

## 種苗生産に用いたイソゴカイの PAV 検査

照屋清之介・\*寺本沙也加

\*沖縄県海洋深層水研究所非常勤職員

### 1. 目的

イソゴカイ（以下、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（崎山、2014）。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、クルマエビ類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（Vijayan et al., 2005; Desrina et al., 2012; Haryadi et al., 2015）。

クルマエビの催熟に必要なゴカイは、ウイルス性の疾病をはじめとする様々な病原体を持ち込む恐れがあるため、代替餌料の探索・開発が必要とされてきた（崎山、2014）。当研究所では、代替餌料として加熱処理（PAV 失活処理）ゴカイ、ミミズ、冷凍カキ、冷凍アサリ、冷凍アワビ、配合餌料等を用いて、催熟効果を比較したが、活ゴカイ以上に催熟効果がある餌料は見つからず（安井、2013; 2014; 2015）、ウイルスフリーゴカイの作出が必要不可欠となった。

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。そこで、当研究所では、平成 29 年度から PAV ウイルスフリーのゴカイの作出に取り組んでいる。本報告では、平成 30 年、31 年（令和元年）度にかけて種苗生産に用いた親ゴカイの PAV 検査の結果を報告する。

### 2. 材料および方法

材料となるゴカイは、国産のゴカイを購入して、当研究所で飼育し、人工授精を行った親ゴカイのペアを 1 検体として PCR による PAV 検査を行った。DNA 抽出に用いる検査部位は、ゴカイの胴部の一部を用いて行った。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。

DNA 抽出法は、OIE（2017）を参考に、CTAB 溶液を用いたフェノール・クロロホルム法により抽出を行った。

PCR 反応は、KOD FX Neo（TOYOBO）を用いて行い、試薬、プライマーの量は、添付のマニュアルに従って実験した。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（OIE、2017）、②木村ほか（1996）を改良したシャトル PCR 法（佐藤、2014）、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（Desrina et al., 2012）の 3 手法により行った。それぞれのプライマーリストを表 1、反応条件を表 2 に記す。

### 3. 結果

第一世代を生んだ親 36 ペア、ウイルスフリー第一世代 2 ペアの合計 38 ペアの PAV 検査を実施した（表 3）。その結果、第一世代 36 ペア中 1 ペア（AP33）において、OIE 法の条件により PCR 産物の増幅が確認された。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 3 の AP201、202）。

### 4. 考察

海外では、バナメイやウシエビの種苗生産に用いるゴカイのウイルスフリー化が既に行われており、ウイルスフリーゴカイを用いた、ウイルスフリーエビの種苗生産が行われているという情報がある。国内のクルマエビ種苗生産機関に聞き込みを行ったところ、ゴカイのウイルスフリー化の必要性は感じているものの、実際にウイルスフリーゴカイの作出を行っている機関はなかった。クルマエビの産卵後の受精卵の消毒により、PAV ウイルスを不活性化させるという認識の機関が多かった。確かに卵消毒は重要であるが、そもそもウイルスを防除することの方が重要であることは言うまでもない。

今回、PCR産物の増幅が確認されたPAV陽性の可能性があるペアは1ペア(0.8g程度)のみであった。クルマエビの種苗生産では、1回に数十キロのゴカイが用いられるため、ウイルス検査を行っていないゴカイでは、PAVウイルスを保有したゴカイが紛れ込む可能性は十分に考えられる。今後、今回作出されたPAVウイルスフリーゴカイを元にして量産し、全ての県産クルマエビの種苗生産にウイルスフリーゴカイが用いられることが望まれる。

## 5. 今後の課題

- 1) PAVウイルスフリーゴカイの継代飼育、量産化が必要である。
- 2) イソゴカイよりもサイズが大きく、クルマエビの催熟に適しているとされるアオイソメのウイルスフリー化が望まれる。ただし、流通しているアオイソメの殆どが国外産であり、PAVだけではなく他の病原体を保有している可能性も指摘されているため、導入は実質困難である。

## 6. 要約

- 1) 国産のイソゴカイを購入・飼育し、人工授精を行った親ゴカイおよび第一世代の親ゴカイのPAV検査を実施した。
- 2) 第一世代のウイルスフリーゴカイを生育し、第二世代を生産した。親ゴカイを検査したところ、PCR産物の増幅は確認されなかった。ウイルスフリーゴカイの作出に成功した。

## 7. 参考文献

- Desrina, Sarjito, A.H. Condro Haditomo D. Chilmawati. (2012) The White Spot Syndrome Virus (WSSV) Load in *Dendronereis* spp. *Journal of Coastal Development*, 15, 270-275.
- Haryadi, D., Verreth, J.A.J., Verdegem, M.C.J. and Vlak, J.M. (2015) Transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from *Dendronereis* spp. (Peters) (Nereididae) to penaeid shrimp. *Journal of Fish Diseases*, 38, 419-428.
- 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(2), 93-98.
- 中野平二 (2005) クルマエビの急性ウイルス血症. *日本水産学会誌*, 71(4), 639-644.

OIE (World Organisation for Animal Health) (2017) Infection with white spot syndrome virus, In *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*, OIE, Paris.

佐藤純 (2014) 第4節 PAV防除対策. In. 奥村卓二・水藤勝喜(編), *クルマエビ類の成熟・産卵と採卵技術*. 愛知県水産業振興基金, 111-128.

崎山一孝 (2014) 第2節 クルマエビの成熟に適した飼餌料要因. In. 奥村卓二・水藤勝喜(編), *クルマエビ類の成熟・産卵と採卵技術*. 愛知県水産業振興基金, 79-77.

Vijayan, K., Raj, V.S., Balasubramanian, C.P., Alavandi, S.V., Sekhar, V.T., Santiago, T.C. (2005) Polychaete worms- a vector for white spot syndrome virus (wssv). *Diseases of Aquatic Organisms*, 63, 107-111.

安井理奈 (2013) クルマエビ産卵促進試験ーゴカイ代替飼料の探索ー. *沖縄県海洋深層水研究所研究業務報告*, 12, 15-16.

安井理奈 (2014) クルマエビ産卵促進試験ー多毛類代替飼料の探索ー. *沖縄県海洋深層水研究所研究業務報告*, 13, 5-9.

安井理奈 (2015) クルマエビ産卵促進試験ー多毛類代替飼料の探索ほかー. *沖縄県海洋深層水研究所研究業務報告*, 14, 5-10.

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	参照論文等
①OIE法	146F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG	1 回目	OIE, 2017
	146R1	TAATGCGGGTGAATGTTCTTACGA	1 回目	OIE, 2017
	146F2	GTAAGTGCCTCCATCTCCA	2 回目	OIE, 2017
	146R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT	2 回目	OIE, 2017
②シャトルPCR法	P1	ATCATGGCTGCTTCACAGAC	1 回目	木村ほか、1996
	P2	GGCTGGAGAGGAC AAGACAT	1 回目	木村ほか、1996
	P3	TCTTCATCAGATGCTACTGC	2 回目	木村ほか、1996
	P4	TAACGCTATCCAGTATCAGG	2 回目	木村ほか、1996
③Desrina法	VP28-F1	CACAACACTGTGACCAAG	1 回目	Desrina et al., 2012
	VP28-R1	TTTACTCGGTC CAGTGCCAG	1 回目	Desrina et al., 2012
	VP28-F1 nested	CATTCCCTGTGACTGCTGAGG	2 回目	Desrina et al., 2012
	VP28-R1 nested	CCACACACAAAGGTGCCAAC	2 回目	Desrina et al., 2012

表 2. PCR の反応条件。°Cは温度を示し、分は反応時間を示す。

方法名	ステップ数	サイクル反応前		熱変性		アニーリング		伸張反応		サイクル反応後		参照論文等
		°C	分	°C	分	°C	分	°C	分	°C	分	
①OIE法	1回目	94.0	3:00	94.0	1:00	55.0	1:00	72.0	2:00	72.0	5:00	OIE, 2017
①OIE法	2回目	94.0	3:00	94.0	1:00	55.0	1:00	72.0	2:00	72.0	5:00	OIE, 2017
②シャトルPCR法	1回目	95.0	3:00	95.0	1:00	57.0	1:30	-	-	72.0	5:00	木村ほか、1996
②シャトルPCR法	2回目	95.0	3:00	95.0	1:00	57.0	1:30	-	-	72.0	5:00	木村ほか、1996
③Desrina法	1回目	94.0	3:00	94.0	0:50	50.0	0:50	72.0	1:00	72.0	7:00	Desrina et al., 2012
③Desrina法	2回目	94.0	3:00	94.0	0:50	50.0	0:50	72.0	1:00	72.0	7:00	Desrina et al., 2012

表 3. 検査結果。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。

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シヤトル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シヤトルPCR法	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
③Desrina法	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-