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

桃 山 和 夫*

(1989 年 6 月 5 日受付)

Survival of Baculoviral Mid-gut Gland Necrosis Virus (BMNV) in Infected Tissues and in Sea Water

Kazuo MOMOYAMA

Yamaguchi Prefectural Naikai Fisheries Experimental Station, Yamguchi 754, Japan

(Received June 5, 1989)

This paper describes the survival of BMNV in tissues of frozen or freeze-dried infected post-larval kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, and in sea water at different temperatures. Larval and post-larval kuruma shrimp were used as test animals for infectivity trials. Test animals sampled on day 4 after water-borne inoculation were examined for nuclear hypertrophy of the mid-gut gland epithelial cells in fresh squash preparations under the dark field microscope.

BMNV in frozen tissues did not tolerate to 5 years storage if stored at -20°C , whereas it survived more than 7 years at high levels of infectivity if stored at -80°C . The virus in freeze-dried tissues tolerated to 7 year storage at 4°C , but having 99.9% loss of infectivity compared to that of the virus in frozen tissues stored at -80°C .

BMNV in sea water tended to reduce its survival period with storage temperature rising, and was inactivated within 4 days at 30°C , 7 days at 25°C , 12 days at 20°C and 20 days at 15°C .

クルマエビ類病原ウイルスの保存は、通常病エビ感染組織の凍結によって行われており、BMNV (SANO *et al.*, 1985; MOMOYAMA and SANO, 1988), IHNV (BELL and LIGHTNER, 1984, 1987) および MBV (福田ら, 1988) では、凍結保存病エビが感染実験の感染源として用いられている。凍結以外の方法では IHNV が 50% グリセリン液中で室温において 14 日間感染性が維持されたという LIGHTNER ら (1987) の報告があるにすぎない。クルマエビの培養細胞が株化されていない現状 (CHEN *et al.*, 1986) では、ウイルスの長期保存は凍結または凍結乾燥のいずれかの方法によらなければならないが (近藤, 1973), 保存期間中の活性の変化には留意する必要がある。

また、遊離 BMNV の海水中での生存期間を調べることは本症の防疫と関連して重要である。

今回、筆者はクルマエビ稚仔を用いた感染実験 (MOMOYAMA and SANO, 1988) により、BMNV が凍結または凍結乾燥されたクルマエビの感染組織内で長期保存が可能か否か、および本ウイルスの海水中での活性維持について若干の検討を行ったので報告する。

材料および方法

1. 供試クルマエビ

山口県内海栽培漁業センターで種苗生産されたミシシから P-4 (4 日令のポストラーバ) までのいずれかの発育期にある健康な稚仔を用いた。これらの稚仔は、BMNV に対して高い感受性を示すことが MOMOYAMA and SANO (1989) により明らかにされている。

2. BMNV 保存方法

感染組織内のウイルス

1981 年 8 月 28 日、山口県内の一民間クルマエビ養

* 山口県内海水産試験場

殖場で本症が発生した際に、病エビ（平均体重 5.2 mg）を 1 g（約 190 尾）ずつ標本ビンまたはアンプルに小分けし、標本ビンは密栓した後、 -20°C または -80°C の冷凍庫に 5 年ないし 7 年間保存した。アンプルは凍結乾燥後、アンプルの首をガスバーナーで溶封した後、 4°C の冷蔵庫に 7 年間保存した。

海水中の遊離ウイルス

生活状態にある病エビ 1 g（約 220 尾、平均体重 4.5 mg）を MOMOYAMA and SANO (1988) に準じてウイルス液を調整し、更に 220 nm のミリポアフィルターで濾過した。このウイルス液 0.5 ml を滅菌海水 100 ml に添加した後、 $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ の所定温度の恒温器に 2～20 日間保存した。

3. 接種方法

感染組織内のウイルスについては、保存病エビを MOMOYAMA and SANO (1988) に従って調整して得られたウイルス液を Table 1 に示す濃度となるように海水に添加して混合後、また、海水中の遊離ウイルスについては恒温器に保存しておいたウイルス液を海水 900 ml に添加して混合後、それぞれ供試エビ各 30 尾を 2 時間浸漬して接種した。

4. 活性維持の判定方法

接種された供試エビを水温 $26.7\sim 30.0^{\circ}\text{C}$ で 4 日間飼育後、無作為に採取した 10 尾の生鮮中腸腺について、暗視野観察法（桃山, 1983）により感染個体が認められた場合に活性維持と判定した。

結果および考察

感染組織内の BMNV

病エビを無処理のまま -20°C で保存した場合には、実験に供した 5 年後には既に活性は消失していた（Table 1）。しかし、 -80°C で保存した場合には、7 年後においても浸漬接種液のミシス幼生に対する最小感染価は $10^{-1}\text{ mg} \cdot \text{病エビ/l}$ 以下の高い感染価を有していた。MOMOYAMA and SANO (1988) は、 -80°C で凍結保存されていた別の発病群について、凍結 7 週間後にミシス幼生を用いて $10^{-2}\text{ mg} \cdot \text{病エビ/l}$ の最少感染価を得ているが、桃山 (1989) はこの値がその後 4 年間はほぼ一定であったことを確かめている。 -80°C で凍結保存した場合、本ウイルスの活性の低下はわずかであると考えられる。

凍結乾燥された感染組織内では、 -80°C での凍結保存に比べると 99.9% 活性が低下していたが、7 年後にも

Table 1. Survival of BMNV in infected tissues of post-larval kuruma shrimp at different storage temperatures. Materials stored at 4°C had been freeze-dried before storage

Storage temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Exposure virus concentration (mg/l) ^{*1}	Storage period (year)	
		5 ^{*2}	7 ^{*3}
-80	1,000	9/10 ^{*4}	10/10
	10	9/10	10/10
	10^{-1}	NT ^{*5}	6/10
-20	1,000	0/10	NT
4	1,000	5/10	9/10
	100	NT	7/10
	10	NT	0/10

^{*1} Exposure virus concentration was prepared from the filtrate equivalent to 100 mg of diseased shrimp per millilitre.

^{*2} 4-day-old post-larval kuruma shrimp were used as test animals.

^{*3} Mysis II stage larval kuruma shrimp were used as test animals.

^{*4} Number of shrimp infected/number of shrimp examined.

^{*5} Not tested.

活性は維持されていた（Table 1）。ウイルスは一般に乾燥状態では高温に対して比較的抵抗性があることが知られており、このことは BMNV と同属のパキキュロウイルスである昆虫由来の核多角体病ウイルス（NPV）についても確かめられている（古田, 1981）。本ウイルスの凍結乾燥は、低温維持が困難な場合の長時間輸送や長期保存に充分応用できるものと思われる。

海水中の遊離ウイルス

本ウイルスの海水中での不活化は高温ほど速やかで、 30°C では 4 日、 25°C では 7 日、 20°C では 12 日、 15°C では 20 日以内にそれぞれ不活化された（Table 2）。また、今回の実験ではかなり高いウイルス濃度の浸漬液を用いていることを考慮すると、大部分のウイルスは 25°C では 4 日、 15°C と 20°C では 7 日以内に失活したものと考えられる。

前述の NPV は自然環境条件下で長期間活性を維持することが知られており（荒武・柏村, 1985）、カイコの NP 流行には飼育環境下に生残している NPV が重要な汚染源となっていることが指摘されている（渡部・清水, 1981）。しかし、BMNV は海水中では比較的速やかに不活化されることから、生体から排泄された本ウイルスが

Table 2. Survival of BMNV in sea water at different temperatures

Storage period (day)	Developmental stage*1 of test kuruma shrimp	Sea water temperature (°C)			
		15	20	25	30
		No. of shrimp infected/no. examined			
2	M-I	10/10	10/10	10/10	10/10
4	M-II	10/10	9/10	6/10	0/10
7	P-2	6/10	1/10	0/10	0/10
12	P-1	0/10	0/10	0/10	
15	P-4	1/10	0/10		
20	M-III	0/10			

*¹ M-I=mysis I stage, P-2=post-larva 2-day-old.

クルマエビの生息環境下で長期間伝染源となる可能性はないものと思われる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり貴重な御助言と本報告の御校閲を賜った東京水産大学・佐野徳夫教授に厚くお礼申し上げます。

なお、本研究費の一部は水産庁・魚病対策技術開発研究委託費によったことを付記して感謝する。

引用文献

- 荒武義信・栢村鶴雄 (1985): 暖地におけるカイロウイルスの自然不活化。蚕糸試験場彙報, **125**, 77-89.
- BELL, T. A. and D. V. LIGHTNER (1984): IHHN virus: Infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, **38**, 185-194.
- BELL, T. A. and D. V. LIGHTNER (1987): IHHN disease of *Penaeus stylirostris*: effects of shrimp size on disease expression. *J. Fish Diseases*, **10**, 165-170.
- CHEN, S. N., S. C. CHI, G. H. KOU and I. C. LIAO (1986): Cell culture from tissues of grass prawn, *Penaeus monodon*. *Fish Pathology*, **21**, 161-166.
- 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。日水誌, **54**, 45-48.
- 古田要二 (1981): 家蚕における核多角体のホルマリンお

よび熱処理による不活化。蚕糸研究, **118**, 105-112.

近藤 昭 (1973): 保存法。ウイルス実験学総論, 国立予防衛生研究所学友会編, 丸善, 東京, **48-59**.

LIGHTNER, D. V., L. L. MOHNEY, R. R. WILLIAMS and R. M. REDMAN (1987): Glycerol tolerance of IHHN virus of penaeid shrimp. *J. World Aquacult. Soc.*, **18**, 196-197.

桃山和夫 (1983). クルマエビのバキュロウイルス性中腸腺壊死症に関する研究—III, 仮診断法。魚病研究, **17**, 263-268.

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**, 141-146.

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.

MOMOYAMA, K. and T. SANO (1989): Developmental stages of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* Bate, highly susceptible to baculoviral mid-gut gland necrosis (BMN) virus. *J. Fish Diseases* (in print).

SANO, T., T. NISHIMURA, H. FUKUDA, T. HAYASHIDA and K. MOMOYAMA (1985): Baculoviral infectivity trials on kuruma shrimp larvae, *Penaeus japonicus*, of different ages. In A. E. ELLIS ed. "Fish and Shellfish Pathology", Academic Press, 397-403.

渡部 仁・清水孝夫 (1981): 養蚕農家にみられる最近の核多角体病流行の要因について。日蚕雑, **50**, 146-153.