

機関番号：82104
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20405033
 研究課題名(和文) タイ汽水産エビ養殖における疫学および池環境調査—疾病回避型養殖法の開発に向けて
 研究課題名(英文) Epidemiological and environmental survey on brackish water shrimp culture in Thailand -Approaches for the development of a disease evading culture method
 研究代表者
 浜野 かおる (HAMANO KAORU)
 独立行政法人国際農林水産業研究センター・主任研究員
 研究者番号：70425528

研究成果の概要(和文)：タイで深刻な 2 種類のエビウイルス性疾病には地域的な発生傾向があり、発生時期も種類によって特徴があった。飼育水からの両ウイルス感染は起こりにくく、養殖池の主要な動植物ベントスにもイエローヘッドウイルス(YHV)は検出されなかった。YHV で死亡したエビ体内の YHV 活性は 1 日後激減した。集約養殖されたウシエビおよびバナメイエビには薬剤耐性菌が検出され、汎用されるオキシテトラサイクリン耐性菌比率は養殖池間で大きく異なり、薬剤投与量を表していると推定された。

研究成果の概要(英文)：There is an occurrence tendency in 2 serious viral epidemics in regional areas in Thailand, with distinct features in the timing of outbreak between the viruses. It is not easy for either virus to be transmitted via the cultivation water, and Yellow Head Virus (YHV) has not been detected in major benthos in the cultivation pond. The YHV activity in infected shrimp significantly declined after 24 hours of death. Anti-biotic resistant bacteria were detected in intensively cultivated *P. monodon* and *L. Vannamei*. We found relatively very low levels of anti-biotic resistant bacteria in several culture ponds. This suggests that antibiotic-resistant bacteria in farmed shrimps can control by preparation of ponds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2009 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：汽水産エビ、ウイルス病、養殖

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国は一人当たりのエビ消費量が世界第 1 位のエビ消費大国であり、その 90% を輸入に頼っており、輸入される冷凍エビの 60% 以上、加工エビの約 80% が、東南アジア諸国の汽水域で養殖されたものである。

(2) 経済性と効率性を重視した養殖法の発展により環境は徐々に悪化し、近年タイでは

エビの成長率低下や疾病の高頻度発生が深刻である。

(3) 従来、東南アジア諸国のエビ養殖場で発生してきた主な疾病が細菌によるものであったため、疾病対策として抗菌剤が使用されてきた。近年では疾病の主流がウイルスとなり抗菌剤では効果がないにも関わらず、未だに養殖業者の間では「保険」として常用されている。

2. 研究の目的

現在東南アジア諸国において、環境・経済両面において大きな問題となっている汽水産エビ類の疾病に対し、以下の調査および実験を実施する。

(1) 汽水産エビ養殖の疫学調査を行う。エビ養殖が盛んな、あるいはかつて盛んであったタイ中部・東部・南部の集約・半集約エビ養殖業者に対して疾病被害等について聞き取り調査を行い、地域・養殖法・疾病発生時期・疾病罹患時のエビの日令・症状などをまとめ、どのような時期にどのような養殖環境でどのような細菌やウイルスが原因となって疾病が起こるのかを明らかにする。

(2) 上記1の聞き取り調査結果から抽出した汽水産エビ養殖の問題点について、実験により分析および検証を試みる。疾病が起こる頻度の高い環境等を実験で再現し、環境諸要因（水温・塩分等）と病原菌の増殖との関係やエビの抵抗性との関係について調べる。

(3) 上記1および2で得られた結果を総合的に検討することにより、疾病に罹患しにくいエビを生産するためには現行の集約的養殖池に何が重要なのかを示す。

3. 研究の方法

(1) タイ国内で汽水産エビ養殖の盛んな地域あるいはかつて盛んであった地域（タイ中部および東部、南部）の養殖場を訪問し、養殖の形態、養殖場の調整法、稚エビの入手先および養殖法、疾病の頻度、疾病時の管理法、疾病後の池の調整法等を飼育担当者から直接聞き取り、疾病の傾向および養殖法と疾病との関係を探る。

(2) タイ国内で頻度の高かったイエローヘッドウイルス病（YHD）について、養殖池および実験室内で、感染の伝播等について検証を行う。養殖池に生息するベントス類がウイルスの宿主か、宿主になり得るのか、を調べる。飼育水を介しての感染がどの程度深刻なのかを検証する。

防疫として使用頻度の高い抗菌剤について、エビに付着している細菌群集中の薬剤耐性実態を調べる。上記1の聞き取り調査の池で、疾病頻度の高い池および疾病の経験のない池等、様々な池から飼育エビを入手し、エビに付着した細菌から耐性菌を分離し、分析する。

(3) 上記1および2の結果から、現状の養殖法の改善策を提案する。

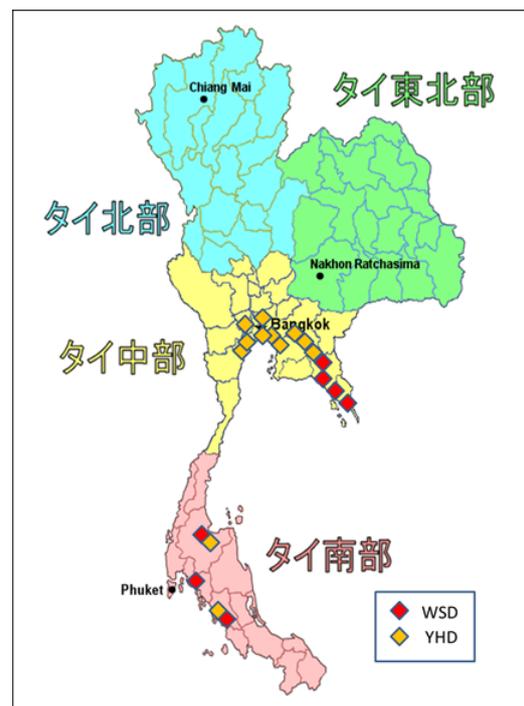
4. 研究成果

(1) 疫学調査

タイではYHDとホワイトスポット病（WSD）の2種類の病気が最も深刻であった。病気の発祥地と言われているタイ中部では聞き取り調査した養殖場の約70%以上が病気を経験しており、疾病経験者の約7割がYHDの被害にあっていた。YHDは雨季の10月から12月頃の発症が多かった。WSD被害率は約15%で最も気温の下がる時期での発症が多かった。タイ東部はもともと病気が少ないと言われている地域であるが、聞き取り業者すべてが何らかの病気を経験しており、YHD経験者はなく、約3分の2の養殖業者がWSDを経験していた。中部と東部とでは流行する病気の種類は大きく異なっていたが、WSD発症時期については中部と大きな違いはなかった。南部では聞き取り業者のうちの約60%が疾病を経験しており、その中の約40%がYHD、約60%がWSD経験者だった。南部では1990年代からの病気の急激な広がりや養殖業者数が極端に減少した結果、病気の被害件数も激減し、近年では病気はほとんど発生していない。病気経験者のうち、中部では約70%以上が病気発覚後ただちに収穫すると答えており、東部では30%、南部では20%であった。

表1 疫学調査結果

%	疾病経験率	YHD経験率	WSD経験率	疾病時の収穫率
タイ中部	74	70	14	70
タイ東部	100	0	66	30
タイ南部	60	40	60	20



(2) 実験による検証

① 養殖池における YHV 感染結果

2009年11月20日に、サムソングラム県のウシエビ養殖場の1つの池 No. 8 で YHD の発症を目視で確認した。その日より一連の池 9 池 (No. 7-15) それぞれからウシエビのサンプリングを開始した。汚染に細心の注意を払いながら、継時的に各池から5尾ずつウシエビを採取し、採血後液体窒素で即時血リンパ液を凍結して実験室に持ち帰った。定法にて RNA を抽出し、cDNA に変換し、イエローヘッドウイルス (YHV) 1 型に特異的なプライマー2 セットを用いて、エビのウイルス感染の有無を調べた。同時に毎日目視にて各池の瀕死エビおよび死エビの有無を確認した。9 池はそれぞれ隣り合っているがおおの独立した池で、すべて閉鎖式集約養殖法を採用しており、池間の飼育水の交換はなく、漏水も確認されなかった。各池での斃死エビの確認時期は大きく異なっており、No. 8 池から発覚し、その後 No. 9→10→7→11→13→12 と続き、大きく遅れて No. 14→15 と、最終的にすべての池で YHD による死エビを確認した。

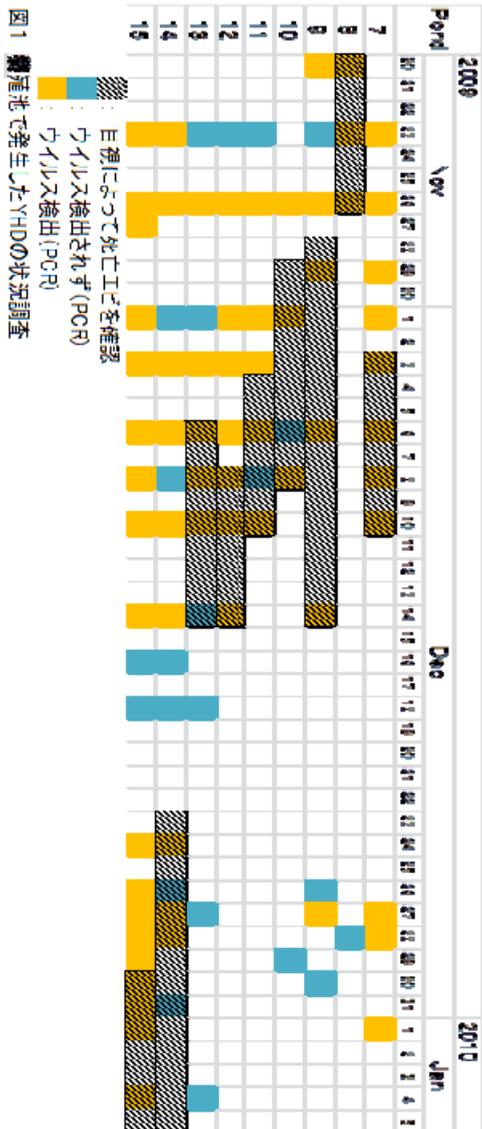


図1 養殖池で発生したYHDの状況調査

一方、PCR 検出によるエビのウイルスの有無に関しては、すべての池のエビにほぼ同時期に検出されており、目視による死エビ検出時期と大きく異なっていた (図 1)。各池で死エビを確認した後は投餌を中止し、エアレーションのみで飼育を継続した。2010年の3月にすべての池から生残エビを収穫した。各池で平均約100尾の生残エビが捕獲され、生残個体のYHV保有率を先と同様にPCRで確認したところ、池によって保有率が異なっており、0-30%の幅で保有していた。YHVを保持していたエビは nested PCR でのみ確認可能で、1stPCR では確認できなかった。

YHD の発生時に、養殖池に生息する主要なベントス生物を採取し、それらのYHV保有の有無を調べた。集約的エビ養殖池に通常観察される生物類である巻貝 (*Stenothyra sp.* および *Cerithidea cingulata*)、二枚貝 (*Mytilopsis adamsi*)、フジツボ (*Amphibalanus reticulatus*)、アミ (*Mesopodopsis tenuipes*)、ハゼ (*Acentrogobius viridipunctatus*) を採取し、定法にて mRNA を抽出し、cDNA を作製後 YHV 特異的 PCR プライマーセット 2 種類を用い PCR にてウイルス検出を試みた。貝類等は多糖類を多く含み、PCR による遺伝子増幅が時折阻害されるため、RNA 抽出時に少量の YHV 液を加えたものを予め陽性対照として用意し、同様に操作しウイルス検出が妨害されていないことを同時に確認した。ウシエビ以外はいずれの生物のサンプルからも YHV は検出されなかった。図 2 に示すように YHV 液を添加したサンプルではすべて PCR 増幅産物が得られているため、サンプルに含まれる多糖類の影響によって増幅が阻害されていることはないと考えられた。

n 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

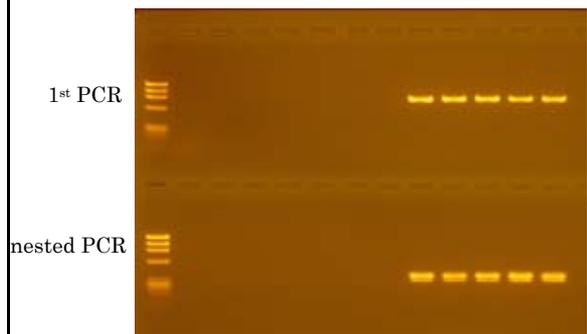


図2 YHV 感染ウシエビ池より採取した生物からの YHV の検出
n. ネガティブサンプル、1. 巻貝 (*Stenothyra sp.*)、2. 巻貝 (*Cerithidea cingulata*)、3. 二枚貝 (*Mytilopsis adamsi*)、4. フジツボ (*Amphibalanus reticulatus*)、5. アミ (*Mesopodopsis tenuipes*)、6. ハゼ (*Acentrogobius viridipunctatus*)、7~11は1~5の RNA 抽出時に YHV 液を加え同様に操作したもの

② 飼育水からの感染実験

YHV がどの程度飼育水を介して感染するかを実験的に調べた。100 L のガラス水槽 2

ケを接続し、飼育水はポンプにより両水槽を循環させた。5セット用意し、ウシエビは各水槽（10水槽）に2尾ずつ收容し、片側の水槽收容のエビ1尾にのみ、YHDによる瀕死のエビから作成したYHV 10^{-6} 液 100μ 1を筋肉中に注入した。他方の水槽には飼育水流入部に 1μ のフィルターを取り付け、他方の水槽から粒子等が混入するのを防御し、飼育水のみが循環するように設計した。接種2日後、YHV液を接種したエビはすべて死亡した。その3日あるいは4日後、死亡したエビと同居のエビすべてが死亡した。YHVを接種し死亡したエビの遊泳肢等は瀕死の状態時に同居のエビに食されていた。

斃死個体はYHV感染を確認するために一部鰓を切りとり水槽に戻した。2週間後、飼育水のみ循環されているフィルター付きの水槽内のエビはすべて生存していた（図3）。斃死個体、生残個体すべての鰓を用いて、RT-PCRでYHV感染の有無を確認したところ、斃死個体はすべてYHVポジティブ（1st PCR プラス）、生残個体はすべてYHVネガティブ（nested PCR マイナス）だった。

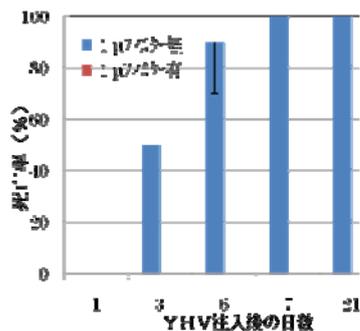


図3 飼育水循環によるYHV感染

③YHV活性保持時間

YHDで死亡したエビの体内で、YHVが活性をどの程度維持できるのかを調べるために下記の実験を行った。YHD瀕死エビの肝臓（HP）を4倍量の滅菌PBSでホモジネートし、8000g、10分遠心後の上清を 10^8 倍に滅菌PBSで希釈し（YHV 10^{-8} ）、 0.22μ のフィルターでろ過した後、 100μ 1を約20gのウシエビに筋肉注射してYHV感染エビを作成した。そのYHV感染エビの致死後0、12、24時間水槽内に放置（水温約 25°C に調整）した後取出し、先と同様に上清を作成し、 10^3 倍にPBSで希釈後ろ過したものを試験液として用いた。YHV非感染エビも同様に処理し対照とした。それら各液 100μ 1をそれぞれ10尾のエビ（体重約20g）に筋肉注射した後1尾ずつ收容し、死亡率とYHV感染率を調べた（図4）。注射後2週間エビを観察（水温約 25°C ）し、死亡したものは直ちに鰓を取りだし -80°C に保存した。2週間後生存していた個体についても、すべて鰓を採取し、 -80°C に保存後、

すべてのエビについてPCRによりYHV感染を調べた。瀕死エビ（死亡後0時間）および死亡後12時間のHP希釈液は同程度のエビの死亡を引き起こしたが、24時間経過したHP液でのエビの死亡は顕著に低下し、YHV非感染エビHP抽出液を注射したものと死亡率においては大きな差は見られなかった（図4）。

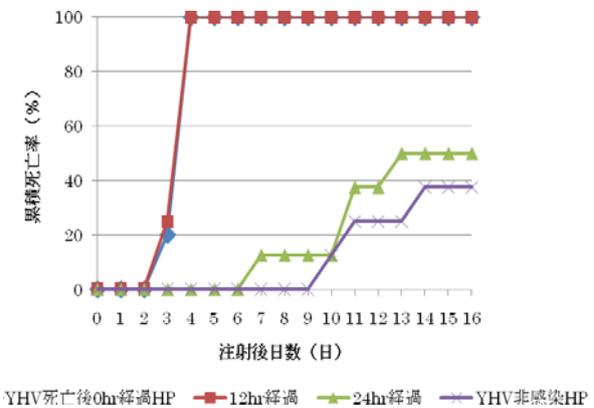


図4 YHD死亡エビ肝臓抽出液によるYHV活性評価

その後、死亡および生残エビすべてから鰓を採取し、PCRおよびnestedPCRによってYHVに感染しているかどうかを調べた結果、YHV非感染エビからのHP抽出液を筋肉注射した死亡エビ生残エビすべてにYHV感染は確認されなかったが、YHD死亡24時間経過のHP抽出液を筋肉注射した死亡エビおよび生残エビの10%が1stPCRでYHVが検出され、nestedPCRでは約50%のエビにYHV感染が見られた。これまでの実験結果から、nestedPCRのみでYHVが検出されるエビでは斃死が確認されないことがわかっており、YHD死亡24時間後にはYHV活性は大きく低下するということが新たに明らかとなった。

④エビ付着細菌群集中の薬剤耐性の実態

各地域の集約エビ養殖池から数池を選択し、5尾を1サンプルとしてPBSで洗浄したのち9倍量のPBSでホモジナイズし、10倍の希釈系列を作成してその 100μ 1をTSA培地および $8\mu\text{g/ml}$ オキシテトラサイクリン（OTC）含TSA培地に塗布した。コロニーを計数しOTC耐性菌比率を求めた。サンプルから得られたコロニー180個を選択し、rRNAの配列から種類を同定した。その後定法により分離菌のOTC最小発育阻害濃度および多剤耐性状況を調べた。水産養殖で汎用される薬剤であるOTC耐性菌の一般細菌数に対する各池の比率の範囲はバナメイエビが0.3-52.1%、ウシエビが0.008-22.3%であった（図5）。

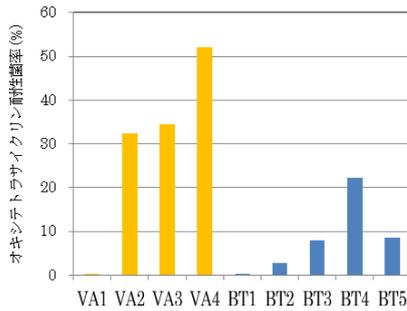


図5 集約養殖池のパナメイエビ(VA)およびウシエビ(BT)付着 OTC 耐性菌の総生菌数に対する割合

OTC 耐性菌比率は養殖池間で大きく異なり、養殖池への投与薬剤量の差を表していると推定できた。代表的な菌株に対して抗生剤の最小発育阻害濃度を測定したところ、いずれの菌株も OTC に対して高い耐性を示した(表 2)。単離された OTC 耐性菌株の約 8 割が多剤耐性を持っていた(表 3)。

OTC	菌株	最小発育阻害濃度 (μg/ml)												
		0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8	25.6	51.2	102.4	
TSA	<i>Aeromonas</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Shewanella</i> spp.	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Lactococcus</i> spp.	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TSA	<i>Aeromonas</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Shewanella</i> spp.	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Lactococcus</i> spp.	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

分離培養	培養グループ	菌株数	多剤耐性菌株数
OTC	<i>Aeromonas</i> spp.	18	OTC(6), OTC/EM(2), OTC/ABP/NA(10),
	<i>Shewanella</i> spp.	3	OTC(1), OTC/SM(1), OTC/NA(1)
	<i>Lactococcus</i> spp.	8	OTC/SM/NA(8)
TSA	<i>Aeromonas</i> spp.	8	EM(3), NA(1), OTC/ABP/NA(3), OTC/ABP/EM/NA(1)
	<i>Shewanella</i> spp.	4	ABP(1), SM(1), SM/NA(1), not(1)
	<i>Lactococcus</i> spp.	4	SM/NA(3), OTC/SM/NA(1)
	<i>Vibrio</i> spp.	9	ABP(4), SM(2), EM(1), not(2)

(3) 現在の養殖法の改善策について

現在の東南アジア諸国における汽水産エビの養殖法は、疾病のリスクを下げるために飼育期間中飼育水の交換を最小限とする閉鎖式集約養殖法へと変換している。本研究の結果からは、現在最も恐れられている YHD は飼育水を介しての感染はあまり深刻でなく、養殖池に生息している主要なベントス類から水平感染が起こる可能性も低いことが示された。また、放流種苗がもともとウイルスを持っている可能性が高く、閉鎖式養殖法によって環境変動が大きくなり体調が悪化したエビの体内でウイルスが増殖して発病する個体が出現した後、瀕死個体を健全個体が食することによって水平感染が起こり、疾病が池内に蔓延する可能性が示唆された。さらに疾病時に収穫を行うことにより、病気の被害を周辺地域に広げてしまう危険性が高いと推定された。また、疾病を防御するために使っている抗菌剤の使用が、逆にエビ体表に薬剤耐性菌を増やしてしまう結果となっていた。

改善策としては、種苗生産には親エビのウイルス保有状態を調べ可能な限りウイルスを保持していない稚エビを放流すること、閉鎖式養殖法から環境変動の小さい開放式に変更すること、疾病の兆候が見られた場合には収穫を絶対に行わないこと、疾病防御のために抗菌剤を使用する必要はないこと、を広く養殖業者に知らせることにより、現在の東南アジア諸国におけるエビ養殖は大きく改善できると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4件)

- ① Y. Yano, K. Hamano, M. Satomi, I. Tsutsui and D. Aue-umneoy, Diversity and characterization of oxytetracycline-resistant bacteria associated with non-native species, white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), and native species, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), intensively cultured in Thailand, *Journal of Applied Microbiology*, 査読有, 110, 2011, 713-722
- ② 浜野かおる, 筒井功, 前野幸男, 東南アジア諸国における汽水産エビ養殖の現状と問題点, *日本水産学会誌*, 査読有, 76, 2010, 1123-1128
- ③ 浜野かおる, 筒井功, D. Aue-umneoy, ウシエビ養殖へのジュズモ科海藻 (*Chaetomorpha ligustica*) の利用(タイ語), *Aqua Biz*, 査読無, 4, 2010, 46-49

- ④ I. Tsutsui, P. Kanjanaworakul, P. Srisapoome, D. Aue-Umneoy, K. Hamano, Growth of giant tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius, under co-culture with a discarded filamentous seaweed, *Chaetomorpha ligustica* (Kützing) Kützing, at an aquarium-scale, Aquaculture International, 査読有, 18, 2010, 545-553

独立行政法人国際農林水産業研究センター・水産領域・主任研究員
研究者番号：50311951

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① K. Hamano, J. Songphatkaew, D. Aue-umneoy, P. Srisapoome, and I. Tsutsui, A newly developing co-culture system using discarded seaweed to enhance the production of indigenous shrimp species in Southeast Asia, JIRCAS workshop, 2010, Dec.,7th, Tsukuba
- ② P. Srisapoome, K. Hamano, I. Tsutsui, S. Paankao, N. Areechon, S. Tunkijjanukij and K. Iiyama, Acute toxicity, immunostimulation effects and disease resistance against yellow-head virus of lignin in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), JIRCAS workshop, 2010, Dec.,7th, Tsukuba
- ③ I. Tsutsui, K. Hamano, P. Srisapoome, D. Aue-Umnuoy, and S. Kitamura, Rhizoclonium tortuosum, a commonly discarded filamentous seaweed, is useful in shrimp culture, 5th World Fisheries Congress, 2008 Oct, Yokohama

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜野 かおる(HAMANO KAORU)
独立行政法人国際農林水産業研究センター・水産領域・主任研究員
研究者番号：70425528

(2) 研究分担者

矢野 豊(YANO YUTAKA)
独立行政法人水産総合研究センター・利用加工部・室長
研究者番号：70371854
内田 基晴 (UCHIDA MOTOHARU)
独立行政法人水産総合研究センター・生産環境部・主任研究員
研究者番号：70371961
高橋 徹(TAKAHASHI TORU)
熊本保健科学大学・保険科学部・衛生技術科・教授
研究者番号：70369122

(3) 連携研究者

花村 幸生 (HANAMURA YUKIO)