

さけ・ます類採卵親魚の病原体保有状況調査

調査マニュアル

- ウイルス編 -

(独)水産総合研究センター

増養殖研究所

魚病診断・研修センター

2011年 8月

Ver 1.02

目 次

はじめに	-----	1
調査に必要な機材リスト	-----	2
1. 野外調査による検査用標本の採取	-----	3
(1) 野外調査における留意事項	-----	3
(2) 調査前の準備	-----	3
(3) 標本採取	-----	4
ア. 採卵用親魚の搬入及び整列・魚体測定	-----	4
○必要な器具・消耗品及び方法	-----	4
イ. 体腔液の採取手順	-----	4
○必要な器具・消耗品及び方法	-----	4
(4) 調査後の体腔液処理	-----	6
ア. 体腔液の処理	-----	7
○器具・消耗品及び方法	-----	7
イ. 検査用標本の保存・運搬	-----	7
○器具・消耗品及び方法	-----	7
2. 細胞培養とウイルス分離	-----	8
(1) 細胞培養による検出	-----	8
ア. MEM 培養液の調整	-----	8
○必要な試薬類・器具及び方法	-----	8
イ. 無菌室内の操作手順	-----	8
ウ. 細胞培養及びプレート作製	-----	10
○器具・消耗品及び試薬等	-----	11
エ. 細胞培養	-----	12
オ. 体腔液の接種及び盲経代	-----	16
○器具・消耗品及び方法	-----	16
カ. ウイルスの同定	-----	16
付 録	-----	17
1. 抗生剤(Anti Ink)の調整	-----	17
2. 1M Trisの調整	-----	17
3. 0.02%EDTA 含む PBS 液の調整	-----	17
4. ウイルスの定量(TCID50)	-----	17
5. RT-PCR による IHNV 検出のための試薬調整	-----	20

はじめに

さけます親魚の病原体保有状況調査は、さけます放流事業にとって健康種苗生産に繋がる重要な調査です。近年は消毒剤(イソジン)による魚卵消毒が実施され、孵化場での多くの重要疾病の発生が未然に防がれています。しかしながら、今後魚卵消毒の徹底を促し、また新たな病気の発生を防ぐためにも、孵化稚魚に甚大な被害を与える重要疾病について、親魚の病原体の保有状況について常時監視しておくことが必要です。特に、さけます類では持続的養殖生産確保法の「特定疾病」や国際獣疫事務局(OIE)のリスト疾病に指定されている疾病が数多くあることから、これらに対する監視は極めて重要です。本マニュアルではこれら指定されている疾病の多くがウイルス病であり、且つ原因ウイルスが培養可能であることから、ウイルス分離を主な調査目的としてマニュアルを作成しました。

なお、本マニュアルは旧札幌魚病診断・研修センターの水産総合研究センター運営費交付金課題「新興性又は再興性等重要疾病の迅速・早期診断法の開発とマニュアル化」で作成したマニュアルを基にしており、基となったマニュアルは旧センターの梅田勝博元魚病診断・研修指導員、會田正裕元魚病診断専門員、奥川元一元魚病診断・研修指導員、坂上哲也元研修指導係長の尽力により作成されたものです。

今年度から実施するウイルス保有状況調査に関しては、魚体測定や年齢査定、細菌検査等、個体識別をして結果を照合する必要がない場合が多く、その場合、採材は体腔液のみとなります。体腔液だけですとかなりの作業を簡略化できますので、基本を押さえ、不必要なところは省略して効率的に実施して頂ければと考えます。

体腔液採取は採卵前に採卵台上で排卵口(生殖孔)にチップを挿入し、体腔液を約1mlを採取し、その場でポリスピッツに移す。そのあとマキリを挿入し採卵してもらう。採卵ペースに合わせ体腔液を採取すると採卵作業の邪魔にならず、魚を並べるテーブル等の設置も不要であり、現場の方の理解と協力を得やすい。60尾の採材は長くても30分を要しない。

以後の記述は個体識別をし、魚体測定をして採鱗、採血、体腔液採取、開腹、採卵、細菌検査と続く検査手法を述べたものです。本マニュアルが有効に活用されることを期待しています。

魚病診断・研修センター 大迫典久

調査に必要な機材リスト(現場での使用品)

	品目		数量	(変更)	単位	種目	目的	備考
1	番号札 (必要に応じて)	<input type="checkbox"/>	2			一般	魚体識別	1~60 番を入れた 名刺大コピー用紙
2	アルコール棉	<input type="checkbox"/>	1		個	一般	消毒	
3	アルコールスプレー	<input type="checkbox"/>	1		本	一般	消毒	
4	予備消毒アルコール	<input type="checkbox"/>	1		本	一般	消毒	
5	ハンドタオル	<input type="checkbox"/>	3		組	一般		
6	キムワイプ	<input type="checkbox"/>	1		組	一般		
7	キムタオル	<input type="checkbox"/>	3		組	一般		
8	ビニール袋 (特大)	<input type="checkbox"/>	3		枚	一般	ゴミ回収	
9	ビニール袋 (大)	<input type="checkbox"/>	10		枚	一般	ゴミ回収	
10	ビニール袋 (小)	<input type="checkbox"/>	数		枚	一般		
11	ビニール袋 (チャック付き J-4)	<input type="checkbox"/>	1		包	一般	ゴミ回収	
12	ガムテープ	<input type="checkbox"/>	1		本	一般		布製
13	マジック	<input type="checkbox"/>	2		本	一般		
14	アルミホイル	<input type="checkbox"/>	1		本	一般		
15	体腔液用 1ml 専用ピペット (P-ホ-イ)	<input type="checkbox"/>	2		本	体腔液採集	ウイルス	送付済
16	体腔液用チップ (ピペ-ットホ-イ)	<input type="checkbox"/>	180		本	体腔液採集	ウイルス	送付済、予備 200 本
17	汎用オートピペット (1ml)	<input type="checkbox"/>	1		本	体腔液採集	分注用	
18	チップ (マイクロピペ-ット用 1ml)	<input type="checkbox"/>	1		個	体腔液採集	分注用	
19	スピッツ管	<input type="checkbox"/>	120		本	体腔液採集	ウイルス	60 本 2 組 (予備有)
20	試験管立て (スピッツ用)	<input type="checkbox"/>	2		個	体腔液採集		
21	カップ	<input type="checkbox"/>	1		組			
22	長靴	<input type="checkbox"/>	1		組			
23	その他	<input type="checkbox"/>						
		<input type="checkbox"/>						
	* 当日用意する物 *	<input type="checkbox"/>						
24	氷	<input type="checkbox"/>	2		個	一般	冷蔵	
25	抗生剤	<input type="checkbox"/>	1		本	ウイルス検査		65ml/1 カ所

1. 野外調査による検査用標本の採集

(1) 野外調査における留意事項

さけ・ます類におけるウイルス保有状況の調査方法については吉水・野村(1989)に述べられており、検査は採卵用親魚の体腔液を対象とする。

特に、野外調査では環境中の雑菌の検査試料への混入を防ぐことが重要である。

(2) 調査前の準備

【器具・消耗品】 (調査に必要な機材リスト参照)

- 簡易テーブル: 調査に用いる器具等の配置用
- 作業用テーブル: 10~15尾ほどの供試魚の整列用
- ポリ袋(特大): 器具用テーブルへの敷設用 <アズワン(株)、550×900mm>
- アルコールスプレー: 器具用テーブルの消毒用
- 市販キムタオル: 器具用テーブルの清掃用<アズワン(株)、四つ折タイプ、100枚入>
- ゴミ収容箱(数個): ゴミ及び使用済み器具等の回収用

【方法】

○調査室又は採卵舎内に採卵用親魚(以下「供試魚」)10~15尾を並べる作業用テーブルを設置する。

○調査に必要な器具等を載せるため器具用テーブルを設置する。器具用テーブルはビニールを敷いてその上に70%エタノールを噴霧し、市販のキムタオル等で清掃する。

<写真>



作業用テーブル



器具用テーブル
(ビニールをひき、消毒する)



器具用テーブル
(器材を並べたところ)

(3) 標本採取

ア. 採卵用親魚の搬入及び整列・魚体測定

【器具・消耗品】

- ト口箱: 5尾程度の供試魚の搬入用
- 番号札: 供試魚の個体識別用
- 魚体測定板: 供試魚の体長・体重測定用
- は必要に応じて用意。

【方法】

- 調査では数尾ずつの供試魚をト口箱等に入れ、調査室内に並べる。
- 作業用テーブルに供試魚を並べ、個体識別できるように魚体に番号札を付ける。
- 供試魚は魚体測定(尾叉長・体重)及び年齢査定のための採鱗を行う。
- :は必要に応じて実施。

<写真>



供試魚をト口箱にいれる



番号札を貼る



体長・体重測定

イ. 体腔液の採集手順 (無菌操作を基本とする。)

【器具・消耗品】

- 汎用オートピペット: 体腔液の吸引専用 <エクセルモノピペット 8000、1000 μ l>
#チップが細長くて丈夫、予備が必要なので数本用意。
- 滅菌チップ: 体腔液の採取専用
<エクセルピペットチップL、250用、1000 μ l>
- アルコール綿(カット綿使用): 供試魚の生殖孔周辺の消毒用
<医療脱脂綿、5×5cm>
- スピッツ管: 体腔液の注入用 <滅菌済み 10ml>
- 試験管立て: 体腔液入りスピッツ管の保管用



【方法】

- 体腔液の採取に必要な器具等を作業用テーブル及び器具用テーブルに配置する。
- (●魚体測定を行った後に再び)供試魚を作業用テーブルに並べ、アルコール綿で生殖孔周辺を拭き消毒する。この時、腹部を押さえ十分に成熟したメスであることを確認する(未熟だと体腔液が取れない)。●:は必要に応じて実施。
- 生殖孔は肛門とほぼ同じ位置にあるので、穴の場所を確認する。魚種によっても異なるが、若干入り口が突き出ているのが生殖孔である。
- 滅菌チップを装着した1ml ピペットを、ノブを押してチップ内の空気を排出させた状態にして、ゆっくりと生殖孔に挿入する。体軸と平行にチップを滑らせながらチップの根本まで差し込む。体軸と垂直方向に差し込むと、卵巣膜を突き破り腎臓に達する場合もある。本来チップを挿入すると毛細管現象で体腔液が入ってくる。ただ時間節約と取り出すときの手間を考えオートピペットを使用する。
- ゆっくりと押したノブを戻しながら体腔液を丁寧に吸引する(各検体1ml)。うまく吸引できない場合は、チップの先端が詰まるか塞がっている可能性があるため、再度ノブを押してからチップの先端の位置をずらして吸引する。
- なお、チップを生殖孔から引き抜くとき、体腔液の吸引が十分ではなく(1ml よりかなり少ない)、途中で吸引が止まった状態であると、生殖孔からチップが抜けた瞬間に一気にピペットが吸い込んだ空気と共に体腔液がピペット内部まで吸い込まれてしまい、ピペットを汚染してしまう。そうならぬように、チップのノブを半押ししたまま空気を吸い込まぬように、チップを生殖孔から抜くようにする。
- 吸引した体腔液は滅菌したプラスチックのスピッツ管に直ちにを入れる。コンタミを防ぐため蓋の開閉は極力短時間に行う。
- 滅菌チップは個体ごとに新しいものを用いる。
- 体腔液は終了後直ちに冷蔵する。

<写真>



アルコール綿による生殖孔の消毒



生殖孔へチップを差し込む



チップの根本まで入れる



2人で組んでスピッツ管に体腔液を入れる。

[操作上の注意]

- ・チップは使用前に先端が他(作業衣、指など)に触れた場合、必ず新しいものに交換する。
- ・肛門へ挿入してしまったチップは体腔液採集には使用せず使用済み回収箱に入れる。
- ・体腔液をピペット本体まで吸い込んでしまった場合にはその体腔液は供試するが、ピペットは必ず交換し、次の分解作業を行う(ピペット本体内部が汚染された可能性があるため)。
- ・研究室に戻ったら、念のため体腔液吸引用オートピペットを分解しアルコールで消毒・洗浄後、リングにワセリンを塗り、次回の調査に備える。(常に予備ピペットを用意しておく)
- ・体腔液の採取には、①生殖孔周辺を消毒、②体腔液を採取、③注入するポリスピッツ管を保持する作業があり、事前に分担を確認しておくのと速やかに実施できる。
- ・体腔液標本は保冷(発泡)ケースに入れて氷冷し、野外での調査終了後に抗生剤を注入するまで保存する。
- 採取した体腔液は供試魚の個体番号を確認しながら、同様に番号付の滅菌ポリスピッツ管に注ぐ(●: 必要に応じ、個体識別をした場合)。

(4) 調査後の体腔液処理

体腔液を 0.45 μ m フィルターで濾過除菌し、培養細胞に接種する方法が一般的であるが、ウイルスによっては濾過効率が悪く、IHNV で 90~99%、ヘルペスウイルスでは 99% 以上が濾過膜に捕捉されてしまう。そのため抗生物質液 (Anti Ink; ペニシリン 1,000 IU, ストレプトマイシン 1,000 μ g, マイコスタチン 800 U/ml HBSS 等) で1晩処理後、接種する方法を採用している。フィルターと注射器の節約、廃棄物量の軽減にもつながっている。細胞数は開放系 (プレート) で 2.0×10^5 cells/ml、閉鎖系で 1.5×10^5 cells/ml を目安とする。細胞量は 24 well プレートで 1 ml, 98 well プレートで 100 μ l, 試料の接種量は 24 well プレートで 100 μ l, 98 well プレートで 50 μ l が一般的である。接種翌日細胞を観察し、毒性の有無をチェックする。魚の棲息温度で 1~2 週間培養し、その間 CPE 発現の有無を観察

する。ウイルスの科により特有の CPE を示す。

ア. 体腔液の処理

【器具・消耗品】

- 抗生剤 (Anti Ink)： 調整方法 付録 1 参照
- 汎用オートピペット 及び滅菌チップ 1000 μ l(1ml) 用
- 試験管立て(スピッツ管用)、

【方法】

- 採取した体腔液を氷冷した状態で速やかに屋内施設(実験室等)に運び入れる。
- 机をアルコール噴霧器などでよく消毒し、抗生剤 (Anti Ink)、ピペット、チップなどの必要な器具等をテーブルに配置する。
- 体腔液を保管箱からとりだし机に並べる。
- 汎用オートピペットに滅菌チップ(1000 μ l)を付け、蓋を開けた抗生剤から 1000 μ l を取り、スピッツ管の体腔液に注入し、蓋を閉めてから十分転倒して攪拌する。



机上にセットされた器材



抗生剤をピペットで取る

イ. 検査用標本の保存・運搬

【器具・消耗品】

- 板氷: 外気温が高い場合における標本周辺部の冷却用

【方法】

- 体腔液などは、室内実験室の冷蔵庫に収容するまで氷冷した保冷(発泡)容器に入れ転倒しないよう固定して保管する。

[操作上の注意]

- ・ 実験室まで運搬する際はボックス内の標本が動かぬよう簡易的に固定し、外気温が高い場合は低温を保つため標本周辺部を氷冷する。