がろ過性病原体(ウイルス)の感染に起因すると推定した(第1章)。次に自然発症個体と人工感染個体の病理組織観察により双方に同様の病変が再現されることを確認した(第2章)。

さらに病原体の確認のため、電子顕微鏡観察を行い、病変部に自然発症エビで観察されたウイルスと形態学的に一致するウイルスを確認し、PAVがPRDVによる感染症であることを明らかにした。また、ウイルスの性状を明らかにするために、病エビの電子顕微鏡観察を行い、PRDVはその増殖部位が核内に限られること、ウイルスのヌクレオカプシッドが楕円形であることやウイルスの大きさからバキュロウイルスあるいはその近縁のウイルスであることを推定し、クルマエビ類に病原性を持つBP、

MBV等のバキュロウイルスと比較検討を行った。その結果、PRDVは包埋体の形成の有無や、ヌクレオカプシッドの形態、サイズ、ウイルスの増殖部位の比較において、これらのウイルスと別種であることを示した。一方、タイにおいて近年報告されたSEMBVや台湾で報告されたWSBV、中国で報告されたsubgroup C baculovirusとの比較で、これらのウイルスとPRDVとのビリオンの形態、疾病の性状の類似性が明らかになった。PAV (Penaeid acute viremia:クルマエビ類の急性ウイルス血症)の病名は、急性の死亡があり、感染エビにおいてウイルス血症が認められることから、筆者らが提案した(Inouye *et al.*, 1995)。

PAVの診断は当初病エビの体色の赤変または退色と外骨格の多数の白点の形成という外見上の特徴で一次識別を行い、その後病エビの組織標本を作成して光学顕微鏡で腫大核や均質化した核を確認後、電子顕微鏡観察でウイルスを確認して診断を行っていた。しかし、防疫、防除の面からはより迅速な診断が必要とされた。このため著者らは、包埋・薄切処理過程を省略できる暗視野顕微鏡観察で本症の特徴である血液中のウイルス粒子を直接、あるいはウイルスに感染した胃の上皮細胞の核が白い塊として観察されることを明らかにし、これを簡易診断法として提案した。急性の死亡、病エビ検体外骨格の白斑の存在、他に病因が推定できないこと、水温20℃以上での発病など、状況が本病に合致する場合はこの方法は診断に有効と考えられる。

また、病徴、発生状況が一致せず、確定診断が必要な場合の診断法として、電子顕微鏡を用いて、ウイルス粒子を確認するネガティブ染色を提案した。現在のところ、PRDVと同様な形態を有し、かつ同様な病徴を示すウイルス又はウイルス病はクルマエビ属には知られていない。本ウイルスは桿菌状のビリオン、ディスク状に断列する傾向を有するヌクレオカプシッド等特徴的な形態を有するため、ネガティブ染色による診断法の有効性は高いと考えられる。この診断法は従来の病理組織切片での診断法に比べ、判定までに30~60分と迅速な診断を可能にした(第3章)。

本ウイルスに対する対策を策定するためには、水中でのウイルス不活化法、ウイルスキャリアーの排除法、器具機材の消毒法などの知見が必要である。本ウイルスは株化細胞での培養が出来ないため、感染実験でこれらの知見を整備する必要があった。そこで再現性が高く、簡便な感染実験方法を検討した。まず、感染源としては、病エビの組織磨砕ろ液を大量に作成し、2年間以上-80

℃の保存で感染価の大きな変化なしに保存可能であること、供試エビとして1g~20gのクルマエビは感染源の筋肉内注射で高いへい死率を示すこと、飼育水温は25℃が適正であること、さらに胃及び血液の暗視野観察で、感染の成立を極めて短期間に確認できることを明らかにした。(第4章)

PAVの発生を予防するためには、伝染源の遮断が必要である。サケ科魚類のウイルス病である伝染性造血器壊死症(IHN)では親魚ならびにそれらの生殖液から高率にIHNウイルスが検出され(Wolf, 1988)、それらに由来するウイルスが感受性の高い稚魚に感染し、発病させると考えられている。PAVに関しては、このような情報は得られていなかった。そこでクルマエビ種苗生産段階において、親エビ、卵、幼生ならびにポストラーバについてPRDVの存在をPCR法(木村ら, 1996)で調査した。この結果、全てのステージからPRDVが検出され、種苗生産段階では親エビ、養殖場では導入種苗が有力な感染源であると推定された。

また、感染源の遮断対策としては、養殖場や器具類の消毒、感染耐過エビの排除が重要である。そこで、PRDVの不活化方法および実際の養殖場での消毒法について検討し、PRDVは高温で保存した場合ほど感染能力維持期間は短く30℃で保存した区では20日後には不活化され、消毒剤に対しては低濃度の塩素、ヨード剤で不活化されることを明らかにした。また感染源になると推定される感染耐過エビの殺処分はPC-P(炭酸ナトリウム過酸化水素付加物)の散布が有効であった。さらに実際の養殖場でPC-Pを用いた場合の他の生物に対する影響や、海洋汚染の有無について検討し、周辺環境への影響が少ないことを確認した(第5章)。

通常のウイルス対策では、飼育場の外部との隔離や、飼育水の消毒、飼育管理の改善、早期の病原体の発見、ワクチンの利用等があげられる。これら対策をクルマエビ養殖にあてはめると、まずワクチンの利用については、甲殻類の免疫系について未だ不明の点が多く早急な開発は望めない。さらに飼育水の消毒や外部との隔離飼育については、被害がもっとも大きかった半築堤式クルマエビ養殖場では、池の構造上実施が困難である。

よって、クルマエビ養殖現場でのPRDV防除対策としては、本研究の成果から第一に養殖場内からウイルスを取り除くこと、第二に養殖場に導入される種苗はウイルスに感染していない種苗を導入すること、第三に、もし発症した場合には早期に発見して、被害を最小限度に抑えることの3点が重要であると考えられる。まず養殖場内から

ウイルスを取り除くためには、夏期に消毒剤を併用して一斉にクルマエビを取り上げた後、地区全体で1カ月間以上休業することでウイルスの密度を低減することが可能である。さらに導入種苗や導入後の定期検査を暗視野診断法と木村らの方法(1996)のPCR検査を併用することにより、ウイルスに感染していない種苗の導入や、PAV感染の早期の発見が可能である。

本研究の結果に基づいて、1994年以降、熊本県下のクルマエビ養殖場において外国産クルマエビの導入の自粛や、養殖場の一斉休業と、一斉消毒、暗視野診断法、電子顕微鏡を用いたネガティブ染色やPCR法によるクルマエビ種苗の定期診断等の対策を行った。また、疫学調査と、感染実験の結果から、発生水温は15℃以上で、感染はクルマエビのサイズに関わらず大量死が発生し、高密度で飼育している場合に多く発生している傾向が認められたことから、養殖業者に高水温期における飼育密度を下げるために冬季収穫エビは出来るだけ遅く養殖を開始し、導入種苗数を少なくして高水温期の単位面積当たりの収容重量を低減すること等の飼育管理の改善を指導した。さらに二期作を行わないことも指導した。二期作では、その養殖スケジュールから池の休業期間が短くなったり、休業期間を全く設定しない場合が起こり得る。このためクルマエビの残餌や排泄物による底質の悪化を改善せずに連続して養殖を行うことになり、池の中にPRDVが残りやすいと考えられる。したがってPAV対策の一斉休業、一斉消毒の効果が充分期待できなくなると予想されたためである。

これらの対策の結果、熊本県におけるPAVの被害尾数は93年が3,800万尾、94年が1,000万尾、95年が250万尾と減少し、生産量は1993年にPAVが発生し150トンに激減した後、94年230トン、95年400トンと再び増加傾向を示している。(図6)

一方全国のPAV被害は、発生地域が西日本から東日本へと拡大する傾向にあり、さらに種苗生産場での発病が確認されるなど、病勢は弱まっていない。したがって熊本県におけるPAV被害の減少とそれに伴う生産量の

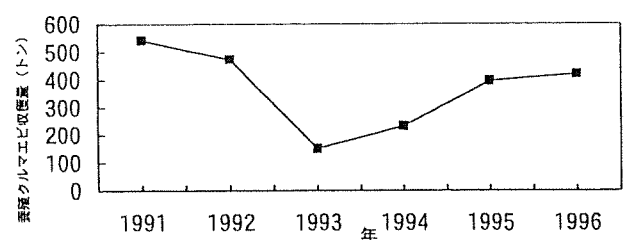


図6 1991年以降の熊本県における養殖クルマエビ収穫量の推移

回復は、熊本県においてとられた対策の効果と推察できる。

当初、半築堤式クルマエビ養殖場が密集する地区では、PAV対策は困難であると考えられていた。しかしながら本研究に基づいてとられた対策で半築堤式クルマエビ養殖場が密集する地区でも生産が回復したことは、構造的に開放的な養殖場でも今回実施された一連の防疫対策の効果が発証されたと考える。今後、海産養殖魚の防疫対策において本研究が参考となれば幸いである。

引用文献

- Baozhen, P., R. Jiaming, S. Juying, Z. Guoying, G. Huiting, S. Yalin, Z. Guoxing and G. Zuxum (1995): The studies on baculovirus-caused disease of prawns (*Penacus chinensis* OSBECK) in Shanghai suburb. *Chinese Journal of Virology*, **11**, 151-157.
- Chou, HY., CY. Huang, CH. Wang, HC. Chiang and CF. Lo (1995): Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **23**, 165-173.
- Inouye, K., K. Yamano, N. Ikeda, T. Kimura, H. Nakano, K. Momoyama, J. Kobayashi and S. Miyajima (1996): The Penaeid Rod-shaped DNA Virus (PRDV), which causes Penaeid Acute Viremia (PAV). *Fish Pathol.*, **31**, 39-45.
- 木村武志・山野恵祐・中野平二・桃山和夫・平岡三登里・井上潔 (1996): PCR法によるPRDVの検出。魚病研究, **31**, 93-98.
- Wolf, K (1988): Infectious hematopoietic necrosis. In "Fish viruses and fish viral diseases" Corenell University Press, Ithaca and London, 105 p.
- Wongteerasupaya, C., J. E. Vickers, S. Sriurairatana, G. L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul and T. W. Flegel (1995): A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 69-77.
- Zhan, W., K. Yu and Q. Meng (1995): Study on baculovirus disease of *Penaeus chinensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, **2**, 22-28.

謝 辞

本研究をまとめるにあたり、終始ご指導とご鞭撻を賜るとともに御校閲をいただいた東京水産大学資源育成学科教授 福田穎稔博士に深甚なる謝意を表します。また、御校閲を頂いた東京水産大学資源育成学科教授 竹内俊郎博士、同教授 岡本信明博士、同助教授 羽曾部正豪博士、水産庁研究指導課研究管理官 井上 潔博士に謝意を表します。

山口県内海水産試験場環境生物科長 桃山和夫博士からは懇明なるご助言を頂いた。ここに記して厚くお礼申し上げます。

本研究の当初から研究上のご指導と種々のご配慮、さらには暖かい激励を賜った水産庁瀬戸内海区水産研究所企画連絡室長 乾 靖夫博士、並びに水産庁養殖研究所の職員の方々に厚くお礼申し上げます。

また研究の機会を与えられた熊本県水産研究センター 中村郁也前所長に厚くお礼を申し上げます。また本研究遂行にあたってご助言、ご協力いただいた熊本県水産研究センター職員の方々に厚くお礼申し上げます。特に現熊本県水産振興課漁業指導係長 河邊 博氏、参事 木村武志氏、養殖研究部主任技師 鮫島 守氏には実験の実施に際しご協力を頂いた。厚くお礼申し上げます。

学会誌等への発表論文

1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死：発生状況および感染実験

中野平二・河邊 博・梅沢 敏・桃山和夫
平岡三登里・井上 潔・大迫典久
魚病研究、29 (2)、135-139 (1994).

1993年に発生した養殖クルマエビの大量死について疫学的調査と感染実験を行った。大量死の発生は西日本の6県に及び、中国産種苗の輸入と密接に関連していた。病原体検査の結果、寄生虫や真菌は検出されず、一部に細菌が検出される個体もあったが、これらは本大量死の主原因とは考えられなかった。病死エビの磨砕ろ液接種により病気が再現された。これらの結果からろ過性病原体が本大量死の原因であることが示唆された。

1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死：電顕観察による原因ウイルスの検出

井上 潔・三輪 理・大迫典久・中野平二
木村武志・桃山和夫・平岡三登里
魚病研究、29 (2) 149-158 (1994).

大量死したクルマエビの自然発症および実験感染試料の電顕観察により、いずれの個体からも、エンベロープを持ち、ヌクレオカプシッドが約 84×226 nmの桿状核内ウイルスが検出され、本ウイルスが死亡原因と考えられた。当該ウイルスは封入体を形成せず、核内で増殖することなどからゲノム核酸はDNAと考えられ、ビリオンの形態や大きさからバキュロウイルス科あるいはポリドナウイルス科に属する新しい病原ウイルスと推測された。

養殖クルマエビの“RV-PJ感染症”原因ウイルスの精製

木村武志・中野平二・桃山和夫
山野恵祐・井上 潔
魚病研究、30 (4)、287-288 (1995).

養殖クルマエビの“RV-PJ感染症”原因ウイルスを精製するため、実験感染個体の血液を用い25~50%ショ糖連続密度勾配中に明瞭なバンドが形成され、このバンドの電子顕微鏡観察により、大きさ約 400×150 nmの桿状のウイルスビリオンがほぼ純粋に観察され、ヌクレオ

カプシッドおよび空のカプシッドもみられた。このことから、連続密度勾配遠心法により、病エビ血液から“RV-PJ”をほぼ純粋に精製できることが明らかになった。

1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死：病理組織観察

桃山和夫・平岡三登里・中野平二
河邊 博・井上 潔・大迫典久
魚病研究、29 (2)、141-148 (1994).

自然発症（中国産および日本産種苗とも）と実験感染個体との間に症状の差は特に認められなかった。病理組織学的には皮下組織をはじめとする中・外胚葉起源の様々な組織における種々の細胞の核の肥大と無構造化を伴う細胞の変性によって特徴づけられた。本疾病はクルマエビ類の新しい疾病であると考えられ、その原因としてはろ過性病原体が疑われた。中国から着荷した梱包から直接採材された個体にも同様の病変が観察された。

クルマエビの“RV-PJ”の診断方法

桃山和夫・平岡三登里・井上 潔
木村武志・中野平二
魚病研究、30 (4)、263-269 (1995).

“RV-PJ感染症”の暗視野顕微鏡による簡易診断ならびに透過電顕による確定診断法を検討した。暗視野では、ウイルス粒子は血リンパ中に約 $0.5 \mu\text{m}$ の多数の微粒子として観察され、胃上皮層の感染核は $10 \sim 15 \mu\text{m}$ の円形ないし楕円形の輪郭明瞭で無構造の白色物体として、電顕では、血リンパまたは胃上皮を材料としたネガティブ染色法により、ウイルス粒子は約 400×150 nmのビリオンまたは約 390×85 nmのカプシッドとして観察された。

クルマエビ類の急性ウイルス血症（PAV）の原因ウイルス PRDV（Penaeid rod-shaped DNA virus）

井上 潔・山野恵祐・池田訓茂・木村武志
中野平二・桃山和夫・小林 淳・宮嶋成壽
魚病研究、31 (1)、39-45 (1996).

“RV-PJ”の形態とウイルス核酸の特性を検討した。

ビリオンは桿状のヌクレオカプシドとエンベロープで構成され、ゲノム核酸は分節のない163kbpの二本鎖DNAであった。これらの性状から、従来であれば“RV-PJ”はNudibaculovirinae亜科に属する。しかし、ウイルス分類国際委員会の分類表第6版(1995)は、本亜科のメンバーを未分類種にしている。従って分類が確定するまで、本ウイルス名としてPRDVを再提案する。また本症をPAVと呼称したい。

PCR法によるPRDVの検出

木村武志・山野恵祐・中野平二

桃山和夫・平岡三登里・井上 潔

PRDV (penaeid rod-shaped DNA virus) DNAの塩基配列を部分的に決定し、PCRに用いる2組の検出用プライマー(P1~P4)を作成した。PRDV遺伝子は2組のプライマーにより増幅され、P1とP2によるPCR産物をさらにP3とP4によるPCRに用いることにより、より高感度な検出方法が確立された。この方法で、病徴の観察されない実験感染クルマエビ、感染エビの排泄物、また本症の発生した養殖池内の他の甲殻類からもPRDV遺伝子が検出できた。

魚病研究, 31 (2), 93-98 (1996)

クルマエビ類の急性ウイルス血症 (PAV) の原因ウイルス PRDV の不活化

中野平二・平岡三登里・鮫島 守

木村武志・桃山和夫

PRDVの化学的・物理的不活化条件について検討した。PRDVは有効塩素濃度1mg/l 10分間、有効ヨウ素濃度2.5mg/l 10分間、残留オキシダント0.62mg/l 1分間、エタノール30%1分間、ホルマリン5g/l 10分間、塩化トリメチルアンモニウムメチレン25mg/l 10分間、炭酸ナトリウム過酸化水素付加物5,000mg/l 60分間、食塩25%24時間およびクロロフォルム処理によって不活化された。また、50°C 60分間の加熱、3時間の乾燥、 $1 \times 10^4 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ の紫外線照射によって不活化された。

魚病研究, 33 (2), 65-71 (1998)

