

県外産クルマエビ導入のための PAV 検査 (令和元年度)

照屋清之介・*寺本沙也加
*沖縄県海洋深層水研究所非常勤職員

1. 目的

クルマエビの急性ウイルス血症 (penaeid acute viremia: PAV) は、ニマウイルス科の *Whispovirus* 属に分類されるウイルスにより引き起こされる疾病であり、1993 年以降、西日本のクルマエビ養殖生産地を中心に大きな被害を及ぼした (中野、2005)。沖縄県においても過去には大きな被害を及ぼしたが、平成 14 年以降、沖縄県車海老漁業協同組合海洋深層水種苗供給センターから PAV ウイルスフリーの種苗を沖縄県内の養殖場に供給できるようになり、県内における PAV の被害は縮小された。

近年、その海洋深層水種苗供給センターで系統管理している母エビの近交弱勢の影響が懸念されており、遺伝的に異なる新たな親エビの供給が必要とされている。そこで、当研究所では、2019 年度から新規遺伝系統の導入を目指して、県外の天然クルマエビ水揚げ産地との導入調整、検査手法の検討等を行っている。2019 年度は、三重県産、福岡県産、熊本県産のクルマエビを購入し、検査を実施した。また、海洋深層水種苗供給センターが生産した PAV ウイルスフリー種苗を導入している久米島産の夏エビ出荷試験の斃死個体を用いて陰性であることの確認も行った。

2. 材料および方法

材料となるクルマエビは、三重県産、福岡県産、熊本県産の個体を購入した (表 1)。三重県と福岡産は天然由来であるが、鹿児島市の市場で購入した熊本県産は天然か養殖か不明である。平成 29 年度から実施している夏エビ出荷試験中に斃死したクルマエビも、久米島産個体として検査を行った。それぞれの購入時期は、三重県産が 8 月、福岡県産が 10 月と 11 月、熊本県産が 10 月、久米島産が 8 月である。DNA 抽出に用いる検査部位は、遊泳脚を用いて行った。

DNA 抽出法は、OIE (2017) を参考に、CTAB 溶液を用いたフェノール・クロロホルム法により抽出を行った。

PCR 反応は、KOD FX Neo (TOYOBO) を用いて行い、試薬、プライマーの量は、添付のマニュアルに従って実験した。PCR に用いるプライマーや反応時間は、OIE (2017) と木村ほか (1996) の改変手法 (佐藤、2014) の 2 手法により行った。それぞれのプライマーリストを表 2、反応時間を表 3 に記す。

3. 結果

2019 年度は、合計 90 個体のクルマエビの PCR 検査を行った (表 4)。検査を行った個体の内訳は、三重県産が 40 個体、福岡県産が 25 個体、熊本県産が 14 個体、久米島産が 11 個体である。それぞれの陽性数は、三重県産が 21 個体、福岡県産が 18 個体、熊本県産が 7 個体、久米島産は 0 個体となった。陽性率で示すと、三重県産が 52.5%、福岡県産が 72.0%、熊本県産が 50.0%、久米島産が 0% であった。以下では、それぞれの地域ごとに検査結果を記す。

三重県産では、40 個体中 21 個体で陽性となり、陽性率は 52.5% であった。手法別の結果を見ると、OIE(2017)の方法では 20 個体、木村ら(1996)の方法では 5 個体が陽性となり、OIE の手法の方が陽性を検出できた。ただし、OIE の方法では陰性となり、木村ほかの方法で陽性となった個体が 40 個体中 1 個体 (E22) 見つかった。

福岡県産では、25 個体中 18 個体が陽性となり、陽性率は 72.0% であった。手法別の結果を見ると、OIE(2017)の方法では 17 個体、木村ら(1996)の方法では 15 個体が陽性となり、OIE の手法の方が陽性を検出できた。ただし、OIE の方法では陰性となり、木村ほかの方法で陽性となった個体が 25 個体中 1 個体 (E90) 見つかった。

熊本県産では、14 個体中 7 個体が陽性となり、陽性率は 50.0% であった。手法別の結果を見ると、OIE(2017)の方法では 5 個体、木村ら(1996)の方法では 5 個体が陽性となり、どちらも陽性個体数は同じとなった。3 サンプルは両手法で陽性となり、2 サンプル (E68、71)

が OIE の方法でのみ陽性、2 サンプル (E76、78) が木村らの方法でのみ陽性となった。

久米島産では、夏エビ出荷試験中に斃死した 11 個体の検査を行ったが、全て陰性が確認された。

4. 考察

2019 年度は、三重県、福岡県、熊本県からの親エビ導入を試みたが、PAV ウイルスの陽性率は 50% 以上となり、今年度は活クルマエビの導入を行うことはできなかった。

三重県産は、輸送方法の試験も兼ねていたため、今年度は全てのエビが斃死した状態で届いてしまい、PAV 検査を行うのみとなってしまった。7 月時点で陽性率が 50% 程度有することが確認されたため、より早い時期に導入を行うべきであることが示唆された。

福岡県産は、10 月 (サンプルナンバー E60~64) と 11 月 (E79~98) の 2 回に分けて導入を行った。10 月に試験的に購入した 5 個体のクルマエビは全て陰性だったため、11 月に活エビ輸送を実施したが、20 個体中 18 個体 (90%) が PAV 陽性となり、追加購入を中止し、購入したエビは全て廃棄処分し、活エビを一時的に保管していた水槽の消毒を徹底した。10 月に試験購入したサンプルの DNA 抽出、PCR のミスを疑い、再検査を行ったが試薬等には問題がなく 10 月購入サンプルの陰性が再確認された。福岡県産クルマエビを購入した鮮魚店に聞き取りを行ったところ、福岡市中央卸売市場鮮魚市場に出される博多湾産のクルマエビは主に 3 ヶ所の漁港 (志賀島、姪浜、伊崎) から出荷され、市場に出荷される段階で博多湾産として一纏めとされてしまうため、どこの漁港から出荷されたものか特定することはできないとのことであった。今回の検査結果では、10 月 (陽性率 0%) と 11 月 (陽性率 90%) で極端に陽性率が異なり、その理由の 1 つとして、漁獲された海域が異なっていた可能性が挙げられる。

熊本県産は、試験的に購入したエビで陽性率は 50% となった。今後の導入を行う上での参考としたい。

久米島産は、夏エビ出荷試験中に斃死した 11 個体の検査を行い、全て陰性であった。PAV が斃死の原因ではないことが確かめられた。

5. 今後の課題

1) 西日本の天然クルマエビは、比較的高い頻度で PAV が検出されることから、PAV

未検出の海域 (例えば、秋田県、富山県など) からの親エビ導入が望まれる。

2) 生息海域の海水温の上昇とともに、PAV 陽性率が上昇することが知られており、今回も陽性率が高かったため、より早い時期に親エビ導入を行う方が良い。

3) PAV 陽性クルマエビを久米島に持ち込むことはリスクがあるため、親エビを購入した現地で PAV 検査できる手法を構築することが望まれる。

6. 要約

1) 県外産クルマエビ (三重、福岡、熊本) を購入し、PAV 検査を実施した。

2) 今回導入を行った全ての海域 (三重、福岡、熊本) で高い頻度で PAV 陽性を検出し、今年度の活エビ導入は断念した。

7. 参考文献

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(2), 93-98.

中野平二 (2005) クルマエビの急性ウイルス血症. 日本水産学会誌, 71(4), 639-644.

OIE (World Organisation for Animal Health) (2017) Infection with white spot syndrome virus, In Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, OIE, Paris.

佐藤純 (2014) 第 4 節 PAV 防除対策. In. 奥村卓二・水藤勝喜 (編), クルマエビ類の成熟・産卵と採卵技術. 愛知県水産業振興基金, 111-128.

表 1. サンプルリスト

産地	検査個体数	サンプル番号
三重県	40	E9~E48
福岡県	25	E60~E64、E79~E98
熊本県	14	E65~E78
久米島	11	E49~E59

表 2. 検査に用いたプライマーリスト

方法名	プライマー名	塩基配列	ステップ数	参照論文等
①OIE法	146F1	ACTACTAACTTCAGCCTAICTAG	1 回目	OIE, 2017
	146R1	TAATGGGGTGTAAATGTTCTTACGA	1 回目	OIE, 2017
	146F2	GTAACCTGCCCTCCATCTCCA	2 回目	OIE, 2017
	146R2	TACGGCAGCTGTGCACCTTGT	2 回目	OIE, 2017
②シヤトル PCR法	P1	ATCATGGCTGCTTCCACAGAC	1 回目	木村ほか、1996
	P2	GGCTGGAGAGGACAAAGACAT	1 回目	木村ほか、1996
	P3	TCTTCATCAGATGCTACTGC	2 回目	木村ほか、1996
	P4	TAACGGCTATCCAGTATCAGC	2 回目	木村ほか、1996

表 3. PCR の反応条件。℃は温度を示し、分は反応時間を示す。

方法名	ステップ数	サイクル反応前		熱変性		アニーリング		伸張反応		サイクル数	サイクル反応後		参照論文等
		℃	分	℃	分	℃	分	℃	分		℃	分	
①OIE法	1回目	94.0	3:00	94.0	1:00	55.0	1:00	72.0	2:00	40	72.0	5:00	OIE, 2017
	2回目	94.0	3:00	94.0	1:00	55.0	1:00	72.0	2:00	40	72.0	5:00	OIE, 2017
②シヤトルPCR法	1回目	95.0	3:00	95.0	1:00	57.0	1:30	-	-	25	72.0	5:00	木村ほか、1996
	2回目	95.0	3:00	95.0	1:00	57.0	1:30	-	-	30	72.0	5:00	木村ほか、1996

表 4. 2019 年度導入クルマエビの PAV ウイルスの PCR 検査結果

産地	検体数	合計陽性数	陽性率	OIE(2017)				木村ら (1996)		サンプルナンバー	備考
				1st PCR	2nd PCR	1st PCR	2nd PCR				
三重県	40	21	52.5	3	20	0	5	E9~E48			
福岡県	25	18	72.0	10	17	5	15	E60~E64、E79~E98	10月と11月の2回購入		
熊本県	14	7	50.0	4	5	0	5	E65~E78			
久米島	11	0	0.0	0	0	0	0	E49~E59	夏エビ試験の斃死個体		