

本申し合わせ事項は、平成11年に日本栽培漁業協会（当時）が策定した申し合わせ事項の修正案を水産総合研究センターが作成し、平成19年度栽培漁業ブロック会議において協議し了承されたものである。

## 防疫的見地からみた

### 放流種苗に関する申し合わせ事項（I）

栽培漁業技術開発推進事業全国協議会

太平洋北ブロック協議会・太平洋中ブロック協議会

日本海ブロック協議会・瀬戸内海ブロック協議会

九州、南西諸島ブロック協議会

平成11年3月  
(平成19年12月修正)

## 防疫的見地からみた放流種苗に関する申し合わせ事項（I）について

我が国の沿岸漁業は、資源の減少による漁獲量の減少や魚価の低迷など、厳しい局面にあることから、その振興施策としての栽培漁業の重要性は年々大きくなってきている。特に減少した資源を回復させるための直接的な方法として、種苗放流が沿岸漁業生産に占める地位は着実に向上してきている。

しかし、その一方で、種苗生産現場ではウイルス性神経壊死症（VNN）およびクルマエビ類の急性ウイルス血症（PAV）等の被害の大きいウイルス性疾病が問題となり、栽培漁業を展開していく上で大きな障害となっている。現在、これらの疾病防除に関する技術開発が進みつつある。その一方で、各種苗生産機関からは罹病歴のある種苗放流の可否について問い合わせがなされ、責任ある栽培漁業を推進するためにも、放流種苗による天然海域への病原体の拡散を防止する義務がある。

種苗生産現場における防疫技術の現状と評価（参考資料）に述べたように、現段階では病原体を保有する種苗が生態系にどのような影響を及ぼすかについて知見は少なく、生産された種苗の放流の可否についてのガイドラインを作成することは困難であると考えられる。このため、今回は、将来のガイドライン作成のための第一歩として、放流される種苗が具備すべき条件についての考え方を整理する目的で申し合わせ事項を作成した。

本申し合わせは、現在明らかにされている知見の範囲内で、種苗生産・放流の現場において実行可能な事項を整理したものである。今後、新たな研究・技術開発の知見が得られた場合には、逐次改訂を行う必要があり「防疫的見地からみた放流種苗に関する申し合わせ事項（I）」とした。

なお、本申し合わせは、各機関が、上記の主旨を踏まえて種苗放流を実施する際の判断の参考とするためのものである。

（平成11年3月 策定）

平成19年度水産業関係研究開発推進会議栽培漁業関係研究開発推進特別部会栽培漁業ブロック会議（太平洋北ブロック、太平洋南ブロック、日本海北・西ブロック、瀬戸内海ブロック、九州西ブロック）で関係都道府県の下承が得られたので一部修正した。

## I 飼育管理技術による疾病防除対策

感染症は、種苗（宿主）と寄生体のバランスがくずれた結果として起こる。種苗が本来持っている生体防御機能を効率的に引き出すため、日常の飼育管理を充実することにより、放流種苗の良好な健康状態を維持する必要がある。

### (1) 良質な飼餌料の確保

仔稚魚の飼育過程における減耗要因として、給餌する飼餌料の質に原因が疑われる飼育事例があり、良質な飼餌料の確保に努めなければならない。

- 1) ナンノクロブシス、テトラセルミス、珪藻類およびワムシ等の生物餌料を使用する場合は、順調に増殖している状態のものを使用する。
- 2) 栄養強化および給餌は、生物餌料の活性に影響を与えない水温範囲内で行う。特に、ワムシおよびアルテミア幼生の栄養強化を実施する場合、収容密度、栄養強化剤の添加量と処理時間に留意する。
- 3) 生物餌料は、清浄な海水で洗浄した後、給餌する。
- 4) 配合飼料、生餌の保管は適正な施設内で行い、変質のおそれのあるものは使用しない。
- 5) 給餌する飼餌料は、種苗の成長に合わせて適正な種類およびサイズを選定する。

### (2) 適正な飼育環境の確保

種苗生産の基本は健康な種苗を生産することにある。このため、仔稚魚の飼育環境を良好に保つことが重要である。

- 1) 飼育施設は使用前には消毒を実施し、飼育施設や用具は清浄な状態を保つ。
- 2) 飼育槽内全体に水がまわるよう注水、通気および排水方法を検討し、適正な換水を行う。
- 3) 飼育管理の指標となる水質項目については定期的に測定し、適正な水質下での飼育を行う。
- 4) 常に水槽底の状態を観察し、定期的に死魚、残餌および糞等を除去する。
- 5) 種苗の特性を理解し、種苗ごとに適正な密度で飼育する。
- 6) 用水はろ過あるいは殺菌処理を施し、清浄な海水を使用する。

### (3) 種苗の健康管理

一般に生物はストレスを受けると生体防御能が低下することが知られており、種苗に過度のストレスを与えないようにすることは重要である。

- 1) 飼育期間中に同一水槽および小割生簀内で種苗間に成長の差が生じた場合、種苗の大きさをそろえるため、適度な間隔で選別を行う。
- 2) 他の水槽あるいは海面小割生簀へ種苗を移動させる場合、事前に飼育環境（水温等）への馴致期間を設ける。
- 3) 飼育担当者は種苗の特性をよく理解し、頻繁に行動観察を行う。
- 4) 不健康な種苗の早期発見に努め、死亡魚や異常行動を示す種苗はすみやかに飼育槽内から除去する。

### (4) 種苗の取り揚げおよび輸送に関する留意点

輸送直後に種苗の死亡が増加したり、疾病が発生することがある。種苗の取り揚げ、計数および輸送について十分な配慮が必要である。

- 1) 取り揚げおよび計数は慎重に行い、種苗の特性に充分配慮し、ストレスが少なくと考えられる方法を選択する。
- 2) 輸送水槽、用具は使用前後に消毒を実施する。
- 3) 輸送前には、餌止めを行う。
- 4) 種苗の特性や輸送距離に合わせて収容密度や輸送の方法を選択する。

## II 病原体の蔓延防止対策

ひとたび疾病が発生した場合は、その病原体が環境に拡散することを防止することは種苗生産機関の義務である。以下に、現在の技術レベルで成しうる措置を示す。

### (1) 診断および連絡体制

疾病が疑われる死亡が認められた場合は、原因を究明するための診断を早急に実施し、病原体を確定させるべく努力をする。基本的に、既往の病原体の診断は各都道府県において行う。被害が大きいと想定される危険な疾病について、都道府県での連絡体制は、行政、種苗生産機関および水産試験場の魚病担当者と協議し、整える。

なお、発生事例については、水産増養殖関係研究開発推進特別部会「魚病部会」傘下の「種苗期疾病連絡協議会」が実施している種苗期疾病情報としてとりまとめ、今後の防疫に役立てる。

### (2) 死亡魚の処分

死亡魚および病魚は主な伝染源となるので、慎重な取り扱いが必要である。死亡後浮上している魚については、柔らかいネット等で丁寧に取り除く。水槽底部に沈下した死亡魚については、傷つけないように注意してサイフォンにより底掃除で吸い取る。

特に、高水温の飼育条件下では、死亡魚の分解が早く進行することから、すみやかに死亡魚を水槽から取り除く。

死亡魚および病魚の処理法として、煮沸、薬剤および焼却などによつて的確に処理することが必要である。また、採取に使用した器具類も薬剤で消毒する。

### (3) 発病群の移動の禁止

他の地域への病原体の伝播を防止することは重要である。特に伝染性の強い疾病（PAV, VNN 等）には充分留意する。このため、飼育時において異常死亡魚が継続して見られる群については移動しない。

#### (4) 日常の衛生管理の徹底

病原体の伝播は卵，種苗，飼育器具等や作業者の移動などによって起こる。まず，種苗生産施設では常に清潔な飼育環境を維持することが重要である。

また，病原体を飼育施設に持ち込まないことを防疫の基本とし，感染の機会を少なくする努力が必要である。人が病原体を伝播することによって起こる感染を防止するため，仔稚魚を生産する水槽は，可能な限り他の施設と隔離し，飼育水槽への立ち入りは専任の飼育管理者以外は規制する必要がある。飼育管理者は，飼育施設に入る場合は，手および長靴を消毒する。また，不必要な器具は持ち込まないように規制することが必要である。

#### (5) 種苗生産台帳の記入

疾病発生の要因の解明および診断に資するため，種苗生産記録を必ず作成し，保管する。記録には，親魚の来歴，種苗生産，中間育成および放流状況等の項目を設け記載する（種苗生産期における VNN の防疫対策に関する担当者会議資料を参照）。

#### (6) 消毒に関する留意事項

##### 1) 消毒剤の使用上の注意

- ① 消毒剤には，魚に対する毒性が強い薬剤が多い。また，環境および人にも大きな影響を及ぼすと考えられるものもあるので，使用には十分な注意が必要である。
- ② 消毒対象物および使用場所に応じて，消毒剤の種類および消毒法を選定する。
- ③ 消毒剤の病原体への作用機序を理解し，人体および水産生物への影響を念頭に消毒を実施する。
- ④ 使用に当たっては消毒剤の用法・用量を守り，過剰な使用をさける。
- ⑤ 使用に際しては，マスク，ゴム手袋，メガネおよび合羽を着用し，薬剤が身体に付着しないようにする。
- ⑥ 薬剤はその都度調製し，保存は低温遮光，暗所，密封などそれぞれの薬剤に応じた方法で行う。さらに，使用後の薬液の廃棄には十分に留意し，分解あるいは中和が必要な薬剤については，適宜処理して廃棄する。

## 2) 消毒剤の留意点

- ① 塩素系消毒剤（次亜塩素酸ナトリウム、次亜塩素酸カルシウム）の殺菌作用はいずれも酸化作用によるもので、消毒効果は温度、pH および対象物の有機物量によって大きく変動する。塩素系消毒剤では、皮膚刺激性および腐食性が強いいため、皮膚に付着した薬剤は、直ちに水で洗い流す。また、塩素系消毒剤は極めて魚に対する毒性が強いため、飼育用水への混入には厳重に注意する。廃液はチオ硫酸ナトリウム（ハイポ）で中和する。次亜塩素酸カルシウムは汚染された排水の消毒に、次亜塩素酸ナトリウムは水槽および器具等の消毒に用いる。
- ② 逆性石鹼（塩化ベンザルコニウム液）は、有機物および金属イオンの影響によって効力が低下するため、2〜3日で交換する。普通の石鹼と併用すると効果がなくなる。手指および器具等の消毒に適する。
- ③ アルコール系薬剤（エタノールなど）は、手指および小型の実験器具の消毒に適する。
- ④ 飼育用水および排水の消毒では、主に紫外線およびオゾンが用いられている。紫外線は海水中の懸濁物、有機物および鉄イオンにより効力が低下するため、使用に際しては注意する必要がある。オゾンには残留オキシダントの生物に対する強い毒性が報告されており、この点については十分注意を払う必要がある。

### Ⅲ 放流種苗の取り扱いに関する留意事項

#### 1. 基本的な考え方

- (1) 種苗生産過程で多くの疾病が発生し、種苗生産施設および天然海域への病原体の拡散が懸念される。このため、病原体の伝播を防止する措置が必要である。
- (2) 種苗生産機関は、健全な飼育群を放流するように努め、放流種苗が具備すべき条件として、危険な病原体を保有していないことを原則とする。
- (3) これまでに得られた研究成果によると、一部の疾病（VNN, PAV 等）については種苗における病原体の保有状況のある程度診断することは可能である。しかし、多くの疾病では、微量の病原体の保有の有無についての診断は困難である。また、診断方法および診断結果の評価に関しても問題が残されている。
- (4) また、病原体を保有する放流種苗が、新たな感染源になりうる可能性もあり、今後、放流種苗における病原体の消長および野生生物への感染の可能性等についての科学的な知見を収集するとともに、その実態の解明を急ぐ必要がある。
- (5) かかる観点から、当面、放流種苗の具備すべき条件として、危険な病原体を保有していないことを原則とし、その症状や異常死亡の有無等を含めて放流の可否を総合的に判断することとする。

## 2. 当面の放流種苗の取り扱い

- (1) 天然海域への病原体の拡散を防止することを基本理念とする。
- (2) しかし、放流種苗の可否については、診断設備や診断技術が各機関により異なるため、現時点では、死亡状況および症状により、以下にとりまとめた基準を参考に判断し、健全と判断される種苗を放流する。
- (3) 放流種苗の具備すべき条件は、病原体の検出技術、各種苗生産機関の体制および放流事業の社会的な重要性等が変化した場合は、適宜その内容を見直し、その高度化を図ることとする。
- (4) 当面は高い死亡率をもたらす危険度の高い疾病について、以下にその取り扱いの基準を示した。

### 1) 特定疾病及び新疾病（持続的養殖生産確保法第2条及び第12条）

取り扱い：特定疾病又は新疾病が発生した又は発生した疑いがあると判断した場合には、特定疾病等対策ガイドライン（平成17年10月21日付け17消安第7497号消費・安全局通知）（平成19年12月最終改正）に従って対応する。

### 2) 危険度の高い疾病（高い死亡率をもたらす疾病）

① 放流直前（10日間以内）に継続した大量死が認められ、疾病の発生が疑われる飼育群。

取り扱い：i 放流は延期。

ii 県の魚病診断機関に連絡し、診断を依頼。

iii 減耗要因が特定の病原体によるものと判断された場合は放流は一旦中止する。病状の回復後の放流の可否については、種苗生産機関、魚病担当機関および県の行政機関と協議する。

② 放流直前に疾病と疑われる症状が一部の種苗で認められるが、大量死はない飼育群。

取り扱い：回復を確認後、放流可。

③ 放流直前に疾病と疑われる症状もなく、大量死もない飼育群。

取り扱い：放流可

#### IV 解決しなければならない問題点と今後の進め方

天然海域への病原体の拡散を防止することを目的に、種苗放流の可否についてのガイドラインを作成するためには、以下の問題点を解決することが必要である。

##### (1) 病原体の検出方法の確立と野生生物への影響

特に、危険度の高いと考えられる病原体については、検出感度の高い診断法の確立が急がれる。さらに、放流種苗における病原体の消長および野生生物への感染の可能性等について解明が急がれる。

##### (2) 病原体の危険度の解明

本申し合わせでは、当面の措置として、危険度の高いウイルス病等について取り扱いの基準を整理した。今後、種苗放流の可否についてのガイドラインを作成するためには、各病原体ごとに宿主および他の生物への影響さらには生態に関する知見の集積が必要である。

##### (3) 飼育過程における減耗率の把握

本申し合わせでは、診断技術が確立されていない疾病について、症状および死亡率で病気か否かを判断し、対処することとした。当面は、各種苗生産機関で技術的に安定した生産が得られている魚種については、平均的な日間減耗率を算出できるように努力し、その死亡が危険な病原体によるものか否かを的確に判断する必要がある。

##### (4) 今後の進め方

種苗生産機関が放流種苗による天然海域への病原体の拡散を防止することは、当然の責務である。しかしながら、種苗放流の可否についてのガイドラインを作成するためには、上記のように解決されるべき多くの問題が残されている。

本申し合わせでは、現在の技術レベルにおける放流種苗の取り扱い事項を整理したが、今後、これを種苗生産現場で実施し、問題点を抽出することがまず重要と考えられる。また、今後の疾病に関する研究の進展により、その内容の高度化を図り、

適宜申し合わせを改訂する必要があるとともに、将来の適切な種苗放流のガイドライン作成に向けて努力しなければならない。

## 防疫的見地からみた

### 放流種苗に関する申し合わせ事項（I）

#### 補足資料

- 1 PAV の PCR 診断における留意点
- 2 種苗生産現場での消毒・殺菌に関する留意点
- 3 種苗生産過程での不明病発生情報の連絡体制について

平成 11 年 3 月

## PAV の PCR 診断における留意点

PAV の原因ウイルス PRDV の検査は、水産庁養殖研究所が木村らの方法に基づき改良した PCR 法（平成 10 年 3 月，全国魚類防疫推進会議資料）で実施している。ここでは，この改良法での留意点について述べる。

### 1 サンプルの採取方法

#### (1) 親魚および親エビ検査

稚エビの PAV の発生は，親エビの受精囊のウイルスの存在と関連があるため，親エビの検査部位は産卵後の受精囊が良い。また，基本的には，個体別の PCR 検査が望ましい。

#### (2) 種苗検査の場合

飼育ロット毎（飼育水槽）に定期的に調査することが望ましい。卵，ノープリウス，ゾエア，ミス期には 1 ロット 0.05～0.1 g 程度を検査する。ポストラーバ期以降は 1 ロット 60 個体を採取し，大きさに基づいて 1 検体当りの尾数を調整する。

### 2 DNA の抽出方法（ISOGEN を使用する場合）

- (1) サンプル間のコンタミを防止するため，サンプルのホモジナイズおよび抽出過程でのマイクロチューブの開閉では，手袋に ISOGEN が付かないように十分配慮する。手袋に試料液が付着した場合，手袋を交換する。なお，マイクロチューブの蓋の開閉は，片手での開閉でなく，両手を使用したほうが良い。
- (2) DNA の TE への溶解を容易にするため，DNA の過度の乾燥は避ける。
- (3) 確実な診断を行うため，得られた DNA 中の夾雑物の濃度を下げることが必要で，DNA を TE に懸濁させる時には，抽出核酸量に応じて TE 量（100～300  $\mu$ l）の調整を行う。

### 3 PCR 反応

- (1) 酵素活性を低減させないため、Taq ポリメラーゼは、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存する ( $-80^{\circ}\text{C}$ では失活する可能性あり)。また、凍結融解は酵素活性を低下させるため、使用頻度が少ない場合は、Taq を小分けして保存する。さらには、PCR 反応液の調整時にピペッティングする際には、反応液を泡立てない。
- (2) プライマーのミスアニーリングによる非特異的増幅を抑えるため、PCR 反応液の調整は、試薬類を保冷（氷上に試薬類を立てる）して行う。
- (3) サーマルサイクラーの機種により、反応液量を決定する。
- (4) DNA の反応液への分注は、検査試料、陽性コントロール、陰性コントロールの順が良い。

## 種苗生産現場での消毒・殺菌に関する留意点

### 1 消毒に関する一般的な留意事項

種苗生産現場での疾病の防除対策として、受精卵、飼育水槽、器具、手指および長靴の消毒が行われ、主に薬剤が使用されている。ここでは、一般に用いられている消毒剤および消毒方法についての留意点を記す。

- (1) 消毒剤には、魚に対する毒性が高い薬剤が多い。また、環境および人にも大きな影響を及ぼすと考えられ、使用には十分な注意が必要である。
- (2) 消毒対象物および使用場所に応じて、消毒剤の種類および消毒法を選定し、消毒剤の病原体への作用機序、人体および水産生物への影響を念頭において消毒を実施する。
- (3) 消毒剤の適正使用濃度を守り使用量をなるべく少なくなるよう工夫する。使用に際しては、マスク、ゴム手袋、メガネおよび合羽を着用し、薬剤が皮膚に付着しないようにする。
- (4) 薬剤の濃度はその都度調製し、保存は低温遮光、暗所、密封などそれぞれの薬剤に応じた方法で行う。使用後の薬液の廃棄には充分留意し、分解あるいは中和が必要な薬剤については、薬剤等で適宜処理して廃棄する。

### 2 飼育水槽、飼育器具、長靴、手指および受精卵の消毒

#### (1) 天日干し

屋外の大型水槽および小割網のように薬剤を用いることが困難である施設および器具には、簡便ないわゆる”天日干し”による消毒が考えられる。天日干しでの微生物への作用としては、紫外線の殺菌作用および乾燥が考えられる。天日干しを行う場合は、水槽や小割網に付着した汚物を除去した後、十分な時間が必要である。

## (2) 熱水および煮沸水

熱水および煮沸水による消毒は、消毒剤を用いる方法に比べ、効果が確実で、残留性がない利点もある。一般的には、80~100℃で10分間の処理で、細菌芽胞を除く全ての微生物を殺菌できる。しかし、本法では作業者が火傷をする危険性もあり、対応する設備が十分ではない種苗生産現場では好ましい消毒法ではない。

## (3) 消毒剤

### 1) 塩素系薬剤

#### ① 作用・特性

- i) ウイルスの構成タンパク、細菌の細胞膜を酸化分解し殺菌作用を示す。芽胞を除く各種微生物に殺菌効果がある。
- ii) 種苗生産現場では次亜塩素酸ナトリウム（通常有効塩素 10% (W/V)）および次亜塩素酸カルシウム（通常有効塩素 70% (W/V)）が使用されている。次亜塩素酸カルシウムは、いわゆるさらし粉あるいは高度さらし粉のことで、白色粉末状の薬剤である。固形錠剤がプール消毒用として市販されている。

#### ② 使用上の注意

- i) 室内の水槽等の換気の悪い場所では、十分換気して消毒する。本剤は漂白力が強く、手やたも網類には使用しない。
- ii) 塩素剤は極めて魚に対する毒性が強いため、流出には厳重に注意し、他の水槽に薬剤が飛散することを防止する。
- iii) 使用量を少なくするために、水槽ではジョーロでまんべんなく散布する。
- iv) 金属腐食性があり機械および流し台等で腐食を起こすことがある。また、プラスチックおよびゴムの劣化があるため、処理前に器具の材質を確認する。
- v) 皮膚に障害を与えるので、手指の消毒剤として常用しない。
- vi) 酸性洗剤と併用してはならない。
- vii) 有機物は消毒効力に影響を及ぼすため、水槽等は海水および淡水で洗浄後に消毒する。

#### ③ 保管

- i) 保存は遮光し、25℃以下で保存する。

#### ④ 廃液処理

i) 廃液はチオ硫酸ナトリウム（ハイポ）で中和する。

⑤ 用途

i) 次亜塩素酸カルシウムはウイルスに汚染された排水に、次亜塩素酸ナトリウムは水槽および器具等の消毒に用いる。

⑥ 適用濃度

i) VNN 原因ウイルスの SJNNV では 50ppm（有効塩素量）で 10 分間、PAV の原因ウイルス PRDV では 2.5ppm（有効塩素量）で 10 分間の作用で効果が認められている。

2) ヨウ素系薬剤

① 作用・特性

i) ヨウ素の酸化力により殺菌する。中性より酸性で殺菌力が強く、海水のようなアルカリ性では力価が低下する。

ii) ポピドンヨード（有効ヨウ素 10 %（W/V））は消毒剤として唯一認められている水産用医薬品である。細胞刺激性が少ない緩和な消毒剤であり、VNN および PAV 防除対策における受精卵の消毒に用いられている。

② 使用上の注意

i) ヨウ素の殺菌力は、有機物で不活化され、海水中では淡水で処理した時より、ヨウ素の減衰が急激に起こるため、海産魚の種苗生産現場ではこの点に特に留意しなければならない。

ii) 受精卵消毒を行う場合、海水中の COD が少ない清浄海水を用いる。

iii) 希釈後、開放状態下では力価が低減する。

iv) 日光および有機物存在下で効力が低下するため、直射日光は避けて消毒する。

v) ステンレス鋼を除いて、金属腐食性がある。

③ 保管

i) 保存は遮光。使用期限 3 年。

④ 廃液処理

i) 廃液の処理はチオ硫酸ナトリウム（ハイポ）で中和する。

⑤ 用途

i) 受精卵の消毒等。

### ⑥ 適用濃度

- i) VNN 原因ウイルスの SJNNV では 50ppm (有効ヨウ素量) で 10 分間, PAV の原因ウイルス PRDV では 1ppm (有効ヨウ素量) で 10 分間の作用で効果が認められている。

## 3) 逆性石鹼

### ① 作用・特性

- i) 殺菌作用は酵素および蛋白質の変性と言われている。
- ii) 種苗生産現場では塩化ベンザルコニウム (10 % (W/V)) が飼育担当者の長靴および手指の消毒に用いられている。しかし, 逆性石鹼の不活化効果はウイルスの種類により異なり, ビルナウイルスの IPNV は逆性石鹼では不活化が困難とされ, ラブドウイルスの IHNV では不活化効果が認められている。

### ② 作業上の注意

- i) 殺菌作用は酸性側で弱く, アルカリ側で強い。種々の塩類で作用が阻害されるため希釈には淡水を用い, 海水で希釈しない。組織刺激性は比較的少ない。
- ii) 有機物の存在下および金属イオンの影響で効力が低下するため, 消毒液は 2~3 日で交換する。普通の石鹼と併用すると効果がなくなる。

### ③ 保管

- i) 保管条件は, 特になし。

### ④ 廃液処理

- i) 普通石鹼液で中和する。

### ⑤ 用途

- i) 手指, 長靴および器具等の消毒。

### ⑥ 適用濃度

- i) 塩化ベンザルコニウム液では 50 ppm, 10 分間で SJNNV を不活化できる。

## (4) アルコール系薬剤

### ① 作用・特性

- i) 殺菌作用はタンパクの変性凝固作用である。消毒用エタノールの 70~80 % (W/V) のものが一般に使用されている。

## ② 作業上の注意

- i) 常時繰り返して手指を消毒すると、肌荒れを起こすこともある。
- ii) 合成ゴムおよび樹脂，光学器具，鏡等のなかには変質するものがあり，長時間浸漬しない。
- iii) 可燃性であるため，火気には注意する。

## ③ 保管

- i) 遮光，火気厳禁。使用期限 3 年。

## ④ 廃液処理

- i) 水で十分希釈して廃棄。

## ⑤ 用途

- i) 手指の消毒，小型の実験器具，ハサミ，ピンセット等の消毒。

## ⑥ 適用濃度

- i) SJNNV では 60% (W/V) エタノールで 10 分間，PRDV では 30% (W/V) で 1 分間の作用で不活化効果が認められている。

## (5) フェノール系薬剤

### ① 作用・特性

- i) 細胞膜の破壊，蛋白質の凝固により微生物を死滅させる。種苗生産現場では，クレゾール石鹼液（50% (W/V)）が広く用いられている。石鹼による清浄効果もある。

### ② 作業上の注意

- i) 水で希釈すると，しだいに混濁し沈殿することがあるが，このような場合は上澄み液を用いる。有機物存在下でも殺菌効果は低下しない。
- ii) 皮膚刺激性があり，強い臭気がある。

### ③ 保管

- i) 遮光して保管。

### ④ 廃液処理

- i) 水で十分希釈して廃棄。

### ⑤ 用途

- i) 手指の消毒。

## ⑥ 適用濃度

i) クレゾール石鹼液では1% (W/V)溶液でSJNNVを不活化できる。

## 3 飼育用水および排水の消毒

用水に関しては、一般的には紫外線およびオゾンによる殺菌が行われている。紫外線はサケ科魚類のウイルス病対策として有効であることが報告されている。オゾンは酸化力が塩素より強く、ウイルスに対しても極めて有効な不活化剤であることが認められている。また、魚類の病原細菌に対しても強い殺菌効果を示すことも報告されている。そのため、オゾンを用いた殺菌はこれまで浄水場などにおいて行われ、近年は水族館にも導入されている。ここでは、一般の種苗生産現場で用いられている紫外線に加え、オゾンによる消毒についても述べる。

### (1) 飼育用水

#### 1) 紫外線

紫外線は海水中の懸濁物、有機物および鉄イオンにより不活化効果が低下するため、使用に際しては対象とする海水に注意する。このため、海水を用いる種苗生産現場では高出力の照射能力を有する装置の導入が必要である。なお、紫外線により損傷した微生物は可視光線に当たると修復される作用があり、この点にも留意する。SJNNVでは $10 \times 10^5 \mu w \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ 以上が、PRDVでは $10 \times 10^4 \mu w \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ 以上の照射線量が必要である。

#### 2) オゾン

ウイルスのオゾンによる不活化機構は、外被蛋白質が多少損傷を受けるが、基本的には核酸への影響のためと考えられている。オゾンは海水中の臭素イオンや塩素イオンなどと反応してオキシダントを生成し、これにより殺菌力が生じる。従って、オゾン処理した海水の殺菌効果を的確に把握するためには、残留オキシダント濃度を測定する必要がある。

海水のオゾン処理は種苗生産現場において有効であることが示唆されているが、

残留オキシダントの魚類に対する毒性が報告されており、残留オキシダントは活性炭で除去して飼育用水に用いる。また、オゾンの水中での溶存量や分解速度は、水温や pH、塩類濃度、有機物量などにより影響を受けるため、効果的に不活化させるための水質条件の検討が必要である。SJNNV では、残留オキシダント濃度が 0.1 mg/l で 2.5 分間の処理で、PRDV では 0.62 mg/l で 1 分間の処理で不活化できる。

## (2) 飼育排水

VNN の発生している飼育水中の SJNNV の感染価 (50%感染量) は、低いレベルではあるが  $10^{0.5}ID_{50}/ml$  から  $10^{1.5}ID_{50}/ml$  が継続して検出されることがある。このため、排水処理は本病の二次感染を防止するために重要である。

最も危険であるのは病魚が水槽外へ流出することであり、疾病が発生した飼育水は、まず、病魚および有機物をポリエチレンネット (150 目、目合い  $143\mu m$ ) で濾し取る。現在、ウイルス実験施設では有機物を一旦沈澱槽で沈澱させ、さらにカートリッジ式フィルターで濾過して、オゾン処理で消毒してから排水を行っている。

## 4 参考図書・文献

### 【参考図書】

- 1) 神谷 晃・尾家重治., 1997 : 消毒剤の選び方と使用上の留意点, 薬業事報社.
- 2) 都築正和・他編., 1996 : 殺菌・消毒マニュアル, 医歯薬出版.
- 3) 若林久嗣・他編., 1993 : 平成 4 年度魚類防疫技術基盤確立事業, 基本マニュアル, (社) 日本水産資源保護協会.

### 【参考文献】

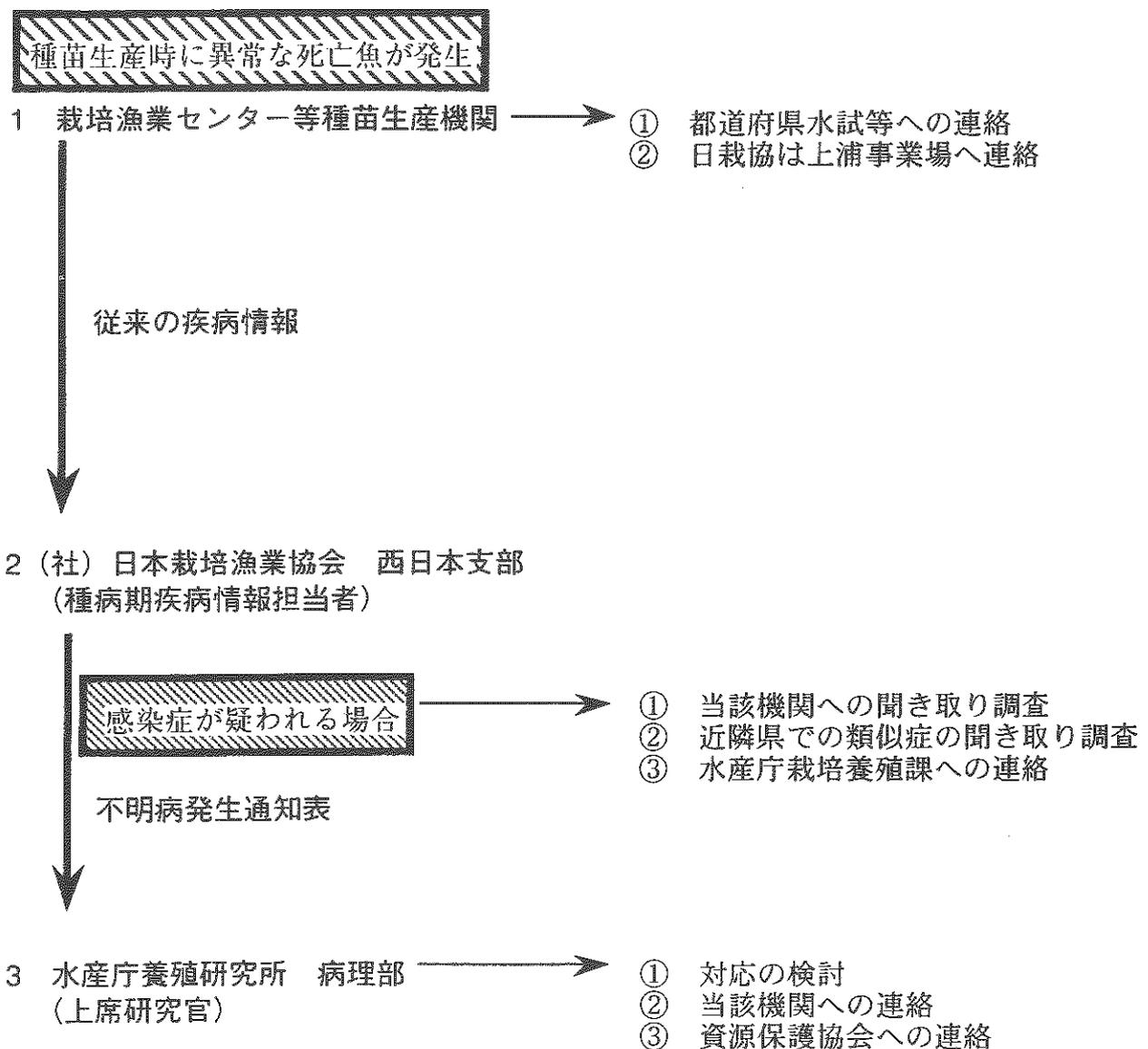
- 4) Arimoto, M., J. Sato, K. Maruyama, G. Mimura, and I. Furusawa .,1996 : Effect of chemical and physiological treatments on inactivation of striped jack nervous necrosis(SJNNV), Aquaculture, 143;15-22.

- 5) 中野平二・平岡三登里・鮫島 守・木村武志・桃山和夫., 1998 : クルマエビ類の急性ウイルス血症 (PAV) の原因ウイルスの不活化, 魚病研究., 33 (2) ; 65-71.

## 種苗生産過程での不明病発生情報の連絡体制について

### 1 連絡体制

- (1) 種苗期の疾病発生については（社）日本栽培漁業協会が中心となって情報収集することとし、水産庁養殖研究所（病理部）は得られた情報の中で特に重大な不明病について関係機関と連絡しつつ、原因究明に当たる。
- (2) 具体的な連絡体制は下図のとおりとし、都道府県の栽培漁業センター等の種苗生産機関が別添様式による不明病発生通知表を作成し連絡することとする。





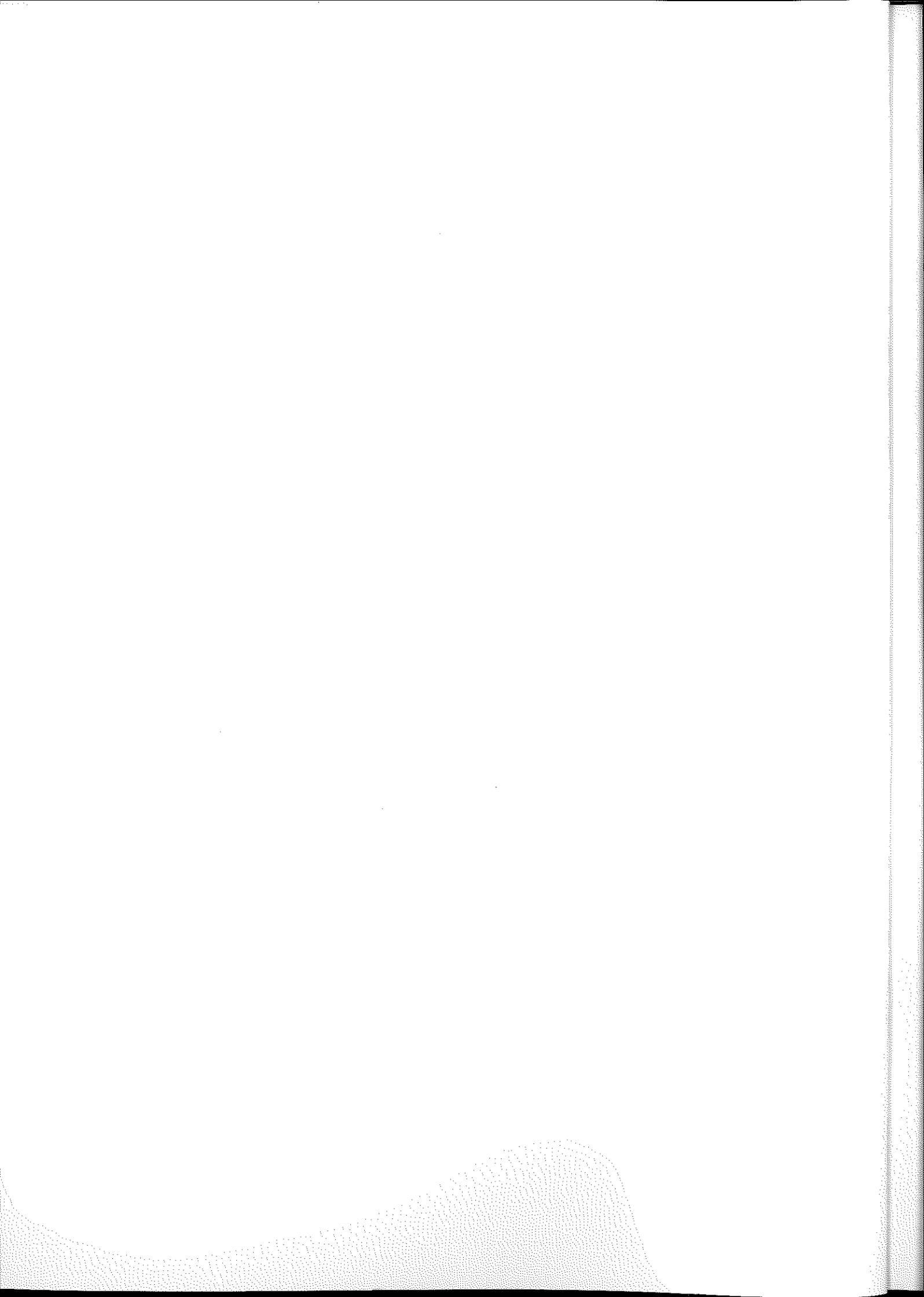
## 防疫的見地からみた

### 放流種苗に関する申し合わせ事項（１）

#### 補足資料（２）

- 1 ウイルス性神経壊死症（viral nervous necrosis：VNN）のポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction：PCR）診断に関する留意点
  - 1）市販の試薬を使用する RNA の抽出方法
  - 2）nested PCR によるウイルス遺伝型の判別
  
- 2 種苗生産現場での新たな疾病に関する情報
  - 1）ヒラメのネオヘテロボツリウム症
  - 2）ヒラメのウイルス性出血性敗血症（viral hemorrhagic septicemia:VHS）

平成18年1月



## 1. ウイルス性神経壊死症(VNN)のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)診断における留意点

ウイルス性神経壊死症(viral nervous necrosis:VNN)のポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction:PCR)による診断手法は、Nishizawa *et al.*(1994)に基づいた方法(平成7年度、栽培漁業技術開発推進事業ブロック協議会資料、「ウイルス性神経壊死症防除技術開発のこれまでの成果」を参照)<sup>1)</sup>で実施されてきたが、ここでは、改良されたRNAの抽出方法とnested PCRによるウイルスの遺伝子型の判別法について述べる。

### 1) 市販の試薬を使用するRNAの抽出方法

AGPC法(acid guanidinium phenol chloroform 法)に基づく市販のRNA抽出試薬であるIsogen(ニッポンジーン)やTrizol(Invitrogen)は、酸性下でフェノール処理するとDNAはフェノール層に、RNAは水相に分配される性質を利用し、RNAを抽出する方法である。これらの試薬はフェノールおよびチオシアン酸グアニジンを主成分としており、使用の際には保護具(手袋、眼鏡等)を着用する必要がある<sup>2,3)</sup>。Isogenを用いたRNA抽出法の詳細については別紙に示す。

### 2) nested PCRによるウイルス遺伝型の判別

放流用種苗がVNN原因ウイルスに感染しているか否かを検査する場合のPCR診断は、RT-PCR(これまで通りの1回のPCR)の結果を持って判断すれば十分である。しかし、検出された原因ウイルスの遺伝子型を特定したり、RT-PCRでの増幅産物が本当にウイルスに由来するものかどうかを確認するためにnested PCRが開発された<sup>4)</sup>。これはRT-PCRプライマー(現行のF2およびR3)で増幅されるT4領域の内部に4つの遺伝子型<sup>5)</sup>に特異的な配列を持つプライマーを用いてPCR反応を繰り返す方法である(表1)。反応試薬の組成および反応条件は、それぞれ表2および3に示した。ただし、RT-PCRと比較すると検出感度が高く、そのためキャリーオーバーによる擬陽性反応が起こりやすくなることから、nested PCRの実施にあたっては、フィルターチップの使用、定期的なDNA除去剤(DNA AWAY;フナコシなど)での清掃、電気泳動室とPCR試薬調製室の隔離などの対策を講じる必要がある。

表 1. nested PCR 用のプライマーの塩基配列

検出するウイルスの 遺伝子型 (感染が認められた魚種)	プライマーの種類	配列
SJ タイプ (シマアジ, ヒラメなど)	センス鎖	5'-acctgaggacaccaccgctc-3'
	アンチセンス鎖	5'-cagtcaaagtaccagcagg-3'
BF タイプ (マツカワ, ヒラメなど)	センス鎖	5'-acctgaagatacattcgctc-3'
	アンチセンス鎖	5'-cagtggaaccaccccgagg-3'
TP タイプ (トラフグなど)	センス鎖	5'-acctgaggaaacattcgctc-3'
	アンチセンス鎖	5'-caAtccaagaagcctgcagg-3'
RG タイプ (ハタ類, ヒラメなど)	センス鎖	5'-acctgaggagactaccgctc-3'
	アンチセンス鎖	5'-cagcgaaccagcctgcagg-3'

表 2. nested PCR 反应用試薬の組成 (終濃度)

1×PCR 緩衝液 (酵素添付)
0.2 mM dNTP
0.2 μM 上流・下流各プライマー
Taq DNA 合成酵素 1.25 units/反応液 25 μL
1st PCR 産物 1 μL/反応液 25 μL

表 3. nested PCR の反応条件

反応段階	反応条件	繰り返し回数
初回の熱変性	95°C, 5 分間	1
熱変性	95°C, 30 秒間	25
アニーリング	65°C, 30 秒間	
伸長	72°C, 30 秒間	
最終の伸長	72°C, 5 分間	1

## 2. 種苗生産現場での新たな疾病に関する情報

### 1) ヒラメのネオヘテロボツリウム症

1996年以降、我が国沿岸で漁獲されたヒラメで、極度の貧血を主徴とする疾病が発生し大きな問題となった<sup>6)</sup>。当初、ウイルスの関与を示唆する報告もなされたが、その後の調査により主たる原因は吸血性単生類の *Neoheterobothrium hirame* の寄生によることが明らかになった<sup>7-10)</sup>。本疾病は天然魚だけでなく、養殖魚や種苗生産で用いる養成親魚でも発生することが確認されており、養殖業や栽培漁業を推進する上で大きな問題となっている<sup>11)</sup>。種苗生産場内での本病の蔓延、放流種苗を介した天然海域への病原体の拡散を防止するため、親魚および種苗の本虫の寄生状況に留意し、本虫の寄生が認められた場合には下記の駆虫対策を講じるのが望ましい。なお、親魚あるいは種苗のいずれの駆虫方法においても、ヒラメの健康状態、水温、あるいは通気量等の条件によって、駆虫作業によりヒラメが死亡する可能性もあることから、これを考慮し慎重に作業を実施する必要がある。また他の寄生虫病と同様に、日常の飼育密度、換水量などの飼育管理を適切に行うことも重要である。特に本虫の卵は沈性があることから、卵が水槽底部に蓄積されないよう水槽底部から排水するなどの対策が有効と考えられる。

**親魚での駆虫対策** 照明下でピンセットを用いて親魚の口腔内の成虫を駆除する方法、あるいはこれに食塩3%添加海水に30分間浸漬する未成熟虫を駆除する方法を組み合わせた対策を1ヶ月間隔で数回行うことにより、駆虫が可能である<sup>12,13)</sup>。また親魚には、食塩8%添加海水に5分間浸漬し、成熟虫と未成熟虫を同時に駆除する方法も報告されている<sup>14)</sup>。

**種苗での駆虫対策** 種苗には、食塩7%添加海水に5分間浸漬し、成熟虫と未成熟虫を駆除する方法が有効である<sup>15)</sup>。

### 2) ヒラメのウイルス性出血性敗血症(VHS)

1996年以降、我が国のヒラメ養殖場でウイルス性出血性敗血症(viral hemorrhagic septicemia :VHS)が発生すると共に、天然のヒラメからも本病原ウイルス(VHSV)が検出され、大きな問題となっている<sup>16,17)</sup>。ヒラメから分離されたVHSVは、ニジマスには病原性が認められていないが、数種の海産魚に病原性を有することが報告されている<sup>18,19)</sup>。これまでのところ、ヒラメ種苗生産過程での本病の発生は認められていないが、養殖場ではヒラメ稚魚で発生が認められていることから、中間育成中に本病が

発生する可能性があり注意が必要である。なお、本病の感染経路については未だ明らかになっていない。現在、本病の診断は、FHM(ファットヘッドミノーの尾柄部上皮)細胞を用い20℃で2週間培養する方法で行われている。また、本病の対策については、本病が冬季の低水温時に発生していることから、加温飼育による防除の可能性が示唆されている<sup>20)</sup>。一方で種苗生産現場においては、天然のヒラメやイカナゴから本病原因ウイルスが検出されていることから<sup>21)</sup>、種苗生産場に導入する天然由来の親魚候補や親魚餌料として使用する生餌が本病の汚染源となることが考えられ、他のウイルス病と同様に親魚水槽や調餌室から生産施設を隔離するなどの場内の徹底した衛生管理が重要と考えられる。また、生餌については、配合飼料を代用することで、今後使用しないように技術開発を進めていくことが望ましい。さらに前述のごとく本ウイルスが幅広い範囲の海産魚に感染することが報告されていることから、他魚種においても本病発生のおそれがあり、注意が必要である。ここでは、これまでに報告されている各種消毒剤の本ウイルスに対する殺ウイルス効果<sup>22)</sup>について以下にまとめた。

#### ① 塩素系薬剤

次亜塩素酸ナトリウムでは、有効塩素 50 ppm で1分間(ただし海水中では、100 ppm で5分間)の作用で不活化効果が認められている。高度さらし粉(次亜塩素酸カルシウム)では有効塩素 50 ppm で2.5分間(ただし海水中では50 ppm で1時間)の作用で不活化効果が認められている。

#### ② 逆性石鹼

塩化ベンザルコニウム剤では、約 400 ppm(10%市販薬を250倍に希釈)で1分間の作用で不活化効果が認められている。

#### ③ アルコール系薬剤

イソプロパノールでは、30%(V/V)で30秒間の作用で不活化効果が認められている。

#### ④ フェノール系薬剤

クレゾール石鹼液溶液では、0.1%(W/V)で5分間の作用で不活化効果が認められている。

#### ⑤ ヨウ素系薬剤

ポピドンヨードでは有効ヨウ素 50 ppm で1分間の作用で不活化効果が認められている。

## 引用文献

- 1) Nishizawa, T., K. Mori, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga (1994): Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Diseases of Aquatic Organisms*, **18**, 103-107.
- 2) 村松正實(1996):「ラボマニュアル遺伝子工学」, 第3版, 丸善株式会社, 16章, 83-86.
- 3) Sambrook, J and D. W. Russell (2001): "Molecular cloning : a laboratory manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. p7.9-7.12.
- 4) 森 広一郎・西岡豊弘・有元 操・中井敏博(2001): 魚類ノダウイルスの PCR 検出系の再検討. 平成 13 年度日本魚病学会春季大会講演要旨集.
- 5) Nishizawa, T., M. Furuhashi, T. Nagai, T. Nakai, and K. Muroga (1997): Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of coat protein gene. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 1633-1636.
- 6) 三輪 理・井上 潔(1999): 日本沿岸で発生している貧血を特徴とするヒラメの疾病の病理組織学的研究. 魚病研究, **34**, 113-119.
- 7) Ogawa, K. (1999): *Neoheterobothrium hirame* sp. nov. (Monogenea: Diclidophoridae) from the buccal cavity wall of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathology*, **34**, 195-201.
- 8) Yoshinaga, T., T. Kamaishi, I. Segawa, K. Yamano, H. Ikeda and M. Sorimachi (2001): Anemia caused by challenges with the monogenean *Neoheterobothrium hirame* in the Japanese flounder. *Fish Pathology*, **36**, 13-20.
- 9) 虫明敬一・森 広一郎・有元 操(2001): 天然ヒラメにおける貧血症の発生状況. 魚病研究, **36**, 125-132.
- 10) 良永知義・釜石 隆・瀬川 勲・熊谷 明・中易千早・山野恵祐・竹内照文・反町 稔(2000): 貧血ヒラメの血液性状, 病理組織および単性類 *Neoheterobothrium hirame* の寄生状況. 魚病研究, **35**, 131-136.
- 11) 道根 淳(1999): 養殖および養成親魚ヒラメで発見された寄生虫 *Neoheterobothrium* sp. について. 島根県栽培漁業センター調査報告, 第2号, 15-23.
- 12) Yoshinaga, T., I. Segawa, T. Kamaishi and M. Sorimachi (2000): Effects of temperature, salinity and chlorine treatment on egg hatching of the Monogenean *Neoheterobothrium hirame* infecting Japanese flounder. *Fish Pathology*, **35**, 85-88.

- 13) 森 広一郎・本藤 靖・虫明敬一・津崎龍雄・有元 操・堤 信幸・小川和夫 (2000): ヒラメ養成親魚における貧血症(仮)の発生とネオヘテロボツリウムの駆虫効果. 平成 12 年度日本魚病学会春季大会講演要旨集.
- 14) Isshiki, T., M. Tochino, and T. Nagano (2003): Treatments of *Neoheterobothrium* infection in Japanese flounder by 8% NaCl-supplemented seawater bathing. *Suisanzoushoku*, **51**, 363-364.
- 15) 西岡豊弘 (2004): ヒラメ稚魚における 7%食塩添加海水浴によるネオヘテロボツリウム成虫の駆除効果. 栽培漁業センター技法, **2**, 96-99.
- 16) Isshiki, T., T. Nishizawa, T. Kobayashi, T. Nagano and T. Miyazaki (2001): An outbreak of VHSV (viral haemorrhagic septicaemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Diseases of Aquatic Organisms*, **47**, 87-99.
- 17) Takano, R., T. Nishizawa, M. Arimoto and K. Muroga (2000): Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **20**, 186-192.
- 18) Isshiki, T., T. Nagano and T. Miyazaki (2003): Susceptibility of various marine fish species to viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from Japanese flounder. *Fish Pathology*, **38**, 113-115
- 19) Ito, T., K. Mori, M. Arimoto and K. Nakajima (2004): Virulence of viral hemorrhagic septicemia virus(VHSV) isolates from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in rainbow trout and several species of marine fish. *Fish Pathology*, **39**, 103-104.
- 20) Isshiki, T., T. Nagano and T. Miyazaki (2003): Effect of water temperature on pathological states of Japanese flounder experimentally infected with viral haemorrhagic septicaemia virus, an flounder isolate KRRV-9601. *Fish Pathology*, **37**, 95-97
- 21) Watanabe, L., R. Pakingking Jr, H. Iida, T. Nishizawa, Y. Iida, M. Arimoto and K. Muroga (2002): Isolation of aquabirnavirus and viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fishes. *Fish Pathology*, **37**, 189-191.
- 22) 栗田 潤・飯田悦左・中島員洋・井上 潔 (2002): ヒラメ VHS ウイルスに対する各種市販消毒剤の殺ウイルス効果. 魚病研究, **37**, 175-181.

## 別紙

### <AGPC 法による RNA の抽出>

供試材料からの RNA 抽出は市販の抽出薬である Isogen (ニッポンジーン) あるいは Trizol (Invitrogen) を用いて行う。以下に、Isogen を用いた抽出手順について述べる。

### <試薬>

- ・ ジエチルピロカーボネイト処理水 (DDW) : 終濃度 0.1 % (W/V) になるようにジエチルピロカーボネイトを超純水にけん濁し, 37°C で一晚 (12 時間以上) 静置後, オートクレーブ処理 (121°C で 20 分) する。ジエチルピロカーボネイトは, 揮発性のある発ガン物質であるため, 使い捨て手袋を着用しドラフト内で取り扱う。
- ・ クロロホルム: 試薬特級
- ・ イソプロパノール (= 2-プロパノール) : 試薬特級
- ・ エタノール: 試薬特級
- ・ 70 % エタノール: エタノールを DDW で希釈し調製する。

### <手順>

- ① 滅菌した 1.5 mL チューブに検査組織 (50~100 mg) を入れ, これに Isogen 300  $\mu$ L を加え, 滅菌したホモジナイズ棒で摩砕する。
- ② さらに Isogen 700  $\mu$ L を入れて攪拌する。
- ③ 室温に 5 分間静置する。
- ④ クロロホルム 200  $\mu$ L を添加して 15 秒間攪拌する。
- ⑤ 室温に 2~3 分間静置する。
- ⑥ 遠心分離 (12,000  $\times g$  で 15 分, 4°C) する。
- ⑦ 3 層に分離した上層 (約 400  $\mu$ L) を別のチューブに移し, 2-プロパノール (= イソプロパノール) 500  $\mu$ L を添加し軽く攪拌する。
- ⑧ 室温に 5~10 分間静置する。
- ⑨ 遠心分離 (12,000  $\times g$  で 10 分, 4°C) する。
- ⑩ 上清を捨て沈殿に 70 % エタノール (1,000  $\mu$ L) を添加し, 攪拌する。
- ⑪ 遠心分離 (7,500  $\times g$  で 5 分, 4°C) する。
- ⑫ 上清を捨て軽く遠心した後, 得られた上清をピペットでできる限り取り除き, 完全に乾燥しないように注意しながら, 風乾または 5~10 分間真空乾燥する。
- ⑬ DDW を核酸量に合わせて添加 (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L 以下の濃度になるように) し RNA を完全に溶解する。