

## 平成 29 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（1 疾病以上）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の情報収集等により病原性等の確認を行った。2012～2016 年にかけて分離されたコイヘルペスウイルス（KHV）6 株についてキンギョへの病原性を調査したが、過去のものと同様にキンギョ体内ではいったんは KHV ゲノムが検出されるものの速やかに消失し、キンギョは何れの症状も示さなかった。さらに KHV 株に浸漬したキンギョと同居したコイから KHV ゲノムは検出されず、また同居コイの抗 KHV 血中抗体価は上昇しなかったことから、キンギョは KHV のキャリアーにならないことが確認された。

##### ② カキヘルペスウイルスの病原性評価

カキヘルペスウイルスの病原性を有する株を用いて感染実験を行い、生残したものについて潜伏感染の可能性を調査した。注射法によりマガキに実験的にカキヘルペスウイルス（OsHV-1）を感染させ、その後数か月にわたって飼育し、感染後定期的に外套膜や内臓神経節などの臓器を採取し、OsHV-1 の量をリアルタイム PCR で定量した。その結果、OsHV-1 感染後 6 ヶ月を経過しても一部の個体からはウイルス DNA が検出されたことから、OsHV-1 はマガキに持続感染または潜伏感染することが示唆された。

##### ③ アユの重要疾病の発生メカニズムの研究

###### a: アユの冷水病の発生メカニズムの研究（栃木県）

河川での冷水病の被害を軽減できるような放流手法を開発することを目的に調査を実施した。

県内 13 漁場で冷水病の発生時期と終息時期と、その河川水温を調査した結果、解禁日から冷水病の発生までは平均 17 日で、水温が低い漁場のほうが発生までの期間が長い傾向がみられた。つまり、解禁を早くし、水温の低い時期にアユ漁を始めることで、冷水病発生までの日数を長くできることが考えられた。さらに、水温に関係なく、発生から終息までは平均 30 日であったことから、冷水病が早い時期に発生したとしても終息までの期間は変わらないことが示唆された。

2 漁場で冷水病の被害量と河川環境の関係を調査したところ、冷水病終息後の残存率は 33%と 17%と非常に低く、生き残りが良い場所を選んで放流することは困難と考えられた。そこで、冷水病での減耗を前提とした無駄の少ない放流密度について検討したところ、生

息密度と解禁日の釣れ具合の関係には頭打ちの傾向がみられ、1 尾/㎡を目標に放流することが有効と考えられた。

以上のことから、冷水病の被害軽減に効果が期待できる手法として、

- ・冷水病菌の持ち込みを減らす（オトリアユの持ち込み自粛を促すなど）
- ・可能な範囲で解禁を早める
- ・1 尾/㎡を目標に無病の種苗を放流する

があると考えられた。

#### b：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

関東地域の一級河川において、主に海産遡上アユを対象としたエドワジエラ・イクタルリ（以下 Ei）感染症原因菌の保菌開始時期の調査、河川環境における感染源の解明、河川水中の Ei の動態調査を実施した。

##### ・Ei 保菌開始時期の調査：

遡上アユを経時的に採捕して Ei の保菌調査を行った結果、通常の保菌検査では全て未検出であったが、2 週間昇温飼育した後の検査で 5 月後半採捕のアユの腎臓と腸管で検出されたことから、遡上アユは 5 月後半には Ei を保菌していることが明らかとなった。同地点で採捕されたアユの胃内容物を調べたところ、9 割以上の個体で藻類（主要藻類は珪藻類：*Melosira varians*）が観察された。

##### ・Ei 感染源の解明

qPCR 法により石面付着藻類および水底堆積物からの Ei の検出を試みた結果、水底堆積物は 2 月に多くの Ei 由来核酸が検出されたが、それ以降減少した。一方、本流の石面付着藻類からは年間を通じて Ei が検出された。石面付着藻類を分類したところ、主要藻類は珪藻類（*M. varians*）であった。

##### ・河川水中の Ei の動態調査：

計 22 地点で毎月調査を実施した結果、昨年度の調査時と比べ検出地点数ならびに検出されたコピー数は減少したものの、昨年度と同様に春季から夏季に向けて検出地点は増加し、秋季に減少した。

上記結果から、遡上アユは、下流域の石面付着藻類を摂餌することにより Ei に感染しているものと考えられた。また高 Ei 検出地点と石面付着藻類等の河川構成物の Ei 量は、相関しているものと推察された。

#### ④ マダイのヘネガヤ症の疫学調査

マダイ養殖で被害が増加している心臓ヘネガヤ症の感染防除法確立の第一段階として、宇和海全域での発生状況の調査、種苗導入時の感染率と原因寄生虫の遺伝子量を調査した。

##### ・発生状況の調査：

愛媛県水産研究センター魚類検査室の診断結果を整理し、宇和海全域での心臓ヘネガヤ症の発生状況を調査した。愛媛県においてマダイの心臓ヘネガヤ症は、平成 14 年に初めて確認された。平成 14 年度以降、診断割合は 0.2～5.8%程度で推移したが、平成 23 年には 9.7%を占め、その後増加傾向が顕著となり平成 29 年に最多の 18.2%となった。発生は県内各地の漁場で周年みられ、特に春から夏にかけて増加傾向にあった。事例の多くが 0 才魚であった。

・種苗導入時の *H. pagri* 遺伝子の保有状況：

平成 29 年 4-6 月に宇和海各地に導入されたマダイ種苗（7 種類の由来が異なる種苗）について、検鏡検査による感染の有無の確認と、qPCR 法により *H. pagri* 遺伝子の保有状況を調べた。その結果、検鏡検査では全ての個体でヘネガヤ胞子が確認されなかった。一方、qPCR 法では 14%にあたる 25 個体で *H. pagri* 遺伝子が検出された。qPCR 法による検出率は、由来によって異なり、多いロットでは 29%、一方で確認されない由来もあった。

愛媛県での診断件数は増加傾向にあり、宇和海の北部海域から南部海域まで全域の主として 0 才魚で発生している。診断は夏場に多いものの周年みられることから、病原体は周年漁場に存在している状況にあり、感染が広がる原因の一つとなっていることが考えられた。

導入時の qPCR 法検査において *H. pagri* の遺伝子が検出された。種苗の由来により検出率に違いがみられたことで、マダイ種苗の一部が漁場に病原体を持ち込んでいると推察されたが、由来の検査ロットによっては検体数が少なかったことから、十分な検体数を確保して再検討する必要がある。また、導入時に *H. pagri* 遺伝子の検出率を調べたのみであるが、感染経路を明らかにするためには、導入時の検出率とその後の疾病の発生や死亡との関係を追跡調査する必要がある。さらに、交互宿主の探索も視野に入れ、生活環を明らかにすることも必要である。

#### ⑤ ブリのべこ病の疫学調査

べこ病の原因解明のため、原因微胞子虫 *Microsporidium seriolae* の感染時期や場所を把握する目的で、種苗と海水からの原因寄生虫の検出（肉眼観察ならびに qPCR 法）による疫学調査を実施した。また、原因微胞子虫の生活環の解明に向け、環境生物からの検出と、魚との同居感染試験を試みた。

・養殖場環境水中からの *M. seriolae* 遺伝子の定量検出：

鹿児島県西部の内湾性海域の養殖場で、4 月、7 月、8 月、9 月および 10 月に *M. seriolae* 遺伝子が検出され、遺伝子量の範囲は  $2.23 \times 10^2 \sim 4.32 \times 10^3$  copies/L で、最も遺伝子量が多かったのは 8 月であった。外洋性海域の養殖場では、7 月、8 月および 11 月に原因微胞子虫の遺伝子が検出され、遺伝子量の範囲は  $7.08 \times 10^2 \sim 3.47 \times 10^3$  copies/L で、最も量が多かったのは 8 月であった。両者を比較した場合、内湾性海域の方が遺伝子の検出量、検出頻度とも高い傾向が窺われた。

一方、鹿児島県東部の内湾性海域の養殖場では、4 月、7 月、8 月、9 月および 11 月に原因微胞子虫の遺伝子が検出され、遺伝子量の範囲は  $7.20 \times 10^0 \sim 1.52 \times 10^3$  copies/L で、最も量が多かったのは 9 月であった。水温は 16.1～27.5℃の範囲で推移した。

鹿児島県西部と東部の海域の比較では、遺伝子の検出頻度には両者の差はないが、量は西部海域の方が高い傾向が窺われた。なお、西部、東部海域とも今期、飼育魚からべこ病感染が確認されている。

・生活環の解明に向けた調査・研究：

べこ病の発生が確認された養殖場で採取した生物（*Caprella* sp.、ヨコエビ類）から、原因微胞子虫の遺伝子が検出された。当該 2 種の生物については、昨年度の調査においても検出されており、中間宿主の可能性が示唆された。なお、海水から遺伝子は検出されていない。

・水槽での同居飼育試験：

ブリのべこ病原因微胞子虫の生活環の解明のため中間宿主探索を目的として、感染海域の付着性無脊椎動物とブリとの同居飼育試験を実施した。5月中旬から10週間同居飼育し、経時的にサンプリングした魚は、肉眼による筋肉内でのシスト形成の有無の観察と、複数の器官の組織をqPCR法による検査に供し、寄生成立の確認を行った。PCRで陽性の場合には塩基配列を決定し、同定を行った。試験の結果、対照区では、鰓、心臓、筋肉から、試験区では、鰓から、qPCR陽性反応が見られた。しかし、コピー数は非常にわずかであり、*M. seriolae*の感染と確定することはできなかった。

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)、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(1疾病以上)を選定し、リスクプロファイルシート等を作成した。東南アジアで問題となっている *Enterocytozoon hepatopenaei*、および新たに OIE への報告が必要になった疾病のうちのひとつである *Spiroplasma eriocheiris* に関して、わが国ではなじみがないためプロファイルシートを作成した。

(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、ニジマス(ドナルドソン)発眼卵 1 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。

ウイルス分離検査、レッドマウス病、ピシリケッチア症の検査では 5 ロット全て陰性であった。結果はすべての検査終了後、依頼者および種苗・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：

愛媛：県南部の 1 業者について導入時にモニタリングを 2 件実施した。種苗の状態は良好で体表のスレなども見られなかった。一部の魚で導入直後に類結節症や眼球炎などが見られていたが特に大きな被害は出でらず状態は良好であった。

宮崎：県北部の地域に 4 月下旬、5 月中旬、6 月中旬に導入された 6 ロットならびに、県南部に 6 月中旬、7 月中旬導入された 2 ロットの 8 件についてモニタリングを行った。4、5 月に導入されたロットでは、異常や死亡が見られない優良なものもあったが、数ロットでキリキリ舞の異常行動を示す個体が散見された。その後、日数の経過にともない、異常を呈する魚は見られなくなり安定した。串間に導入されたロットは搬入翌日に眼球炎症状を呈する魚が見られはじめ、2 週間にわたり数尾/日程度の死亡があった。その他、マダイイリドウイルス病魚や、エピテリオシスチス症の病魚も見られた。

両漁場とも特記すべき疾病はなく、既知の疾病での軽微な被害があったのみである。

## 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 28 年の都道府県の水産用医薬品使用状況ならびに魚病被害状況のアンケート調査結果と、アユ疾病の発生状況等のデータを収集・集計し、水産安全室に提出する。完成後は都道府県にも県別のデータを提供する。

③ 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う。なお、国外調査を実施した。すなわ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、インドネシアで大きな問題となっているナマズのギロダクチルス症の発生状況を調査するとともに、同国で開催されるアジア水産学会魚病部門に参加し防疫技術等に関する情報を収集した。

## （３）水産動物疾病の浸潤状況調査

① 我が国の養殖業に重大な被害をもたらすリスクの大きい疾病を選定し、感受性種の保菌検査により、広域的な浸潤状況を把握する。調査対象は平成 28 年度に引き続き「レッドマウス病」とし、本病の防疫対策の方向性を定めるための基礎的情報とするため、広域的に浸潤状況を調査した。

本年度の調査対象地域は日本海北部沿岸域を除く都道府県とし、協力を依頼した。平成 29 年 10 月から平成 30 年 1 月にかけて東北地方から四国、九州地方の 14 県から河川で採集された生物（魚類、エビ類）の提供を受けた。初発事例が河川の下流部であったことから、原則、検体採集地点は河川下流部としたが、内陸部の県の採集地点は任意の場所（河川上流部や湖沼）とした。

供試魚は計測後解剖して腸管の後部を一部摘出し、SS 液体培地に接種して 25℃で 24 時間培養し増菌させた後、特定疾病診断マニュアル掲載の PCR 法により検査を行った。検査は検体 1 尾ごとに行った。陽性検体は二次検査として、塩基配列の決定による菌の同定を行った。

14 県の 14 地点で採集された 9 科 35 種の河川生息魚（803 個体）とエビ類 3 種 5 個体を検査した。その結果、東北、関東、中部、近畿、中国、四国採集地点の供試魚（3 科 11 種 81 尾）から *Y. ruckeri* の DNA 配列が得られ、本菌の分布は太平洋沿岸の東北地方から中国、四国地方まで広範囲におよぶことが明らかとなった。さらに、内陸部の河川・湖沼産の魚類からも検出がされたことから、本菌は過去の調査で重視した河川下流のみならず、中・上流部や湖沼にも分布することが明らかとなった。なお、本調査の供試魚にはレッドマウス病が疑われる症状は観察されていない。本調査においても *Y. ruckeri* 菌株を分離するには至っておらず、PCR で検出された菌の性状等の詳細は不明である。検査結果は水産安全室ならびに検体提供県へ随時報告した。

## 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

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。また、都道府県等において疾病の発生時に迅速な診断ができるよう、必要に応じて、抗血清等検査試験材料の作成・保存等を行い、都道府県等の試験研究機関に配布した。

不明病診断等については、2月21日までに32件を受付け、26件を回答した。診断状況としては、ヒラメの種苗でアクアレオウイルス感染症とともにアクアビルナウイルス感染症が発生した。KHVの確定診断では、依頼件数25件中25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、国内分離株は、アユに対する病原性が低いことが示唆された。

抗血清等検査試験材料の配付では、特定疾病等診断材料の購入・備蓄・配布として「特定疾病診断指針」に準拠した PCR プライマーを都道府県水産試験場等に配布し、特定疾病が疑われる疾病が発生した際に迅速に診断を行えるよう整備を行った。抗血清については、都道府県等の依頼に応じて、平成30年2月末現在でのべ22機関へ179本の抗血清を配付した。また、新規として九州地方の罹病カンパチから分離された *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* と、補充のため C 群レンサ球菌症原因菌 *Streptococcus dysgalactiae* の2種類病原体について抗血清を作製した。

### (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

既存の技術ではワクチン開発が困難な水産動物疾病について、効率的な抗原の取り込み法や病原体抗原調製法、DNA ワクチンの安全性の検証等のワクチン開発に資する技術に関する知見の収集を行うとともに、必要に応じて試験等を行い有効性を検討した。すなわち、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として、これまでに食品加工用プロテアーゼ製剤による前処理および病原型を考慮したワクチンの作製が必要であることを明らかにしたが、今年度は、複数の系統のアユに対する本法によるワクチンの有効性を調査した。その結果、比較的冷水病に抵抗性を有する系統のアユでは、同ワクチンの高い有効性が確認された。また、エドワジエラ・イクタルリに対するワクチンの有効性を調査するための最適な感染方法を明らかにし、浸漬ワクチンの有効性を検討したが、顕著な有効性は認められなかった。新規病原体抗原調整法として、ワクチンの開発が困難な疾病の一つであるノカルジア菌を加熱処理し、その菌体をワクチンとして投与後、攻撃試験を行ったところ、症状の改善は認められたが、従来のホルマリン不活化菌体を投与したものと死

亡率に差は認められなかった。また、カナダで認可されている IHN に対する DNA ワクチンに関する情報を収集するとともに、国内株に対応した DNA ワクチンの作製を行った。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に協力した。

### （３）水産動物疾病検査法開発

国内に侵入・発生している疾病の中で検査法が確立していない、又は検査法は確立しているが実施が困難であるものについて、検査法の開発又は改良を行った。すなわち、エピテリオシスチス（EPO）の PCR による検査法を開発した。本疾病に感染したトラフグ、マダイ、タケノコメバルの鰓から EPO 原因菌の 16S rRNA 遺伝子配列を解析し PCR のプライマーを設計した。EPO 原因菌は魚種ごとに異なっており、マダイからは 2 種の異なる EPO 原因菌が検出された。設計したプライマーセットは、トラフグ EPO 特異的なもの 1 組、マダイとタケノコメバルの EPO 特異的なもの 1 組、これら全てを検出するもの 4 組である。

### （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。すなわち現場規模を想定した閉鎖循環系加温処理の検証するため、一般的なアユ養殖池の約 1/15 スケールの飼育池において、天然アユを収容し閉鎖循環系加温処理が可能であるか検証した。その結果、閉鎖循環飼育では掛け流し飼育に比べると高水温時に病勢の強くなる冷水病以外の他の疾病による死亡が多く認められ、他の疾病に留意する必要があることが明らかになった。また、加温期間中のエドワジエラ・イクタルリ等の冷水病以外による被害を軽減するため、両疾病を実験感染させたアユを用い、加温期間中にフロルフェニコール投薬を実施したところ、エドワジエラ・イクタルリによる被害が軽減され、かつ冷水病への耐病性がある程度は付与されることを確認した。

#### ② ブリ類の難治癒疾病の防除技術の開発

ブリ類のべこ病等について、感染の軽減や治癒を目的とした薬剤等による治療の有効性についての検討を行った。すなわちブリ類稚魚をべこ病発生地域の養殖場で暴露した後、陸揚げして清浄な海水で飼育しながら、昨年度有効性が示されたフェバンテルを投与量および投与期間を変え経口投与し、有効な投与条件を明らかにした。また、ブリに対する安全性および毒性についても明らかにした。

#### ③ ヒラメ等のアクアレオウイルス感染症の防除技術の開発

ヒラメ等で発生するアクアレオウイルス感染症について、垂直感染を防除する卵消毒等の技術の開発を行った。すなわちウイルスで人為汚染した精子と未受精卵を作製し、配偶子洗浄を行い、配偶子洗浄がふ化仔魚でのウイルス感染の軽減に有効であることを明らかにした。また、ウイルス保有親魚群から人工授精あるいは自然産卵で得た受精卵を電解海水（0.5ppm、1 分間）で卵消毒し飼育する群と無消毒の飼育群を設け稚魚期まで 3 回の飼育を行ったが、無消毒区においても本病の発生は認められず、本試験では卵消毒による防除効果を明確にできなかった。

#### 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思わ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。