クルマエビ類の急性ウイルス血症 (PAV) の 原因ウイルス PRDV の不活化

中野 平二*¹・平岡三登里*²・鮫島 守*¹
木村武志*³・桃山和夫*²

(1998年2月2日 受付)

Inactivation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), the causative agent of penaid acute viremia (PAV), by some chemical and physical treatments

Heiji Nakano*¹, Midori Hiraoka*², Mamoru Sameshima*¹,
Takeshi Kimura*³ and Kazuo Momoyama*²

*¹Kumamoto Prefectural Fisheries Research Center, Kumamoto 869-3603, Japan

*²Yamaguchi Prefectural Naikai Fisheries Experiment Station, Yamaguchi, 754-0893, Japan

*³Kumamoto Prefectural Department of Forestry & Fisheries Fisheries Development Division,
Kumamoto, 862-8570, Japan

(Received February 2, 1998)

Penaeid rod-shaped DNA viruses (PRDV) in tissue homogenates of the naturally infected shrimp were subjected to various chemical and physical treatments, and inactivation of the virus was examined by infection experiment. The infection was examined by the appearance of the virus-infected nuclei in stomach cuticular epidermis.

Disinfectants: The virus was inactivated by 1 min contact with 0.62 mg/l of oxidant or 30% of ethyl alcohol, by 10 min contact with 1 mg/l of sodium hypochlorite, 2.5 mg/l of povidone iodine, 5 g/l of formalin or 25 mg/l of trimethylammoniummethylene chloride, and by 60 min contact with 5,000 mg/l of sodium carbonate peroxyhydrate at 25°C.

NaCl: The virus was inactivated with 25% NaCl solution within 24 h.

Chloroform: The virus was inactivated with chloroform within 15 min.

Heat: The virus was inactivated within 60 min at 50°C, 1 min at 60°C and 0.2 min at 70°C, respectively.

Desciccation: The virus absorbed in a filter paper was inactivated within 3 h desciccation at about 26°C.

U.V. irradiation: PRDV was inactivated with U. V. irradiation of $1 \times 10^4 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$.

Key words: PRDV, PAV, inactivation, kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, white spot syndrome

クルマエビ類の急性ウイルス血症 (PAV) は、1993年にクルマエビ (*Penaeus japonicus*) の種苗とともに中国から日本に持ち込まれ、西日本のクルマエビ養殖場に大きな被害を与えた (中野ら, 1994)。その後、養殖中のクルマエビばかりでなく種苗生産過程および中間育成中のクルマエビとヨシエビ (*Metapenaeus ensis*) にも発生し

(Momoyama *et al.*, 1997), 栽培漁業推進上の大きな問題となっている。

本症については、これまでに疫学的調査および感染実験 (中野ら, 1994; Takahashi *et al.*, 1994), 病理組織 (桃山ら, 1994), 原因ウイルス PRDV (penaeid rod-shaped DNA virus) の形態とウイルス核酸の特性 (井上ら, 1994; Takahashi *et al.*, 1994; Inouye *et al.*, 1996), 病理解剖学的診断法 (Momoyama *et al.*, 1995), ウイルス精製法 (木村ら, 1995), PCR 法によるウイルス検出法 (木村

*¹ 熊本県水産研究センター

*² 山口県内海水産試験場

*³ 熊本県林務水産部水産振興課

ら, 1996; Takahashi *et al.*, 1996) などが明らかにされてきた。また, 近年アジア各国のクルマエビ類の養殖場で大きな被害を与えている White spot syndrome (WSS, Chou *et al.*, 1995), Systemic ectodermal and mesodermal baculovirus disease (SEMBV 病, Wongteerasupaya *et al.*, 1995), Non-occluded baculo-like virus disease (Baozhen *et al.*, 1995) などには PAV と同一のウイルスによる可能性が高い (Takahashi *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1996)。

本症を予防するためには, 原因ウイルスの化学的・物理的不活化条件を明らかにし, 環境中ウイルスの不活化および感染環の遮断を行うことが必要であるが, 甲殻類由来のウイルスの不活化については桃山 (1989a, b, c), LeBlanc and Overstreet (1991a, b) の報告があるにすぎない。そこで, 著者らは PAV で病死したクルマエビのホモジネート濾液を用いた感染実験により, PRDV の化学的・物理的不活化条件について調べたので報告する。

材料および方法

1 供試クルマエビ

熊本, 山口県内の PAV 未発生養殖場から導入した, 平均体重 0.62~9.86 g の健康なクルマエビを用いた。

2 供試ウイルス液

供試ウイルス液の作製方法は, 前報 (中野ら, 1994) に準じた。すなわち, 実験感染させてひん死状態となったクルマエビの中腸腺を除いた頭胸部に10倍量の Hanks' BSS を加えてホモジナイズし, 4,000 g, 5°C, 15分間遠心分離した。その上清を孔径 450 nm のメンブレンフィルターで濾過したものをウイルス原液とし, 1 ml ずつスクリーバイアルに分注後 -80°C で保存した。

本ウイルス原液の筋注法によるクルマエビに対する LD₅₀ 値は 10^{-9.1} ml/体重 (g) であった。

3 ウイルス不活化方法

(1) 化学的不活化

以下の化学的不活化の操作は, 恒温水槽を用いて25°C の温度条件下で行った。

塩素剤・ヨード剤

滅菌濾過海水で 10^{-4.6} に希釈したウイルス液 50 ml に塩素剤 (和光純薬製, 有効塩素濃度 5 %) またはヨード剤 (明治製菓製, 有効ヨウ素濃度 1 %) をそれぞれ, 有効塩素濃度 1.0, 2.5, 5.0 mg/l, 有効ヨウ素濃度 2.5, 5.0, 10.0 mg/l となるように加えて混合した。10分間作用させた後, 必要量のチオ硫酸ナトリウム溶液を加えて中和し

作用を停止させた。ウイルス液中に含まれる有機物による各消毒剤の添加10分後の消費量はいずれの濃度においても10%以下であった。

オゾン

オゾン発生装置 (VNISOID 製) で発生させたオゾンを溶存させて得た 1 mg/l の残留オキシダントを含む海水を 0.36, 0.62, 1.00 mg/l の濃度に調製後, 各濃度の残留オキシダントを含む海水 50 ml と滅菌濾過海水で 10^{-1.6} に希釈したウイルス液 0.05 ml を混合し, 1 分後に必要量のチオ硫酸ナトリウム溶液を加えて作用を停止させた。ウイルス液添加 1 分後に消費された残留オキシダント量はいずれの濃度においても約10%以下であった。なお, 残留オキシダント濃度はヨウ素滴定法 (伊藤ら, 1997) で測定した。

エタノール・ホルマリン

エタノール (和光純薬製, 試薬特級) またはホルマリン (和光純薬製, 試薬特級) を滅菌濾過海水でエタノールは 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 %, ホルマリンは 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 g/l にそれぞれ調製した溶液各 4 ml にウイルス原液 0.1 ml を加えて混合した。エタノールは 1 分間, ホルマリンは 10 分間作用後, それぞれ滅菌濾過海水で 10⁻² に希釈して作用を停止させた。

逆性石鹼・炭酸ナトリウム過酸化水素付加物

滅菌濾過海水で 10^{-2.6} に希釈したウイルス液 50 ml に逆性石鹼 (エーザイ製, 塩化トリメチルアンモニウムメチレン 10 % 含有) または炭酸ナトリウム過酸化水素付加物 (日本パーオキシサイド製, 原末) をそれぞれ, 塩化トリメチルアンモニウムメチレンは 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 mg/l, 炭酸ナトリウム過酸化水素付加物は 100, 500, 1,000, 5,000 mg/l となるように加えて混合した。逆性石鹼は 10 分間作用後, 炭酸ナトリウム過酸化水素付加物は 60 分間作用後, 10 倍希釈して作用を停止させた。

食塩

0.0, 3.0, 6.0, 12.5, 25.0 % の食塩 (片山化学製, 試薬特級) 水 5 ml にウイルス原液 0.05 ml を加えて混合した。6, 12, 24, 48 時間静置後, 滅菌濾過海水で 10⁻¹ に希釈した。

クロロフォルム

石井 (1973) にほぼ準じた。すなわち, ウイルス原液 1 ml を入れた 2 本のマイクロチューブの 1 本にはクロロフォルムを, 他の 1 本には滅菌濾過海水を各 0.1 ml 加え, ととき激しく振とうし, 室温で 15 分放置した。その後 12,000 g で 15 分間遠心分離を行い, その上清を滅菌濾過海水で 10⁻² に希釈した。

(2) 物理的不活化

熱

あらかじめ恒温水槽で 40, 50, 60, 70°C に設定した滅菌濾過海水 24 ml を入れた試験管にウイルス原液を 0.3 ml 加えて手早く混合後、再び恒温水槽に戻して静置した。所定の時間を経過したのち、室温の滅菌濾過海水で $10^{-1.7}$ に希釈して作用を停止させた。

乾燥

ウイルス原液 0.5 ml を直径 9 cm のグラスファイバー製濾紙上に滴下後、クリーンベンチ内で送風して乾燥させた。濾紙の重量が恒量に達した後、0.5, 1.0, 2.0, 3.0 時間乾燥後、はさみで濾紙を細断し、滅菌濾過海水 20 ml の中に投入して、スターラで強くかき混ぜ、その上澄み液をウイルス液とした。なお、処理は気温 26°C に調節された室内で行った。乾燥時の含水率は乾燥開始 1 時間後に 3.7% となりその後一定であった。

紫外線

滅菌濾過海水で $10^{-3.6}$ に希釈したウイルス液 2 ml を内径 5.8 cm のガラスシャーレに入れ（液層 0.7 mm）、紫外線ランプ直下 50 cm の位置で（照射強度 $100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、トプコン UVR-254 型により測定）水平振とう器で低速で攪拌しながら 10, 20, 50, 100, 300 秒間紫外線を照射した。

不活化効果の判定方法

6～10 尾の供試クルマエビに所定の不活化処理をしたウイルス液を、体重が 2 g 未満のエビには 1 尾あたり 0.05 ml、それ以上の体重のエビには 0.1 ml を腹部筋肉内に接種し、30 l ポリカーボネイト製水槽または 100 l プラスチック製水槽に収容し、水温 22～30°C の範囲内で 3～4 日間飼育した。

試験終了時に生残していた個体を無作為に 5 尾（5 尾以下の場合は生残した全ての個体）採取し、暗視野顕微鏡診断法（Momoyama *et al.*, 1995）によって、全ての個体の胃または頭胸甲鰓蓋部の上皮細胞層にウイルス感染核が認められなかった場合を不活化されたものと判定した。なお、ウイルス液接種後の病変の進行経過については Table 1 に示した如く、3～4 日後には重症となり、暗視野顕微鏡診断法によっても明瞭に感染の有無が判定可能であることをあらかじめ確認した。

結 果

1 化学的不活化

PRDV は有効塩素濃度 1 mg/l 10 分間、有効ヨウ素濃度 2.5 mg/l 10 分間、残留オキシダント濃度 0.62 mg/l 1 分間、

Table 1. Detection of infected nuclei in the stomach cuticular epidermis of *P. japonicus* by dark-field microscopy and conventional histology after intramuscular injection with PRDV

Hours after injection	Individ. No.	Dark-field microscopy	conventional histology
0	1	—	—
	2	—	—
	3	—	—
6	1	—	—
	2	—	—
	3	—	—
12	1	—	—
	2	—	+
	3	—	+
24	1	—	++
	2	—	+
	3	++	++
48	1	—	++
	2	++	++
	3	+	++
72	1	++	++
	2	—	+
	3	++	++

—: Not detected, +: few detected, ++: many detected

エタノール 30% 1 分間、ホルマリン 5 g/l 10 分間、塩化トリメチルアンモニウムメチレン 25 mg/l 10 分間、炭酸ナトリウム過酸化水素化物 5,000 mg/l 60 分間の処理でそれぞれ不活化された（Table 2）。また PRDV は食塩濃度 12.5% 以下では活性を維持していたが 25% では 24 時間以内に不活化された（Table 3）。さらにクロロフォルム処理によって不活化され、クロロフォルムに感受性を示した（Table 4）。

2 物理的不活化

PRDV は 40°C 120 分間の熱処理では不活化されなかったが、50°C では 60 分間の熱処理で不活化され、60°C では 1 分以内、70°C では 0.2 分以内にそれぞれ不活化された（Table 5）。

乾燥処理では PRDV は乾燥処理開始後 2 時間までは活性を示していたが、3 時間後では不活化された（Table 6）。

また PRDV は紫外線処理では紫外線照射量 $5 \times 10^3 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ で大部分が不活化され、 $1 \times 10^4 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ では完全に不活化された（Table 7）。

Table 2. Virucidal effect of some disinfectant variables on PRDV exposed at 25°C

Disinfectant variables	Exposure time (min)	Dilution rate*	Concentration	Incidence of infection (No.) infected / (No.) examined
Sodium hypochlorite	10	$10^{-4.6}$	5.0 (mg/l)	0/5
			2.5	0/5
			1.0	0/5
			0.0	4/4
Povidon-iodine	10	$10^{-4.6}$	10.0 (mg/l)	0/5
			5.0	0/5
			2.5	0/5
			0.0	4/4
Oxidant	1	$10^{-4.6}$	1.00 (mg/l)	0/5
			0.62	0/5
			0.36	5/5
			0.00	5/5
Ethyl alcohol	1	$10^{-1.6}$	40 (%)	0/5
			30	0/5
			20	5/5
			10	5/5
			0	5/5
Formalin	10	$10^{-1.6}$	10.0 (g/l)	0/5
			5.0	0/5
			2.5	4/5
			1.0	5/5
			0.0	5/5
Trimethylammoniummethylenchloride	10	$10^{-2.6}$	50 (mg/l)	0/5
			25	0/5
			10	3/5
			5	2/5
			0	4/5
Sodium carbonate peroxy hydrate	60	$10^{-2.6}$	5,000 (mg/l)	0/5
			1,000	2/5
			500	2/5
			100	1/5
			0	2/5

* Virus suspension (LD_{50} value: $10^{-9.1}$) prepared from infected shrimp with PRDV was contacted with each variable in indicated dilution rate with sea water.

Table 3. Inactivation of PRDV by various NaCl concentrations

NaCl concentration (%)	Exposure time (hour) at 25°C			
	6	12	24	48
	(No.) infected / (No.) examined			
25.0	3/5	3/5	0/5	0/5
12.5	5/5	5/5	5/5	5/5
6.0	5/5	5/5	5/5	5/5
3.0	5/5	5/5	5/5	5/5
0.0	5/5	5/5	5/5	4/5

Table 4. Inactivation of PRDV by chloroform

chloroform treatment	Incidence of infection (No.) infected / (No.) examined
Yes	0/5
No	5/5

Table 5. Inactivation of PRDV by heat

Temperature (°C)	Heat time (minute)				
	0.2	1	10	60	120
	(No.) infected / (No.) examined				
40	NT	NT	5/5	5/5	5/5
50	NT	NT	4/5	0/5	0/5
60	NT	0/5	0/5	0/5	NT
70	0/5	0/5	NT	NT	NT

NT: Not tested.

Table 6. Inactivation of PRDV by desiccation

Drying time (hour)	Degree of dryness (%)* ¹	Incidence of infection* ²
0	44.3	NT* ³
0.5	3.7	5/5
1	3.7	2/5
2	3.7	2/5
3	3.7	0/5

*1 Degree of dryness was indicated as percentage of the water content in a filter paper which had been absorbed 0.5 ml inoculum.

*2 Number of shrimp infected / number of shrimp examined.

*3 Not tested.

考 察

甲殻類由来の病原ウイルスの不活化については、封入体非形成の BMNV (桃山, 1989a, b, c) と封入体形成の

Table 7. Inactivation of PRDV by U.V. irradiation

U.V. irradiation time (s)	U.V. dosage (μW • sec/cm ²)	Incidence of infection*
0	0	5/5
10	1 × 10 ³	5/5
20	2 × 10 ³	4/5
50	5 × 10 ³	1/5
100	1 × 10 ⁴	0/5
300	3 × 10 ⁴	0/5

* (No.) infected / (No.) examined

BP (LeBlanc and Overstreet, 1991a, b) に関する報告があるにすぎない (Table 8)。本研究によって、通常用いられる方法による PRDV の不活化法が明らかになった。これらの方法は、いずれも感染組織の摩砕濾液を供試ウイルス液としたバイオアッセイ法によって得られているが、化学的に不安定なハロゲン系消毒剤等については、ウイルス液中に含まれる有機物によって効果が低下することが知られている (綿貫ら, 1980)。PRDV についての実験では、それらの消毒剤に対する有機物の影響を無視し得るまで減少させるには、供試ウイルス液を 10^{-4.6} に希釈する必要があった。Table 8 に示すように、BMNV と PRDV については多くの処理方法で近似の値が得られているが、BP に対する値は他の 2 種類のウイルスに対する値に比べるとほとんどの処理方法でかなり高い値となっている。この原因については、BP の供試ウイルス液中には封入体およびかなり高い濃度の有機物が含まれていた

Table 8. Comparison of inactivation values among penaeid shrimp viruses by chemical and physical variables

Chemical and physical variable	BP* ¹	penaeid shrimp viruses	
		BMNV* ²	PRDV* ³
Sodium hypochlorite	200 mg/l - 60 min	5 mg/l - 10 min	1 mg/l - 10 min
Povidon-iodine		25 mg/l - 10 min	2.5 mg/l - 10 min
Ethyl alcohol		30% - 10 min	30% - 1 min
Formalin		5 g/l - 10 min	5 g/l - 10 min
NaCl concentration		25% - 10 h	25% - 24 h
Heat	60°C - 10 min	12.5% - 24 h	
		60°C - 5 min	70°C - 0.2 min
		50°C - 30 min	60°C - 1 min
Desciccation	48 h		50°C - 60 min
U.V. irradiation (μW • sec/cm ²)	7.08 × 10 ⁶	1 h	3 h
		4 × 10 ⁵	1 × 10 ⁴

*¹: From LeBlanc and Overstreet (1991a, b)

*²: From Monoyama (1989a, b, c)

*³: Present study

可能性が考えられる。

現在、全国の栽培漁業センター等ではPAVの予防対策としてPRDVフリー親エビの選別とともに受精卵の洗浄が広く実施されている。この洗浄用海水には多くの機関で紫外線照射海水等が使われているが、消毒剤を併用することで更に効果を高めることができると考えられる。今回の実験でPRDVは有効ヨウ素濃度2.5 mg/l 10分間および塩化トリメチルアンモニウムメチレン 25 mg/l 10分間の接触で不活化された。桃山(1988)によれば、クルマエビの受精卵に対するヨード剤と逆性石鹼の毒性はヨード剤で5 mg/l 10分間、逆性石鹼の塩化ベンザルコニウムと塩化ベンゼトニウムで100 mg/l 10分間までは現れていないことからヨード剤および逆性石鹼による受精卵の消毒は十分実用化の可能性があると見える。

クルマエビ類の養殖場、種苗生産場においてPAVの予防を考えると、その消毒対象物は用水、施設、器具、作業員の手足など極めて広範囲に及んでいる。疫学調査の結果、隣接した養殖場間ではPAVが短期間に広がっている(中野ら, 1994)ことから、本症の伝播には用水が関与していることが強く疑われる。したがって、防疫上の観点からウイルスフリーの用水の確保は重要である。PRDVは $5 \times 10^3 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ の紫外線照射量で大部分が不活化された。この値は魚類病原ウイルスについて吉水ら(1986)が分類した紫外線高感受性グループおよび大腸菌と同等の値である。これらのことから、種苗生産場・中間育成場ではもちろんのこと、陸上式および全築堤式養殖場においても飼育管理技術の改良によって1日の換水率を数%程度に低下させることができれば、紫外線照射によってウイルスフリー用水の確保が可能であろう。

PRDVに汚染された施設、器具およびクルマエビの飼育作業に従事する担当者の手足の消毒は塩素剤、ヨード剤、逆性石鹼などを、それぞれの消毒剤の特徴により使い分けることで、容易に実施できると考えられる。しかし、養殖場底砂の消毒は多量の有機物が含まれているために、消毒剤による化学的不活化は容易ではない。PRDVは乾燥処理により比較的短時間で不活化された。一般的にウイルスは乾燥状態では安定であることを考慮すると、今回のPRDVの不活化には塩分濃度の上昇が大きく関係していると考えられるが、これは陸上式と全築堤式養殖池の乾燥と同じ条件である。したがって、養殖場の底砂を干出させた後に耕耘作業を行い乾燥状態をできるだけ長期間維持することが重要であろう。

また、PRDVはPCR法により様々な甲殻類から検出さ

れていること(Lo *et al.*, 1996)から、PAVが発生した養殖場の消毒を行う際には、塩素剤を用いて養殖池内に生残しているPRDVのキャリアーとなり得る甲殻類の駆除を同時に行うことも重要である。

国内のクルマエビ養殖の形態は換水量が少なく、養殖池の乾燥が可能な陸上式および全築堤式養殖場と換水量が多く、施設の乾燥が行いにくい半築堤式養殖場の2つに分けることができる。前者でのPAV予防対策は飼育開始前に施設、器具、養殖池底砂の化学的処理・物理的処理による消毒ならびに消毒剤を使用したキャリアーの可能性のある生物の駆除を行い、飼育開始後は用水の紫外線照射や手足の消毒などの日常的な衛生管理を徹底することがあげられる。また後者では、頻繁に底砂の耕耘を行いキャリアーとなりうる生物を取り除いた後、炭酸ナトリウム過酸化水素付加物等での底砂の消毒や、長期間の休業による宿主の駆除等が対策として考えられる。熊本県において1996年から用水の紫外線照射を除くこれらの対策を実施した結果、1996年、1997年には養殖生産量の回復がみられている。

要 約

PRDVの化学的・物理的不活化条件をバイオアッセイ法によって調べた。その結果、化学的処理では有効塩素濃度1 mg/l 10分間、有効ヨウ素濃度2.5 mg/l 10分間、残留オキシダント0.62 mg/l 1分間、エタノール30% 1分間、ホルマリン5 g/l 10分間、塩化トリメチルアンモニウムメチレン 25 mg/l 10分間、炭酸ナトリウム過酸化水素付加物5,000 mg/l 60分間、食塩25% 24時間、クロロフォルム処理でそれぞれ不活化された。また、物理的処理では加熱50°C 60分間、60°C 1分間、70°C 0.2分間で、乾燥3時間で、紫外線照射量 $1 \times 10^4 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ でそれぞれ不活化された。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、貴重なご助言を賜りました水産庁資源生産推進部研究指導課井上潔博士に深謝します。

なお、本研究の一部は水産庁・魚病対策技術開発研究委託費および水産庁・海外悪性伝染病影響評価シュミレーションモデル開発委託費によったことを付記して感謝します。

文 献

Baozhen, P., R. Jiaming, S. Juying, Z. Guoying, G. Huiting, S.

- Yalin, Z. Guoxing and G. Zuxum (1995): The studies on baculovirus-caused disease of prawns (*Penacus chinensis* Osbeck) in Shanghai suburb. *Chinese J. of Virol.*, **11**, 151-157.
- Chou, H. Y., C. Y. Huang, C. H. Wang, H. C. Chiang and C. F. Lo (1995): Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **23**, 165-173.
- 井上 潔・三輪 理・大迫典久・中野平二・木村武志・桃山和夫・平岡三登里 (1994): 1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死: 電顕観察による原因ウイルスの検出. 魚病研究, **29**, 149-158.
- Inouye, K., K. Yamano, N. Ikeda, T. Kimura, H. Nakano, K. Momoyama, J. Kobayashi and S. Miyajima (1996): The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathol.*, **31**, 39-45.
- 石井慶蔵 (1973): ウイルス粒子の性状の検索法と群別. ウイルス実験学総論, 国立予防衛生研究所学会編, 丸善, 東京, 472-478.
- 伊藤慎悟・吉水 守・絵面良男 (1997): 人工海水中における低濃度オキシダントの魚類病原微生物に対する殺菌・不活化効果. 日本水産学会誌, **63**, 97-102.
- 木村武志・中野平二・桃山和夫・山野恵祐・井上 潔 (1995): 養殖クルマエビの“RV-PJ 感染症”原因ウイルスの精製. 魚病研究, **30**, 287-288.
- 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**, 93-98.
- LeBlanc, B. D and R. B. Overstreet (1991a): Effect of desiccation, pH, heat, ultraviolet on irradiation viability of *Baculovirus penaei*. *J. Inverte. Pathol.*, **57**, 227-286.
- LeBlanc, B. D and R. B. Overstreet (1991b): Effect of calcium hypochlorite as a disinfectant against the shrimp virus *Baculovirus penaei*. *J. Aquat. Anim Health*, **3**, 141-145.
- Lo, C-F., C-H. Ho, S-E. Peng, C-H. Chen, H-C. Hsu, Y-L. Chiu, C-F. Chang, K-F. Liu, M-S. Su, C-H. Wang and G-H. Kou (1996): White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 215-225.
- 桃山和夫 (1988): 数種消毒剤のクルマエビの受精卵およびノウブリウスに対する毒性. 山口県内海水産試験場報告, **18**, 1-5.
- 桃山和夫 (1989): 消毒剤によるバキュロウイルス性中腸腺壊死症 (BMN) ウイルスの不活化効果. 魚病研究, **24**, 47-49.
- 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**, 115-118.
- 桃山和夫 (1989): バキュロウイルス性中腸腺壊死症ウイルス (BMNV) のエーテル, 食塩濃度および pH に対する抵抗性. 魚病研究, **24**, 175-177.
- 桃山和夫・平岡三登里・中野平二・河邊 博・井上 潔・大迫典久 (1994): 1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死: 病理組織観察. 魚病研究, **29**, 141-148.
- Momoyama, K., M. Hiraoka, K. Inouye, T. Kimura and H. Nakano (1995): Diagnostic techniques of the rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, **30**, 263-269.
- Momoyama, K., M. Hiraoka, K. Inouye, T. Kimura, H. Nakano and M. Yasui (1997): Mass mortalities in the production of juvenile greasyback shrimp, *Metapenaeus ensis*, caused by Penaeid Acute Viremia (PAV). *Fish Pathol.*, **32**, 51-58.
- 中野平二・河邊 博・梅沢 敏・桃山和夫・平岡三登里・井上 潔・大迫典久 (1994): 1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死: 発生状況および感染実験. 魚病研究, **29**, 135-139.
- Takahashi, Y., T. Itami, M. Kondo, M. Maeda, R. Fujii, S. Tomonaga, K. Supamattaya and S. Boonyaratpalin (1994): Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathol.*, **29**, 121-125.
- Takahashi, Y., T. Itami, M. Maeda, N. Suzuki, J. Kasornchandra, K. Supamattaya, R. Khongpradit, S. Boonyaratpalin, M. Kondo, K. Kawai, R. Kusuda, I. Hirono and T. Aoki (1996): Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricius. *J. Fish. Dis.*, **19**, 399-403.
- 綿貫 喆・實川佐太郎・榊原欣作編 (1980): 医科器械学叢書3, 滅菌法・消毒法第3集, 文光堂, 252 p.
- Wongteerasupaya, C., J. E. Vickers, S. Sriurairatana, G. L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul and T. W. Flegel (1995): A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 69-77.
- 吉水 守・瀧澤宏子・木村喬久 (1986): 魚類病原ウイルスの紫外線感受性. 魚病研究, **21**, 47-52.