

魚類防疫体制推進整備事業

湯浅明彦

魚介類の感染症（魚病）の発生とまん延を防止するために、水産研究課は魚病の発生を監視し養殖衛生管理と防疫対策を指導した。水産用ワクチン使用の届出に対して指導書を発行し、ワクチンの適正な使用を指導した。出荷前の養殖魚について、医薬品の体内残留を検査した。公益財団法人が海陽町の加島事業場で生産するクルマエビ種苗について、ウイルス性急性血症（PAV，別名WSS）の垂直感染を防除するために、採卵用親エビのウイルス検査を実施した。

方法

水産用ワクチン使用指導書の発行

ブリ属を対象とした水産用ワクチンは、平成27年末で8分類の魚種に対して28製剤が市販されている（表1）。魚類養殖業者から8製剤の「水産用ワクチン使用指導書交付申出書」が提出されたので、用法用量に基づく使用上の注意事項を記載した「水産用ワクチン使用指導書」を交付した。

医薬品の残留検査

市販の残留医薬品検査キット（プレミテスト）で、出荷前のマダイとアユを検査した。同検査キットは魚肉抽出液中に抗菌成分が含まれなければ、培地中のバチルス属細菌の発芽と増殖に伴うpH変化で指示薬が変色する。各魚種の単位体重当たりの魚肉抽出量をもとに、検査に必要な魚肉重量を決定した。ミンスした検体の魚肉を凍結後加温し

て採取した抽出液100 μlを検査培地に添加した。

採卵用親エビのウイルス検査

クルマエビ種苗生産のPAV感染経路は、不顕感染（キャリア）の天然親エビからの垂直感染が重要であり、防除法はウイルス検査でキャリア親エビを排除することで感染経路を遮断する。産卵後にウイルス検出率が向上することが知られている雌性生殖器の受精?を検査し、陽性であれば受精卵を廃棄する。産卵後の親エビの受精?を加島事業場で採取し、1尾又は2尾を1検体として組織の一部からDNAを抽出した。抽出は抽出試薬（DNAzol）の使用法に従った。ウイルスに特異的な遺伝子配列をPCR法又はLAMP法で増幅した。PCR法では2%のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して紫外線照射器で増幅を確認した。LAMP法では増幅副産物のピロリン酸ナトリウムを、遠心分離による白色沈殿物の有無で判定した。

結果

水産用ワクチン使用指導書の発行

平成27年6月8日から8月25日の間に33件のワクチン使用指導書を発行した。届出件数は昨年より3件減少し、ワクチン使用量はカンパチで47.2%，ブリで7.3%それぞれ減少した（表2）。養殖期間が短いカンパチは経口1種ワクチンの使用量が多く、ブリでは 溶血性レンサ球菌症注射ワクチンと4種混合のオイルアジュバント注射ワクチンの使

表1. 対象魚種別の承認されたワクチンの種類と製剤数

対象魚種	対象病原体	種類別の承認されたワクチン数							合計		
		浸漬	経口	アジュバント添加注射				注射			
				1価	2価	3価	4価	1価		2価	3価
アユ	細菌	2								2	
サケ科魚類	細菌	1								1	
ヒラメ	細菌			1				2	1	4	
ブリ	ウイルス							1		1	
	ウイルス,細菌				1					1	
カンパチ	細菌		2						1	3	
	細菌							1	1	2	
ブリ属	ウイルス,細菌				1			1	1	3	
	細菌		1		1	1		3	1	7	
マダイ、ブリ属、シマアジ、ハタ類	ウイルス							1		1	
マハタ	ウイルス							1		1	
合計		3	3	1	1	1	2	8	6	4	28

表2. 水産用ワクチンの種類別の魚種別使用量（届出33件，9製剤）

魚種	ワクチンの種類別使用量 (liter)					合計使用量 (liter)	前年比 (%)
	アジュバント 4種混合	経口1種	注射1種	注射2種混合	注射3種混合		
カンパチ		26.0			1.4	27.4	52.8
ブリ	70.4		84.1	12.5	14.8	181.8	92.7
マハタ			0.6			0.6	

用量が全体の85%を占めた。

医薬品の残留検査

検査した2魚種13検体は全て陰性であった（表3）。

表3. 養殖魚の医薬品残留検査の結果

魚種	生産地	採取月	検体数	検査結果
マダイ	阿南市	平成27年4月	3	陰性
アユ	徳島市	平成27年5月	10	陰性

採卵用親エビのウイルス検査

5月はクルマエビ漁が不漁で購入日は9日間続いた。更に幼生飼育の不調のために6月に3日，計12日間に購入した親クルマエビ約770尾のうち受精卵を産卵した308尾を検査対象として275検体を検査した。陽性検体数は28，陽性率は10.2%に達し，過去5年間で最も高い（表4）。成熟した親エビを充分確保できなかったために産卵率は40.2%と低く，採卵日数を購入後3日から4日に延ばした。そのため，3日めは陽性率が45.5%と著しく高くなった（表5）。

LAMP法は MEKATA *et al.* *1のプライマーを用いたが陽性率が高く，陰性コントロール(N.C.)が陽性になることがあった。その原因は塩基数の多いインナープライマー-FIP及びBIPの保存が適切でなかったために，セルフプライミングによるダイマーが形成されたためと考えられた。LAMP-Hは改良法として両プライマーを10倍に希釈して別々に-20 で凍結保存するようにし，ダイマー形成防止のために熱変性（99 10分間加熱後急冷）処理をした。LAMP-H法ではN.C.が陽性になる非特異的な反応がなく，陽性数も減少した（表6）。

表5. 搬入後の採卵日別のPRDVの陽性率

搬入後 日数	検査法と陽性率(%)			
	PCR	LAMP-H	LAMP	平均
1	1.7	1.7	7.7	2.8
2	5.8	22.2	12.5	9.7
3	61.9	0.0	20.0	45.5
4	0.0	0.0		0.0
平均	12.7	4.1	6.6	10.2

*1 Mekata, T., R. Sudhakaran and T. Itami (2012): Development and evaluation of real-time loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of penaeid viruses. *Bull. Fish. Res. Agen.* 35,39-50.

表4. 親エビのPAVウイルス検査法と検査結果

搬入日	検査日	産卵 尾数	未産卵 尾数	平均 ¹⁾ 体重(g)	検体数	陽性検 体数	陽性率 (%)	検査法 ²⁾		
	5/15	7	58	82.6	7	1	14.3	LAMP		
	5/14	5/16	16	41	13	0		LAMP		
		5/17	9	32	9	2	22.2	LAMP		
		5/16	11	53	87.8	10	1	10.0	LAMP	
		5/17	10	41	10	0		LAMP		
		5/18	4	30	4	4	100.0	PCR		
		5/18	12	50	79.5	15	1	6.7	PCR	
		5/19	7	39	7	0		PCR		
		5/20	5	33	5	4	80.0	PCR		
		5/21	2	16	2	0		PCR		
		5/19	6	28	83.8	5	0		PCR	
		5/20	4	23	4	2	50.0	PCR		
		5/21	3	10	3	0		PCR		
		5/21	4	13	84.7	4	0		PCR	
		5/20	5/22	3	10	3	0		PCR	
			5/23	1	7	1	0		LAMP	
		5/21	5/22	4	36	4	0		PCR	
			5/23	2	8	2	0		LAMP	
		5/22	5/23	11	30	9	0		LAMP	
			5/24	7	23	7	4	57.1	LAMP	
			5/25	46	105	83.8	36	1	2.8	LAMP-H
		5/24	5/26	21	80	17	0		PCR	
			5/27	2	46	2	1	50.0	PCR	
		5/25	5/26	36	83	89.7	27	0		PCR
			5/27	17	56	12	0		PCR	
			6/11	13	86	79.3	13	0		LAMP-H
		6/10	6/12	9	72	9	2	22.2		LAMP-H
			6/13	6	27	6	4	66.7		PCR
			6/12	10	45	82.5	9	0		LAMP-H
			6/13	6	36	6	1	16.7		PCR
			6/14	1	18	1	0			PCR
			6/15	4	13	4	0			LAMP-H
			6/13	4	15	90.5	4	0		PCR
			6/12	6/14	3	11	3	0		PCR
				6/15	2	9	2	0		LAMP-H
		合計		308		275	28			

1) 購入日の翌日のみ測定； 2) LAMP-Hは偽陽性対策の改良法

表6. LAMP法と改良法LAMP-Hの陽性率と非特異的反應

検査日	検査法	検体数	陽性数	陽性率 (%)	備考
5/15	LAMP	7	2	28.6	
5/16	LAMP	25	9	36.0	NC陽性
5/17	LAMP	18	9	50.0	NC陽性
5/24	LAMP	7	4	57.1	NC陽性
5/25	LAMP-H	36	1	2.8	
6/11	LAMP-H	13	0	0.0	
6/12	LAMP-H	18	2	11.1	
6/15	LAMP-H	6	0	0.0	

LAMP法はPCR法より感度が高いがインナープライマーのダイマー形成による偽陽性が発生することで結果の安定性に問題がある。ダイマー形成の原因は明らかではないが，インナープライマーの熱変性で解消することが可能である。