

【研究報告】

# 宮古島のクルマエビ養殖場及び周辺域における PRDV の保有状況

玉城 正国, 安里 聖貴\*

## Presence of penaeid rod-shaped DNA virus in aquaculture ponds and adjacent areas of Miyako Island

Masatoki Tamaki, Asato Masaki\*

宮古島のクルマエビ養殖場とその周辺域の環境生物と環境水から DNA を抽出し、Nested-PCR 法またはリアルタイム PCR 法を用いてクルマエビ急性ウイルス血症 (Penaeid acute viremia : PAV) の原因ウイルス (Penaeid rod-shaped DNA virus : PRDV) 保有調査を実施した。その結果、2022 年 4 月から 2025 年 3 月までの調査期間中、環境生物では 526 検体中 112 検体 (21.3%) で、環境水では 360 検体中 55 検体 (15.3%) で陽性が確認された。PAV が継続発生していた養殖場の内外では様々な環境生物が PRDV を継続して保有していることが確認されたことから、環境生物が PRDV を定着させている可能性が示唆された。

クルマエビ急性ウイルス血症 (Penaeid acute viremia : PAV) は、1993 年に、中国産のクルマエビ種苗を導入した日本各地の養殖場で初めて発生し、広島以西の 6 県 (広島県、山口県、大分県、熊本県、鹿児島県、沖縄県) で大量斃死を引き起こした (中野ら, 1993)。その後、原因ウイルス (Penaeid rod-shaped DNA virus : PRDV) は多くの野生のエビ・カニから検出されるようになり、すでに日本周辺海域に定着していると考えられている (桃山ら, 2005; 稲田ら, 2017)。

沖縄県では 2002 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 の被害は減少してきた (照屋ら, 2018)。しかし、宮古島のクルマエビ養殖場において 2016 年より連続して PAV が発生し、2021 年には大きな被害をもたらした。そこで、本事業では PAV の原因ウイルスである PRDV 発生源の究明と PRDV 顕在状況に応じた防除対策を検討するため、宮古島のクルマエビ養殖場とその周辺域の環境生物の PRDV 保有調査及び環境水の DNA 調査を実施した。

### 材料及び方法

#### (1) 生物の採集及び採水

検体の採集は、宮古島の特定のクルマエビ養殖場とその周辺海域に加え、閉鎖性水域で病原体の滞留する可能性が考えられる周辺ため池の環境生物、環境水を 2022 年 4 月から 2025 年 3 月までの期間に毎月 1 回の頻度でクルマエビ養殖場職員、宮古農林水産振興センター普及指導員が実施した。また、2025 年 1 月以降はため池の埋め立てにより、ため池を除く 9 地点から採集を実施した。比較対象として、2022 年度は、過去に PAV が発生した養殖場を含む宮古島以外の県内離島の養殖池の環境水から、2023 年度は、過去に PAV が発生した沖縄本島中南部の養殖場を含む沖縄本島内の養殖池から採集した。

#### (2) 環境生物の分析

環境生物の PRDV 保有調査では、養殖池やその周辺環境で得られた甲殻類や多毛類、魚類、貝類等計 21 種類、合計 526 検体を用いた。採集した環境生物は、凍結保存し、後日それらを DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 69504) を用いて DNA 抽出を行い、OIE マニュアル記載方法の Nested-PCR 法 (Lo et al., 1996a; Lo et al., 1996b) またはリアルタイム PCR 法 (Durand & Lightner, 2002) で PRDV 保有状況を調べた。

#### (3) 環境水の分析

環境水の DNA 調査は、宮古島の特定のクルマエビ養殖場内の各養殖池及び場外の環境水、計 344 検体と、宮古島以外の県内離島 (久米島、石垣島、竹富島、与那国島)、沖縄島の養殖池の環境水、計 16 検体の合計 360 検体を用いた。検体は -20℃ 以下で冷凍保存し、後日それらを解凍してからミルクミリポア吸引ろ過キットを用いてメンブレンフィルター (孔径 : 0.8 µm, 0.45 µm, 0.22 µm, 0.1 µm) でろ過した。その後、NucleoSpin® Microbial DNA (TaKaRa U0235B) キットを用いて DNA 抽出を行い、リアルタイム PCR 法 (Durand & Lightner, 2002) によってウイルスの有無を確認し、Cq 値 (定量サイクル値) からウイルス量を定量化した。

### 結 果

#### (1) 環境生物の PRDV 保有調査

##### 1) 2022 年度の環境生物 PRDV 保有調査

2022 年度の環境生物の PRDV 保有状況調査では、Nested PCR 法で検査を実施した。その結果、検査したすべての検体から PRDV は検出されなかった (表 1)。

\* E-mail : asatmski@pref.okinawa.lg.jp , 本所 (現所属 : 水産課)

表 1 クルマエビ養殖場周辺環境生物の Nested PCR 法による PRDV 保有状況調査結果 (2022 年度)。

| 採集場所    | 生物種        | 検査数 | 陽性数 |
|---------|------------|-----|-----|
| 養殖池、排水路 | イワガニ       | 52  | 0   |
| 養殖池     | ヨコエビ       | 34  | 0   |
| 養殖池     | ガザミ        | 18  | 0   |
| 養殖池     | スジエビモドキ    | 13  | 0   |
| 排水路     | ゴカイ        | 7   | 0   |
| 養殖池     | ミナミベニツケモドキ | 2   | 0   |
| 合計      |            | 126 | 0   |

## 2) 2023－2024 年度の環境生物 PRDV 保有調査

2023 年度は 233 検体中 61 検体 (26.2%) で陽性を確認し、ウイルス量は Cq 値で 34.41－42.67 の範囲であった (表 2)。環境生物 14 種類中 12 種類から陽性が確認された。2024 年度は 167 検体中 51 検体 (30.5%) で陽性を確認し、ウイルス量は Cq 値で 30.66－44.76 の範囲であった。環境生物 13 種類中 12 種から陽性が確認された (表 3)。

表 2 クルマエビ養殖場周辺環境生物のリアルタイム PCR 法による PRDV 保有状況調査結果 (2023 年度)。

| 採集場所    | 生物種        | 検査数 | 陽性数 | 陽性率  | Cq 値        |
|---------|------------|-----|-----|------|-------------|
| 養殖池     | イワガニ       | 51  | 12  | 23.5 | 34.41-41.40 |
| 養殖池     | ミナミベニツケモドキ | 48  | 12  | 25.0 | 37.09-41.31 |
| 養殖池     | ガザミ        | 13  | 3   | 23.1 | 39.44-40.52 |
| 養殖池     | ジャノメガザミ    | 2   | 1   | 50.0 | 40.71       |
| 養殖池、排水路 | スジエビモドキ    | 44  | 15  | 34.1 | 37.57-42.42 |
| 養殖池、排水路 | テナガエビ      | 17  | 2   | 11.8 | 37.43-40.46 |
| 養殖池、ため池 | ゲンゴロウ      | 6   | 2   | 33.3 | 38.20-38.90 |
| 養殖池     | カゲロウ       | 2   | 1   | 50.0 | 38.16       |
| 養殖池、排水路 | 巻貝         | 15  | 1   | 6.7  | 37.33       |
| 場外      | ミドリガイ      | 2   | 0   | 0.0  | —           |
| 排水路     | アメフラシ      | 1   | 0   | 0.0  | —           |
| 排水路     | ヨコエビ       | 22  | 10  | 45.5 | 37.74-42.67 |
| 排水路     | コツブムシ      | 4   | 1   | 25.0 | 36.26       |
| 養殖池     | ゴカイ        | 6   | 1   | 16.7 | 37.36       |
| 合計      |            | 233 | 61  | 26.2 |             |

表 3 クルマエビ養殖場周辺環境生物のリアルタイム PCR 法による PRDV 保有状況調査結果 (2024 年度)。

| 採集場所    | 生物種        | 検査数 | 陽性数 | 陽性率   | Cq 値        |
|---------|------------|-----|-----|-------|-------------|
| 養殖池     | イワガニ       | 67  | 18  | 26.9  | 30.66-42.29 |
| 養殖池・中間池 | スジエビ       | 24  | 5   | 20.8  | 39.44-41.33 |
| 養殖池・排水路 | ヨコエビ       | 25  | 7   | 28.0  | 36.81-41.77 |
| 養殖池     | ガザミ        | 13  | 4   | 30.8  | 39.92-44.76 |
| 養殖池     | ミナミベニツケモドキ | 10  | 5   | 50.0  | 38.64-40.25 |
| 養殖池・排水路 | スジエビモドキ    | 9   | 3   | 33.3  | 39.88-41.04 |
| 養殖池     | タイワンガザミ    | 8   | 2   | 25.0  | 39.67-41.35 |
| 養殖池・中間池 | ミナミベニツケ    | 6   | 3   | 50.0  | 40.04-42.17 |
| 養殖池     | イソギンチャクエビ  | 1   | 1   | 100.0 | 37.43       |
| 養殖池     | ゴカイ        | 1   | 1   | 100.0 | 32.29       |
| 養殖池     | ヌマエビ       | 1   | 1   | 100.0 | 37.23       |
| 養殖池     | イッカクガニ     | 1   | 0   | 0.0   |             |
| 中間池     | ボラ         | 1   | 1   | 100.0 | 41.36       |
| 合計      |            | 167 | 51  | 30.5  |             |

## (2) 環境水の DNA 調査

2022 年度は 116 検体中 14 検体 (12.1%) で陽性を確認し、

ウイルス量は Cq 値で 36.00－41.96 の範囲であった (表 4)。それに対し、宮古島以外の県内離島養殖池からは PRDV は検出されなかった (表 4)。2023 年度は 127 検体中 17 検体 (13.4%) で陽性を確認し、ウイルス量は Cq 値で 37.21－44.47 の範囲であった (表 5)。そのうち、沖縄本島養殖池の検体からは PRDV は検出されなかった (表 5)。2024 年度は環境水の DNA 調査では、117 検体中 24 検体 (20.5%) で陽性を確認し、ウイルス量は Cq 値で 36.98－42.09 の範囲であった (表 6)。

表 4 養殖場内外と県内離島養殖場のリアルタイム PCR 法による環境水の PRDV 保有状況調査結果 (2022 年度)。

| 採集場所    | 水種類 | 検査数 | 環境 DNA 調査 |     | 検出率 (%) | Cq 値        |
|---------|-----|-----|-----------|-----|---------|-------------|
|         |     |     | 検出        | 不検出 |         |             |
| 養殖池     | 海水  | 94  | 13        | 81  | 13.8    | 36.00-41.96 |
| 養殖場外    | 海水  | 9   | 0         | 9   | 0       | —           |
| ため池     | 淡水  | 4   | 1         | 3   | 25      | 41.07       |
| 県内離島養殖池 | 海水  | 9   | 0         | 9   | 0       | —           |
| 合計      |     | 116 | 14        | 102 | 12.1    |             |

表 5 養殖場内外と沖縄本島内養殖場のリアルタイム PCR 法による環境水の PRDV 保有状況調査結果 (2023 年度)。

| 採集場所    | 水種類 | 検査数 | 環境 DNA 調査 |     | 検出率 (%) | Cq 値        |
|---------|-----|-----|-----------|-----|---------|-------------|
|         |     |     | 検出        | 不検出 |         |             |
| 養殖池     | 海水  | 96  | 14        | 82  | 14.6    | 38.27-42.74 |
| 養殖場外    | 海水  | 12  | 2         | 10  | 16.7    | 37.21-40.59 |
| ため池     | 淡水  | 12  | 1         | 11  | 8.3     | 44.47       |
| 沖縄本島養殖池 | 海水  | 7   | 0         | 7   | 0.0     | —           |
| 合計      |     | 127 | 17        | 110 | 13.4    |             |

表 6 養殖場内外のリアルタイム PCR 法による環境水の PRDV 保有状況調査結果 (2024 年度)。

| 採集場所 | 水種類 | 検査数 | 環境 DNA 調査 |     | 検出率 (%) | Cq 値        |
|------|-----|-----|-----------|-----|---------|-------------|
|      |     |     | 検出        | 不検出 |         |             |
| 養殖池  | 海水  | 96  | 20        | 77  | 20.8    | 36.98-42.09 |
| 養殖場外 | 海水  | 12  | 3         | 9   | 0       | 38.8-41.41  |
| ため池  | 淡水  | 9   | 1         | 7   | 11.11   | 40.09       |
| 合計   |     | 117 | 24        | 93  | 20.5    |             |

## 考 察

### (1) 環境生物の PRDV 保有調査

2022 年度では、全ての検体から PRDV は検出されなかったが、環境生物は検査手法のほとんどを Nested-PCR 法で行ったため、微量のウイルスは検出されなかった可能性が考えられた (表 1)。そこで次年度以降は、より高感度なリアルタイム PCR 法での環境生物の PRDV 保有調査を実施した。その結果、400 検体中 112 検体 (28%) で陽性を確認した (表 2, 表 3)。一方で、採集検体数には、生物種で偏りがあったため 2023 年度以降の比較的高い陽性率は、それに起因する可能性がある。また、環境生物 21 種類中 17 種類から陽性が確認され、養殖場周辺の多種多様な環境生物が微量ではある

ものの PRDV を保有していることが判明した (表 2, 表 3). PRDV は, 宿主範囲が広く, 現在までに 12 目 21 科 2 亜属 51 属の生物で感染が確認されている (佐藤 2012). 昆虫類であるコウチュウ目 (鞘翅目) やハエ目 (双翅目) で PRDV が検出された事例もある (佐藤 2012). また, PRDV が発生している養殖池から採集されたアシハラガニ *Helice tridens* と同居飼育したクルマエビが PAV を発症した事例 (Maeda et al., 1998; 桃山ら, 2005) や PAV に感染した小型エビを経口投与させたクルマエビが感染した事例 (Momoyama, 2003; 桃山ら, 2005) が知られている. そのため, 宮古島の養殖場付近の昆虫類も含めた多種多様な生物種が PRDV を保有し, PAV の発生源となっている可能性がある.

## (2) 環境水の DNA 調査

事業期間中, 月ごとの陽性率には差があるものの一貫して宮古島のクルマエビ養殖場内外の環境水からは PRDV が検出されることが確認できた (表 4, 表 5, 表 6). これにより, 検出されるウイルス量は微量ではあるが, 環境中に存在し続けていることが判明した. PRDV は, 飼育海水へ添加することによりクルマエビへ感染する事例が知られていることから (桃山ら, 2005), 環境水を媒介して環境生物や養殖クルマエビに感染を広げている可能性もある.

## (3) 総合考察

本調査より, 養殖場内外の環境生物・環境水には微量の PRDV が一貫して検出されることが判明した. これは, クルマエビ養殖場内外の多様な生物が原因ウイルスを保有し, 養殖場内外でウイルスが循環していることを示唆する. また, 環境中にウイルスが存在しているならば, クルマエビをその場所で飼育すると PRDV に感染する可能性が高い. 感染を防ぐためにはウイルスの感染源を除去する, もしくは養殖場内を感染源から隔離する必要があるが, どちらも容易ではないと考えられる. そのため, 今後はウイルス量を減少させる「適正飼育」の取り組みや発病しないための「耐病性エビの導入」などの防疫対策等が重要である. 適正飼育については, 感染し死亡した個体の眼, 遊泳脚, 歩脚にウイルスが存在することが知られており, 感染個体を摂取することで水平感染を引き起こす可能性がある (佐藤 2014) ため, 予防措置として極端な高密度飼育を避けるなどの配慮が必要だと考えられる. 耐病性エビの導入については, 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所が開発した PAV 耐性エビ (菅谷ら, 2022; 吉岡, 2022) の導入試験を開始しており, その結果に期待したい.

## 謝 辞

本事業を実施するのにあたり, 宮古島漁業協同組合の組合長はじめ職員の皆様, クルマエビ養殖場職員, 宮古農林水産振興センター普及指導員には検体の採集や多くのクルマエビに関する情報や助言等を頂いた, ここに記して感謝する.

本事業は宮古島における PAV 発生源調査事業 (水産海洋研究費 (県単独事業)) により実施された.

## 文 献

- Durand S.V. & Lightner D.V. (2002).: Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *J. Fish Dis.*, 25, 381–389.
- 稲田真理, 米加田徹, 伊丹利明, 2017.: クルマエビのホワイトスポット病. *Fish Pathology*, 52(3), 115–119.
- Kazuo Momoyama, 2003.: Detection of White Spot Syndrome Virus from Small Penaeid Shrimp Specimens Caught in the Western Seto Inland Sea. *Fish Pathology*, 38(3), 81–85.
- Lo C.F., Leu J.H., Chen C.H., Peng S.E., Chen Y.T., Chou C.M., Yeh P.Y., Huang C.J., Chou H.Y., Wang C.H. & Kou G.H., (1996a).: Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, 25, 133–141.
- Lo C.F., Ho C.H., Peng S.E., Chen C.H., Hsu H.C., Chiu Y.L., Chang C.F., Liu K.F., Su M.S., Wang C.H. & Kou G.H., (1996b).: White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crab and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.*, 27, 215–225.
- Minoru Maeda, Toshiaki Itami, Atushi Furumoto, Oscar Henning, Tomohiro Imamura, Masakazu Kondo, Ikuzo Hirono, Takashi Aoki, Yukinori Takahashi, 1998.: Detection of Penaeid Rod-shaped DNA Virus (PRDV) in Wild-caught Shrimp and Other Crustaceans. *Fish Pathology*, 33(4), 373–380.
- 桃山和夫, 室賀清邦, 2005.: 日本の養殖クルマエビにおける病害問題. *Fish Pathology*, 40(1), 1–14.
- 中野平二, 河邊博, 梅沢敏, 桃山和夫, 平岡三登里, 井上潔, 大迫典久, 1994.: 1993 年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死: 発生状況および感染実験. *Fish Pathology*, 19(2), 135–139.
- 佐藤 純, 2012.: クルマエビのホワイトスポット病 WSD(whitespot disease)の防除対策に関する研究. 水研センター研報, 第 36 号, 57–106.
- 佐藤純, 2014.: PAV 防除対策. クルマエビ類の成熟・産卵と採卵技術, 5, 111–128.
- 菅谷琢磨, 佐藤純, 2022.: クルマエビのホワイトスポット病耐性への遺伝的な効果と耐病性系統の育成. 月間養殖ビジネス, 3 月号, 4–7.
- 照屋清之介, 寺本沙也加, 2018.: 県外産クルマエビ導入のための PAV 検査 (2019 年度). 沖深層水研報 20 号 (令和元年年度)
- 吉岡宗裕, 2022.: 大分県で実施した耐病性クルマエビの養殖生産試験. 月間養殖ビジネス, 3 月号, 8–11.