

魚類等防疫対策試験*1

杉山昭博・蔵下 環

1. 目的

魚介類の種苗生産、養殖時に発生する疾病を調査研究して有効な対策を検討する。そして、安定した生産体制の確立をはかる。

2. 方法

- (1) 平成9年度魚病診断状況
水産試験場で検査した検体の主なものを記載する。
- (2) クルマエビ類の急性ウイルス血症 (PAV) の診断方法の検討 (PCR法)
 - 1) 平成8~9年度にかけて親エビ、種苗、養成エビ、及びヘドロからPAV原因ウイルス (PRDV) の検出をPCR法を用いて行った。
 - 2) PCRに用いる検体量と、1ステップ法と2ステップ法 (Nested PCR) の感度を比較検討した。
 - 3) 陰性検体混入の影響試験：数尾をプール検査して、陰性検体の混入が検査結果にどのように影響するかを検討した。
 - 4) 検査部位の検討：胃上皮、歩脚、遊泳脚、及び筋肉を用いてPCR検査が可能かどうか検討した。

- 5) 核酸抽出方法の検討：市販キット3種類とNested PCR法プライマー2組を組み合わせで比較検討した。

3. 結果

- (1) 平成9年度魚病診断状況
結果は表1-1、1-2に示すとおりである。
- (2) クルマエビ類の急性ウイルス血症 (PAV) の診断方法の検討 (PCR法)
 - 1) 親エビ3尾と養成エビ2尾に陽性反応が見られた (表2)。
 - 2) PCR検査のための試料はおよそ10~60mg程度が良く反応し、またNested PCR法の感度が良かった (表3、写真1)。
 - 3) 陰性検体混入の影響試験：陽性エビ1尾に対して陰性エビが12尾混入しても、十分陽性反応を観察できた (表4)。
 - 4) 検査部位の検討：歩脚、遊泳脚でも陽性反応が観察され、胃上皮だけでなくこれらの検体での検査も可能であることが分かった (表5)。
 - 5) 核酸抽出方法の検討：いずれも有為な差はなかった (表6)。

*1：県単独事業

表1-1 平成9年度病診断状況(魚類)

月日	魚種	魚体重 (g)	尾叉長 (mm)	特記事項	備考
4/9	ヒラメ	47~54	166~176	無眼側腹部出血	白点病
4/23	ヤイトハタ	172~215	210~230	眼球白濁、体表粘液過多	不明
5/1	マダイ	0.22~1.13	23~40	大量斃死	不明
5/9	シマアジ	1.44~2.34	45~55	斃死	連鎖球菌症
5/14	マダイ	62~89	142~167	斃死	不明
6/30	チャイロマルハタ	0.52~0.69	34~37	斃死	不明
7/1	カンバチ	8.49~18.7	87~100	尾鰭欠損	滑走細菌症
7/3	カンバチ	11.0~22.5	87~112	尾鰭欠損	滑走細菌症
7/7	ヤイトハタ	0.66~1.65	-	尾鰭欠損	滑走細菌症
7/14	カンバチ	17.1~21.1	101~110	尾鰭欠損	滑走細菌症
7/18	スギ	4.4~9.3	116~135	脾臓肥大	イリドウイルス病
7/18	マダイ	14.4~37.7	95~118	体表スレ	-
8/1	クロマグロ	-	-	体表スレ	-
8/5	ヤイトハタ	6.3~11.0	76~87	斃死	白点病
8/11	ヤイトハタ	6.3~9.4	76~86	斃死	イリドウイルス病
8/11	チャイロマルハタ	148	227	斃死	イリドウイルス病+白点病
8/13	カンバチ	22.3~66.2	-	尾鰭欠損	滑走細菌症+白点病
8/29	マダイ	16.8~77.2	91~320	体表粘液過多	イリドウイルス病
9/8	マダイ	58~148	135~193	斃死	イリドウイルス病
9/25	ヤイトハタ	29.6~55.5	143~148	斃死	イリドウイルス病+白点病
9/26	ヤイトハタ	7.7~9.6	83~92	斃死	イリドウイルス病+白点病
10/1	マダイ	691~806	320~328	斃死	イリドウイルス病+白点病
10/3	ヤイトハタ	27.8~59.6	117~154	斃死	イリドウイルス病+白点病
10/8	ヒラメ	465~510	355~375	背鰭出血、体表粘液過多	白点病+腎臓大
10/13	ヤイトハタ	44.5~65.8	132~155	斃死	イリドウイルス病+白点病
10/16	スギ	1.7~2.7	82~99	斃死	ピブリオ病
10/22	ヤイトハタ	36.1~74.5	135~162	斃死	イリドウイルス病+白点病
10/22	マダイ	132	177	斃死	イリドウイルス病+白点病
11/4	スギ	1.6~3.1	85~98	斃死	不明
11/7	シマアジ	52~54	141~142	斃死	連鎖球菌症
11/19	ブリ	1086	400	尾鰭先端出血、鰓蓋裏側出血	イリドウイルス病
11/21	ブリ	990~1296	382~400	腸管炎症、脳内炎、腹腔内出血	白点病+単生類
11/21	マダイ	70.0~165.2	138~186	斃死	イリドウイルス病
11/27	マダイ	344~463	128~298	体表粘液過多、出血	白点病
11/27	ブリ	809	370	斃死	白点病
12/25	クロマグロ	1760~2310	430~460	脳内出血、鰓蓋裏側出血	連鎖球菌症+イリドウイルス病
1/20	ヤイトハタ	129~181	200~216	体表腹部潰瘍	不明
1/23	マダイ	2.1~3.7	48~56	体表表皮剥離	白点病
2/10	ヒラメ	8.7~16.8	93~120	体表円形出血、表皮剥離、鰓出血	繊毛虫症
2/10	スギ	34.9~53.6	188~225	体表汚れ、腸管充血	不明
2/11	スギ	34.2	188	後頭部潰瘍	エドワードジエラ症
2/16	マダイ	3.0~7.8	57~71	体表表皮剥離	不明
2/18	マダイ	14.7	84	頭部表皮剥離	滑走細菌症
2/19	ヤイトハタ	77~243	162~235	尾鰭欠損	滑走細菌症
2/25	ヤイトハタ	162~297	208~240	斃死	不明
3/27	ヤイトハタ	136~273	192~255	眼球白濁、周辺部充血	不明

表1-2 平成9年度魚病診断状況(クルマエビ)

月日	体重(g)	特記事項	親由来	PAVチェック (陽性数/検体数)	備考
4/8	18.7~23.2	鯉褐変		0/5	繊毛虫症
4/8	P	自家生産種苗		0/3	-
4/10	73.3~149	母エビ(10尾)		0/10	-
4/25	Z、血液	自家生産種苗	佐伯	0/8	-
4/28	43.5~110.4	自家生産種苗	延岡	0/20	-
5/6	86~187	母エビ(24尾)	佐伯、延岡	1/24	PAV(+)
5/6	23.2~139	母エビ(11尾)、養成エビ		0/12	-
5/7	Z1、P5~7、血液	自家生産種苗	延岡	0/10	-
5/8	58~103	母エビ(12尾)		0/12	-
5/15	70~115	母エビ(23尾)		0/12	-
5/19	P7~19	自家生産種苗		0/6	-
5/29	65~105	母エビ(10尾)	延岡	0/5	-
5/29	44~110	母エビ(20尾)	長崎、延岡	0/10	-
5/29	P	自家生産種苗	長崎、延岡	0/6	-
6/3	58~89	母エビ(3尾)	長崎	0/6	-
6/9	Z、M	自家生産種苗	長崎	0/3	-
6/12	P5~10	自家生産種苗		0/4	-
6/16	P17~18	購入種苗		0/2	-
6/16	P1~2	自家生産種苗	長崎	0/2	-
6/16	P7~9	自家生産種苗	長崎	0/2	-
6/16	P	自家生産種苗		0/6	-
6/19	P4~8	自家生産種苗		0/20	BMN(-)
6/19	P	自家生産種苗		0/6	-
6/19	P	自家生産種苗		0/4	-
6/19	45~128	母エビ(17尾)		0/6	-
6/20	P	自家生産種苗		0/6	-
6/24	P5	自家生産種苗		0/3	-
7/2	P20	自家生産種苗		0/4	BMN(-)
7/2	P	自家生産種苗		0/3	-
7/11	P	自家生産種苗		0/4	-
7/14	P7~8	自家生産種苗	長崎	0/3	-
7/19	0.51~1.03	稚エビ		0/5	ビブリオ病
7/20	P	自家生産種苗		0/4	-
7/25	P	自家生産種苗		0/3	-
7/28	51.1~95.9	母エビ(19尾)	佐伯	2/10	PAV(+)
7/31	P	自家生産種苗		0/7	-
8/4	Z、稚エビ	自家生産種苗		0/4	-
8/4	45.6~150.9	母エビ(20尾)		0/10	-
8/22	55.9~113.4	母エビ(21尾)	長崎	0/7	-
8/26	49.4~133.6	母エビ(33尾)	延岡	0/11	-
9/12	P	自家生産種苗		0/6	-
10/1	9.9~14.5	養成エビ		0/5	-
10/8	11.2~14.4	養成エビ		0/5	-
10/14	10.6~21.0	養成エビ		0/9	繊毛虫症
11/4	9.6~24.1	養成エビ		0/9	ビブリオ病
12/25	14.5~29.8	養成エビ		0/8	-
1/27	9.0~16.8	養成エビ			フサリウム症
1/31	11.4~47.5	養成エビ		1/20	PAV(+)
3/9	13.6~26.9	養成エビ			繊毛虫症

表2 沖縄県内におけるPAV検査状況（平成8～9年度）

	検査例数	検査個体 (サンプル) 数	陽性数 (率、%)
親エビ	21	280	3(1.1)
種苗	32	(149)	0
養成エビ	18	303	2(0.7)
ヘドロ	2	(12)	0

表3 PCR感度試験

PCR No.	検査量 (mg)	判定結果	
		1回目	Nested
1	230	—	±
2	150	—	±
3	60	+	+
4	10	±	+

表4 陰性検体（妨害物質）混入の影響

PCR No.	陽性エビ 検査量 (mg)	陰性エビ 検査量 (mg)	判定結果
1	1	0	—
2	5	0	—
3	10	0	+
4	50	0	+
5	90	0	+
6	10	60	+
7	10	120	+
8	10	240	—

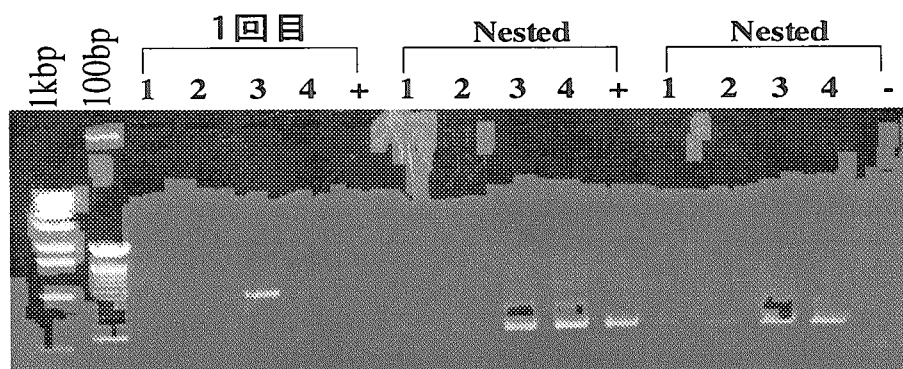


写真1 PCR感度試験

表5 検査部位の比較

PCR No.	検査材料	検査量 (mg)	判定結果
1	歩脚	10	+
2		40	+
3		70	+
4	遊泳脚	20	+
5		50	+
6		100	+
7	筋肉	10	w
8		90	w
9		500	w
10	胃上皮	10	+
11		30	+

w : 弱陽性

表6 核酸抽出法の比較

個体 No.	市販キット名	Isogen		DNA zol		Pure Gene	
	プライマー種類	A	B	A	B	A	B
1		0/5*	0/5	0/5	0/5	0/2	0/5
2		0/5	0/5	1/5	1/5	0/2	0/5
3		0/5	0/5	0/5	0/5	0/2	0/5
4		0/5	0/5	0/5	0/5	0/2	2/5
5		2/5	0/5	1/5	0/5	1/2	0/5
6		0/5	0/5	0/5	0/5	0/2	0/5
7		0/5	0/5	0/5	0/5	0/2	0/5
8		0/5	0/5	1/5	0/5	0/2	0/5
9		1/5	0/5	0/5	0/5	0/2	0/5
10		0/5	0/5	0/5	0/5	0/2	0/5

A : Nested PCR法プライマー (木村等、1996) 、 B : Nested PCR法プライマー (Takahashi et al., 1997)

* : 陽性数/検査数