

(技術名) 養殖ゴカイの高精度ウイルススクリーニング技術							
(要約) <u>ゴカイ</u> は、クルマエビの種苗生産を行う上で、必要な産卵催熟餌料であるが、クルマエビの大量斃死を引き起こす急性ウイルス血症 (PAV) の媒介者である。ゴカイからPAVウイルスを検査する手法の開発を行い、 <u>ウイルスフリーゴカイ</u> の生産を可能とする。							
海洋深層水研究所					連絡先	098-896-8655	
部会名	水産業	専門	養殖	対象	イソゴカイ	分類	指導
普及対象地域							

[背景・ねらい]

ゴカイは、クルマエビの種苗生産を行う上で、産卵催熟餌料として必要である。しかし、これまで国内の種苗生産機関で利用されてきた国内外産のゴカイは、クルマエビの大量斃死を引き起こすクルマエビ急性ウイルス血症 (PAV) の媒介者 (ベクター) として知られている。このため、ウイルスフリーゴカイの作出が必要とされているが、国内では専門の研究者がおらず、検査手法すら確立されていなかった。クルマエビの PAV 検査手法および海外で行われている手法を参考にして、ゴカイから PAV 感染可能性がある個体を高精度に検出する手法を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. 人工授精を行った親ゴカイのペアを1検体としてDNA抽出を行う (図1)。本研究では、第一世代を生んだ親36ペア、ウイルスフリー第一世代 (第二世代を生んだ親) 2ペアの検査を実施した。
2. PCRの条件は、クルマエビのPAV検査において偽陽性が生じることがわかっているため、3種類のNested-PCR条件により検査を行う (表1)。以下の現実的に有効と考えられる検査手法3種類を選定し、検査を行った。①国際獣疫事務局 (OIE) および国立研究開発法人水産研究・教育機構が推奨している方法 (以下、OIE法)、②OIE法を改良したシャトルPCR法、③インドネシアのウシエビ養殖場のゴカイから検査した方法 (以下、Desrina法)。
3. 第一世代36ペア中1ペアにおいて、OIE法の条件によりウイルスの存在を疑わせるPCR産物の増幅が確認された (表2)。
4. 第一世代でPCR産物の増幅が確認されなかったゴカイを親として生育し、第二世代を生産したゴカイ (2ペア) を検査したところ、PCR産物の増幅は確認されなかった (表2)。これにより、ウイルスフリーゴカイの作出に成功したと考えられる。

[成果の活用面・留意点]

1. クルマエビの種苗生産において、ウイルスフリーのゴカイを用いることにより、ゴカイを媒介者としたPAV感染を抑制することが可能となる。
2. 養殖現場において中国産および日本本土産のゴカイは、疾病等を持ち込むリスクが高いため、スクリーニングを行ったゴカイのみを県内に持ち込むような体制整備を推奨したい。

[具体的データ]



図1. イソゴカイから DNA 抽出用の肉片を切り出している様子。

表1. 検査に用いたプライマーリスト

方法名	プライマー名	塩基配列	ステップ数	参考論文等
①OIE法	146F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG	1 回目	OIE, 2017
	146R1	TAATGCGGGTGAATGTTCTTACGA	1 回目	OIE, 2017
	146F2	GTAAGTCCCCCTTCCATCTCCA	2 回目	OIE, 2017
	146R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT	2 回目	OIE, 2017
②シャトルPCR法	P1	ATCATGGCTGCTTCACAGAC	1 回目	Kimura et al 1996
	P2	GGCTGGAGAGGACAAGACAT	1 回目	Kimura et al 1996
	P3	TCTTCATCAGATGCTACTGC	2 回目	Kimura et al 1996
	P4	TAACGCTATCCAGTATCACG	2 回目	Kimura et al 1996
③Desrina法	VP28-F1	CACAACACTGTGACCAAG	1 回目	Desrina et al., 2012
	VP28-R1	TTTACTCGGTCTCAGTGCCAG	1 回目	Desrina et al., 2012
	VP28-F1 nested	CATTCTGTGACTGCTGAGG	2 回目	Desrina et al., 2012
	VP28-R1 nested	CCACACACAAAGGTGCCAAC	2 回目	Desrina et al., 2012

表2. 検査結果

PCR条件	AP3	AP4	AP5	AP6	AP7	AP8	AP9	AP10	AP11	AP12	AP13	AP14	AP15	AP16	AP17	AP18	AP19	AP20	AP21
①OIE法	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
②シャトルPCR法	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
③Desrina法	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCR条件	AP22	AP23	AP24	AP25	AP26	AP27	AP28	AP29	AP30	AP31	AP32	AP33	AP34	AP35	AP36	AP37	AP38	AP201	AP202
①OIE法	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
②シャトルPCR法	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
③Desrina法	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

AP3～38は第一世代を生んだ親の雌雄ペア。AP201と202は第二世代を生んだ親の雌雄ペア。
-は、PCR産物の増幅が確認されず、+は増幅が確認されたことを表す。

[その他]

課題ID: 2017深001

研究課題名: クルマエビ種苗生産・養殖技術高度化試験

予算区分: 県単

研究期間(事業全体の期間): 2017～2018年度(2017～2019年度)

研究担当者: 照屋清之介、荒井政年、石川貴宣

発表論文等: 照屋清之介ら(2019)沖縄深層水研報、No. 19(投稿準備中)