

平成28年度水産防疫対策事業実施報告書概要

1. 水産動物疾病のリスク評価

目的: 養殖水産動物疾病の国内への侵入リスクやまん延リスク等を評価し、必要な防疫対策を講じるため、その基礎となる感受性動物、伝播様式、病原体の不活化条件、国内外の浸潤状況等のデータを収集し、水産防疫体制の維持強化を図ることを目的とする。

(1) リスク評価のための基礎調査

① 特定疾病等の情報収集調査

特定疾病等国内でまん延防止措置が講じられている疾病の病原体について、現在の分布や病原性の変化の有無など、養殖場や周辺水域における状況について情報収集するとともに、必要に応じて感染実験等を行い病原性等の確認を行った。KHVに関しては、H28年度はこれまで12都県から18件の確定診断依頼を受け、そのうち17件が陽性であった。これはここ数年と大きく変わらず、比較的低い発生頻度であった。

② カキヘルペスウイルスの病原性評価

本ウイルスの水温が病原性に与える影響を検討するため、23℃、26℃及び29℃において、国内株を用い感染試験を行い、カキヘルペスウイルスのDNA量の定量を行うとともに、死亡率を調べた。その結果、高水温でも発症と死亡は23℃の場合と同様に起こること、また病気の進行は水温が高いほど早くなることを確認した。すなわち我が国で被害が顕在化しないのは採苗方法の違いによるものではないかと推測される。

③ ブリ類の主な原因菌であるラクトコッカス症原因菌、類結節症原因菌の薬剤耐性菌出現動向調査

各県から提供されたブリ類の病原菌である *Lactococcus garvieae* (ラクトコッカス症原因菌) I型27株及びII型33株について14薬剤に対する感受性試験を行った。I型 *L. garvieae* は、LCM耐性が74.1%、OTC、EM耐性が3.8%であった。感受性株が25.9%と昨年より12.6%減少した。II型 *L. garvieae* は、LCM耐性が48.5%と昨年より6.4%高くなった。OTC、EM耐性は見られなかった。本年は、*Photobacterium damsela subsp. piscicida* (類結節症原因菌) が分離されなかった。

④ アユのエドワジエラ・イクタルリ感染症の発生メカニズムの研究

関東地域の1級河川を対象に、エドワジエラ・イクタルリ感染症原因菌 (*Edwardsiella ictaluri* :以下Ei)の動態および発生要因調査を実施した。Eiに特異的に感受性を示すバクテリオファージのレベルと、qPCR法による測定法をもとに、Eiの河川動態を解析した結果、ファージのレベルは過年度と同様、冬期に収束し、水温の上昇に伴い全河川に広がる傾向が確認された。qPCRではEiファージと同様の傾向が認められたが、特に冬期の1～3月はEiファージに比べ検出される地点数は少なく、堰の上流域で検出される傾向がみられた。

また、Eiの感染源解明を目的として、冬季のEi収束水域内での生物:魚類や底生動物、環境構成物:堆積物や藻類よりEiを検出・定量した結果、生物では底生魚種の腸管、ヒル類、水生昆虫、甲殻類からEiが検出され、多くの地点の河川堆積物や藻類からもEiが検出されたことから、これらが感染源として発生が継続する原因であることが推察された。

本病の発生と遊漁への影響を調査するため、友釣り及び投網を用いてアユの捕獲を行うとともに、遊漁者への聞き取り調査を行い、1人1時間あたりの釣獲尾数(CPUE)を算出した。また調査期間中は、データロガーを用い1時間ごとに水温を記録した。その結果、週の平均水温が高いほどアユのEi保菌率が高く、最も保菌率の高かった週には、平均水温は25℃以上を記録した。この週に投網で捕獲されたアユの保菌率は20.4%であったが、友釣り個体では保菌は確認されなかった。また、日中の平均水温が高いほど友釣りCPUEが低かった。これらの結果から、アユは高水温期にEiを保菌しやすく、Eiは友釣りCPUEを低下させる可能性が示唆された。

⑤ ヒラメ等のアクアレオウイルス感染症の疫学調査

ヒラメ等の種苗生産施設等におけるアクアレオウイルス感染症の発生に関して、疫学調査による種苗への感染経路の検討を行った。アクアレオウイルス感染症が発生した3例(A県、B県、C県)の親魚から、肝臓、腸、血清を採取してリアルタイムPCRによるウイルス保有状況およびELISAによる抗体保有状況を調査した。リアルタイムPCRでは検査魚(n=143)の57%が、抗体検査では検査魚(n=109)の85%が陽性と判定された。また、各事例の親魚が保有していたウイルスのRNAポリメラーゼ遺伝子の部分配列(774 bp)は、それぞれの事例の病魚の持つ配列と完全一致していた。以上の結果から、本感染症の感染源は親魚であると示唆された。

⑥ リスクプロファイルシートの作成

最新の海外情報及び研究知見を踏まえ、我が国でリスク評価すべき疾病、OIE(国際獣疫事務局)が定めた疾病(魚類、軟体動物類、甲殻類の指定疾病)、及び

情報収集すべき新たな疾病など、我が国の養殖業に影響を及ぼす可能性のある疾病を選定し、必要に応じ、輸入水産物のモニタリングや在来他種への感受性試験を実施し、リスクプロファイルシートを作成するとともに、必要に応じて病性鑑定指針を作成した。本年度は、水産安全室の要請により10疾病の病勢鑑定指針の英訳版を作成した。また、海外での旋回病の情報収集結果を基に、当該疾病のプロファイルシートを改訂した。

(2) 国内外の疾病の発生状況調査・情報収集

① 輸入魚介類の疾病検査・モニタリング調査

a) 輸入業者1社より検査依頼のあった米国ワシントン州の養殖場由来のギンザケ発眼卵4ロットについて、ウイルス検査(RTG-2, CHSE-214, EPC, BF-2, SHK-1細胞によるウイルス分離検査、ISAのPCR検査)、細菌検査(レッドマウス病:菌分離+PCR法、BKD:間接蛍光抗体法、ピシリケッチア症:PCR法)を実施した。4ロットはいずれの検査でも陰性であることを確認し、結果を依頼者および種卵の配布先となる都道府県に報告した。

b) 輸入種苗モニタリング: カンパチ:

愛媛: 2件の業者について、輸入種苗導入時点での情報(目視検査、検体精密検査)とその後の経過の情報を収集した。5月に導入した業者によれば、導入時点でかなりスレて衰弱が見られたが原因は不明であった。そのためか導入3日後には眼球炎を発症した個体が確認された。異なる日に導入した種苗についてはおおむね良好で、特に病気は確認されなかった。4月に導入した業者では導入1か月後からレンサ球菌症(I型)が発生した。

宮崎: 2件の業者について、輸入種苗導入時点での情報(目視検査、検体精密検査)とその後の経過の情報を収集した。5月に導入した業者では、搬入直後からスレ、尾柄部潰瘍などの症状がみられ、大型魚で死亡があり、*Vibrio harveyi* が分離された。導入2週間後には斃死魚は減り安定したとのこと。

タイリクスズキ: 愛媛: 導入時点では特に問題はなく状態は良好。その後にスレと緩慢遊泳の魚が目立ち始めたが、餌食いも良好であった。

② 水産用医薬品の使用状況、魚病被害の発生状況等の調査

平成27年の都道府県の水産用医薬品の使用状況および魚病被害状況アンケート調査結果を収集し集計を行った。また、アユの疾病発生状況も収集し集計を行った。

③ ブリ類の難治癒疾病に関する調査

ブリのべこ病について、疫学調査により疾病の広がりを調査するとともにその原

因となる微胞子虫の生活環の解明に資する調査を行った。疫学調査では、べこ病の流行漁場において中間宿主候補の採取を行い、qPCRで *M. seriolae* 遺伝子の検出を行ったところ、複数の候補から遺伝子が検出され、中間宿主である可能性が示唆された。また、ブリ天然種苗採捕直後及びカンパチ人工種苗導入後の中間育成過程において、定期的にサンプリングを行い、剖検による体側筋中のシスト形成の確認とqPCR法による体側筋中の遺伝子量を検査した結果、感染してもシスト形成には至らず治癒に向かう事例が確認された。また、内湾性(水深15m)及び外洋性海域(水深40m)における養殖場の環境水中から、原因虫の遺伝子量を調査・比較し、内湾性海域の方が検出量、検出頻度とも高い傾向が窺われたが、両養殖場とも飼育魚のべこ病感染が確認された。この他、秋季に海面生簀に導入されたカンパチ人工種苗について、剖検による体側筋中のシスト形成の確認とqPCR法による体側筋中の遺伝子量を検査した結果、秋季に海面生簀に種苗を導入した場合でもべこ病に感染することが明らかとなった。生活環の解明では、2016年10月から2ヶ月間、鹿児島県水産技術センター内で、カンパチ稚魚と養殖生簀の付着生物との同居飼育により感染するかどうか調べた。その結果、同居1ヶ月後に30尾中3尾の体側筋肉中に無数の小白点が観察され、うち2尾はPCR検査により *M. seriolae* 陽性であった。さらに小白点の病理組織切片をUvitex 2B-HE染色して観察したところ、微胞子虫胞子が無数に確認された。しかし、同居した無脊椎動物のうち、フジツボ類とカニ類はPCR陰性であった。以上より、養殖生簀の付着生物中に中間宿主が存在することが示唆されたが、その動物群を特定することはできなかった。この他、原因虫の熱ショックタンパク質70を標的とするRNAプローブを用いたin situハイブリダイゼーション(ISH)法を開発し、筋肉中から孢子形成前の *M. seriolae* の検出に成功した。その他の臓器においてISHの陽性シグナルは検出されなかった。

④ 国内外で発生している疾病の発生状況調査

国内外で発生している重要疾病について、発生状況等に関する調査や防疫技術に関する知見の収集を行った。即ち国内で開催された魚病に関するブロック別会議や学会等に参加し、魚病発生状況や魚病対策に係わる情報収集を行った。この他、新規に輸入防疫対象疾病に加えられたサケ・マス回旋病について、アメリカ合衆国オレゴン州コーバリスのオレゴン州立大学Fish and wildlifeの微生物学研究室において、情報収集および診断技術に関する知見の収集を行った。本疾病は米国では90年代に重大な被害をもたらしたが、現在は一部の水系では資源が回復しているところもある。治療法や予防法は無い。既発生水域に耐性のある系群を養成し放流している例もある。PCRによる病原体遺伝子の検出に先立って骨組織をペプシンおよびトリプシンで消化し病原体である粘液胞子虫の胞子を

組織から取り出すことが推奨されており、本法の手技の詳細を収得した。

2. 水産動物疾病の診断・予防・まん延防止に係る技術開発等

目的:国内で発生した新疾病、その他の養殖水産動物の伝染性疾病の発生予防及びまん延防止を図るための迅速かつ正確な診断法、予防法等の開発や調査研究を行い、水産防疫体制の維持強化を図ることを目的とする。

(1) 水産動物疾病等緊急対策

① 特定疾病, OIE リスト疾病, 不明病等診断及び緊急対策

都道府県からの依頼に応じ、都道府県が実施した持続的養殖生産確保法に基づく特定疾病(主にコイヘルペスウイルス病)及び OIE(国際獣疫事務局)リスト疾病の診断結果の確認並びに都道府県において判断が不可能であった水産動物の疾病の診断又は死因の分析を行うとともに、緊急的に生じた防疫対策の取組を行った。不明病診断等については、3月1日までに29件を受付け14件回答した。診断状況としては、アクアレオウイルス感染症が相変わらず頻繁に発生した。また *V. harveyi* による眼球炎がマサバでも発生した。KHV の確定診断では、依頼件数18件中17件を陽性と診断した。この他、緊急対応として、レッドマウス病原菌 *Yersinia ruckeri* の国内シロザケ分離株の病原性について調査した結果、*Y. ruckeri* 国内分離株は、シロザケに対し本魚種の最適水温である9℃においても病原性を示すことを明らかにした。

② コイヘルペスウイルス病等の技術認定テスト及び技術指導

コイヘルペスウイルス病について、都道府県の魚病担当者の診断技術の精度を確認するため技術認定テストを実施し、診断技術が不十分と判断された者及び希望する都道府県の魚病担当者に対し、診断技術の維持・向上のための技術指導を行った。KHV 病の確定診断機関(技術者)を認定するための技術認定テストでは、25機関31名が参加し、認定試験合格者は18名であった。ホヤ被?軟化症技術認定テストでは、5機関7名が参加し、認定試験合格者は7名であった。また、診断技術が不十分と判断された受験者及び希望する都道府県担当者1機関1名に対し、PCR等の技術的な指導を行う診断技術講習会を開催した。

(2) 水産防疫資材の開発促進のための基礎的な知見の収集

ワクチンの効果的な経口投与法の開発では、ヒラメの *Streptococcus iniae* 感染症をモデルとして、不活化菌体をアルギン酸ナトリウムカプセルに封入しに投与し攻撃したところ、注射法によるワクチンと同程度の有効性が認められた。アユ冷

水病に対する浸漬ワクチンの有効性を高める方法では、食品加工用プロテアーゼ製剤による前処理で安定して有効性が高まることが確認された。2 タイプの病原型の冷水病菌で作製したワクチンでそれぞれ免疫した場合、有効性評価のための感染実験菌株がホモの場合には有効性が高く、ヘテロの場合には有効性が低かった。また、2 タイプの混合ワクチンを用いた場合では、両者に対する有効性が比較的高かった。また、アユのエドワジエラ・イクタルリ感染症に対する不活化ワクチンの有効性を調べたところ、注射及び浸漬免疫での有効性が示唆された。この他、農林水産省の要請に応じ、水産防疫資材に係る知見の提供等の協力を行った。

(3)水産動物疾病検査法開発

① コイヘルペスウイルス病の非破壊検査法の開発

人為感染により作出した KHV 感染魚を経時的にサンプリングし、非破壊検査法として 体表粘膜上皮採取によるウイルス検出を試みると同時に、破壊検査法である鰓、鰭、腎臓および脳からのウイルス検出も試み、各検出部位におけるウイルス検出効率を、PCR を用いて検証し、本非破壊検査法の有用性を確認した。その結果、綿棒で採取した体表粘液を用いた PCR の KHV検出効率は、現在実施されている鰓弁を材料とする方法と比較して差が認められず、KHV 病の非破壊検査法として有用であると考えられた。

② ヒラメ等のアクアレオウイルス感染症等の検査法の開発

ヒラメ等のアクアレオウイルス感染症の原因ウイルスの分離培養技術を確立するとともに、同病の検査法の開発・改良を行った。分離培養技術では、ヒラメ由来の HINAE細胞でウイルスが分離・培養できることを明らかにした。CPE が出現して細胞が崩壊するまでに 1 ヶ月以上の期間を要していたが、接種ウイルス検体をトリプシン濃度が 2%以上かつ FBS 濃度が1%以下の条件で、20℃で 1 時間以上処理すると、CPE の出現が 2 週間程度早くなりウイルス力価も 100 倍以上改善されることが明らかになった。この方法を用いればウイルス感染力価の測定が容易になり検出感度も向上するため、ウイルス不活化条件の検討等に応用が可能である。また、前年度に開発したリアルタイム PCR の温度条件では、測定機械によっては正しい結果を得られない場合があることが判明した。具体的にはアニーリング温度が 63℃だとロシュ社製のライトサイクラー96 では検出可能だが、バイオラッド社製の CFX96 Touch では検出できなかった。アニーリング温度を 58℃まで下げると両社の機械で検出が可能であった。この他、ELISA によるヒラメ親魚の抗体検査系を確立した。HINAE 細胞で培養したウイルスを、塩化セシウムを用いた密度勾配遠心法で精製することで特異性および感度の高い抗原を得る

ことができた。精製ウイルスをELISA プレートに固相化し、50 倍希釈したヒラメの親魚血清を反応させ、酵素標識した抗ヒラメ IgM モノクローナル抗体を反応させることで、アクアレオウイルス感染魚の血清から陽性反応(吸光度 0.5 以上)を得ることができた。

(4) 養殖衛生管理に関する調査・研究

① アユの冷水病に関する効率的な加温処理技術の開発

冷水病の再発を防ぎ耐病性を付与するため、閉鎖循環系の飼育水槽を活用した効率的な加温処理技術の開発を行った。本年度は、閉鎖循環系飼育下において感染魚との同居法により冷水病菌を感染させた後、いくつかの昇温プログラムによる加温処理を行い冷水病による死亡の軽減を確認するとともに、生残魚に対し冷水病菌の再攻撃試験を行い、何れの昇温プログラムが効率的に冷水病による死亡を抑制するか調べる。その結果、実施した何れの昇温プログラムでも効率的に冷水病による死亡を抑制する効果が認められたが、冷水病菌保有魚が80%程度死亡した3日後に20℃で1日間、その後25℃で1日間次いで28℃で3日間加温するプログラムが加温処理過程も含め最も死亡が少なく効率的であることが示唆された。また、実際に漁獲された琵琶湖産アユ稚魚を導入し冷水病が自然発症した魚群を用い、閉鎖循環系飼育下で加温処理を行い治療効果及び耐病性の付与の有無を調査したところ、加温2日目から死亡が増加し、加温終了時点でほぼすべての供試魚が死亡した。死亡魚の多くからエドワジエラ・イクタルリが分離された。一方、対照区のかけ流し飼育下で加温処理した群については、加温中の死亡は一部に留まった。このことから、本法の問題点として、天然アユ等、エドワジエラ・イクタルリ等冷水病菌以外の病原菌に混合感染している魚群に冷水病対策として本法を用いた場合、閉鎖循環系飼育とすることで、通常のかけ流し飼育よりも、他の疾病の発症による死亡の可能性が高くなることが分かった。

② ブリ類の難治癒疾病の防除技術の開発

ブリ類の眼球炎及びべこ病について、感染の軽減や治癒を目的とした飼育法や薬剤による治療の有効性等についての検討を行った。眼球炎では、昨年度までの調査で原因とされた *Vibrio harveyi* を用い、不活化菌体を作製しワクチンとしての投与効果を調査したところ、本試験条件では効果は確認されなかった。べこ病では、免疫賦活剤の投与や連続給餌による感染の軽減の有無を調査したところ、本試験条件では効果は確認されなかった。この他、薬剤による治療について、べこ病発症海域にカンパチ人工種苗を暴露し自然感染させた後、陸上水槽に移動し、候補薬剤の経口投与による治療効果をシストの有無や原因微胞子虫

を検出する PCR 法により把握した。

(5) 検査・試験材料の保存・配付

① 特定疾病等の検査・試験材料の作成・配布

都道府県において疾病発生時に迅速な対応ができるよう、国内に未侵入である特定疾病及び、既に発生した疾病で配付の要望があり、養殖に被害を及ぼす可能性のある疾病の抗血清等の検査・試験材料を作成・保存し、要望に応じて都道府県等の試験研究機関に配付する。特定疾病等診断材料の購入・備蓄では、「特定疾病診断 指針」に準拠した診断材料(PCR プライマーや試薬、蛍光抗体キット等)を購入・備蓄した。本年度の配付実績はなかった。抗血清は、都道府県等の依頼に応じて配付した。平成 29 年 2 月末現在で、のべ 16 機関へ 139 本を配付した。また新規に、レッドマウス病原菌 *Y. ruckeri* の NCTC 株と、類結節症、ビブリオ菌(C)、冷水病原菌の抗血清を作製した。

② OIE リスト疾病の PCR 陽性対照等の作成・配付

コイヘルペスウイルス病やマダイイリドウイルス病などの OIE リスト疾病等について、都道府県等の試験研究機関の要請に応じて PCR 陽性対照等の研究用試薬の作成・配付等を行った。即ち各分離株について、培地上での増殖性や魚に対する毒性を確認し、使用目的に応じた配布が可能となる体制を整えた。また、各ウイルスの代表株について、培養細胞を用いたウイルス上清およびその DNA/RNA 抽出液を作製し、各機関への配布に備えた。本年度は、OIE リスト疾病や特定疾病等について、PCR 陽性対照延べ 39 件、抗体等研究用試薬やその他の疾病の陽性対照についてのべ 4 件を都道府県試験研究機関の要請に応じて配布した。

報告書の利用についての注意・免責事項

本事業は、農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課からの委託により、実施されたものであり、本報告書の内容は農林水産省の見解を示すものではありません。

農林水産省及び委託事業者は、本報告書の記載内容に関して生じた直接的、間接的、派生的、特別の、付随的、あるいは懲罰的損害及び利益の喪失については、それが契約、不法行為、無過失責任、あるいはその他の原因に基づき生じたか否かにかかわらず、一切の責任を負うものではありません。これは、たとえ、農林水産省及び委託事業者がかかる損害の可能性を知らされていた場合も同様とします。

本報告書は信頼できるとされる各種情報に基づいて作成されておりますが、その正確性、完全性を保証するものではありません。農林水産省及び委託事業者は、本報告書の論旨と一致しない他の資料を発行している、または今後発行する可能性があります。