

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(A) (海外学術調査)

研究期間：2011～2015

課題番号：23255013

研究課題名(和文) 東南アジア諸国における汽水産エビ類の疫学調査および病原ウイルス伝播経路の解明

研究課題名(英文) Epidemiological Study and Elucidation on Spread Route of Shrimp Viral Diseases in Southeast Asian Countries

研究代表者

浜野 かおる (hamano, kaoru)

国立研究開発法人水産総合研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：40371827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,100,000円

研究成果の概要(和文)：マレーシアの種苗生産機関で使用した親ウシエビ雌の病原ウイルス保有検査ではYHVおよびIHHNVを保有していた。タイ、ベトナムで生産されたウシエビは、WSSVおよびYHV、IHHNVが検出され、インドネシアではIMNV感染が特徴的であった。ウイルス遺伝子配列解析結果から、ウイルス疾病は垂直感染によるものが大きかった。養殖バナメイのAHPNDについては、マレーシアの6養殖池のエビから分離を行ったところ、AHPND菌の分離頻度は0.8～29%であり、AHPND菌と非AHPND菌との共存培養後には非AHPND菌が99.9%以上を占め、株間での競合によるAHPND菌制御の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Yellow head virus (YHV) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) infections were detected amongst *P.monodon* broodstocks used in a nursery in Malaysia. Farmed shrimp in Indonesia was characteristic of infectious myonecrosis virus (IMNV) infection. YHV was frequently detected in farmed shrimps in Thailand. Results of viral gene sequencing revealed that pathogenic viruses spread via vertical transmission from their parents. In cultivated *P. vannamei*, causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease isolated between 0.8-29% among 6 cultivation ponds in Malaysia. However, co-cultivation of *V. parahaemolyticus* with acute hepatopancreatic necrosis disease (VPAHPND) and VP without AHPND resulted in the latter accounting for more than 99.9%, which suggests that VPAHPND is possibly regulated by interstrain competition.

研究分野：エビ疾病

キーワード：クルマエビ類 疾病 伝播経路

1. 研究開始当初の背景

我国は一人当たりのエビ消費量が世界1位のエビ消費大国であり、その約90%を輸入に頼っている。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。生産国である東南アジア諸国のエビ養殖は、経済性と効率性を重視した集約的養殖法すなわち養殖池にエビを高密度で収容して大量給餌を行う養殖法が一般的であるが、この手法の発展により養殖池内の自家汚染が進み、近年ではエビの成長率低下や疾病が高頻度に起こっている。世界各国の水産病理学者らによって汽水産エビ類の各種ウイルス病の診断方法が開発されてきた一方、疾病の有効な防除法に関する研究はあまり行われておらず、養殖の現場では、疾病発症時の対応法や未然に防御する方策がなく、手探り状態で対策を試みているのが現状である。効果的な疾病対策が進展しない背景には、養殖業者はわずかな現金収入を得るために疾病の兆候が見られた早い時点で収穫を行うため実際の被害が表面化しにくいこと、疾病の頻発はエビの国際市場から信頼を失うため東南アジア諸国の政府が積極的に疾病の情報を発信してこなかったこと、そのためにエビの疫学調査が積極的に実施されてこなかったことなどが挙げられる。結果、病気の予防・防除に関する研究は極端に少ない。

このように東南アジア諸国での汽水産エビ疾病問題は、当該地域における環境及び経済のために、早急に解決されるべき重大な課題の一つである。そして、われわれが安価なエビを食することは、生産国の犠牲の元に成立していることを、我が国を含む消費国は強く認識する必要があり、我々研究者は、現地の研究者らと共にエビ養殖に関する諸問題解決の道を探り、生産国及び我が国双方の利益に資する研究を行うことが責務であると考えている。

2. 研究の目的

東南アジア諸国のエビ養殖の疾病問題は、当該地域の環境及び経済にとって早急に解決されるべき重大な課題の一つである。汽水産エビ養殖に関わる病原ウイルスの伝播に関する研究は、これまで世界的にもあまり行われておらず、有効な防除法も示されてこなかった。本研究は、汽水産エビ養殖の現場で深刻化している疾病について、発生状況等を疫学調査によって探り、有効な防除法を探ることを目的としている。調査対象を東南アジア諸国(エビ生産量が多いタイ・ベトナム・フィリピン・マレーシア・インドネシア)とし、疫学調査によって養殖業者から直接情報入手し状況を把握すると共に、調査対象国から養殖エビサンプルを入手して、実際に疾病を同定する。さらに、罹患エビサンプルを継続して入手できる養殖池を選定し、生産されたエビを用いて

病原ウイルスの遺伝子変異領域を調べ、ウイルスの伝播経路の推定を行う。上記の結果から、東南アジアにおける疾病防除策を検討する。近年深刻化している細菌性疾病についても試験を行い、防除法について検討する。

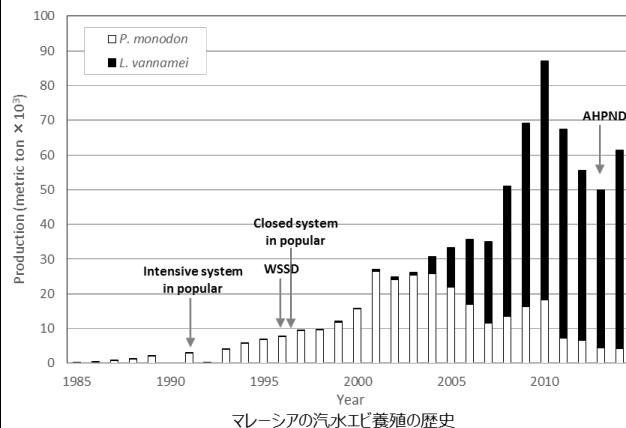
3. 研究の方法

本申請研究では、調査対象国をクルマエビ類の養殖生産量が多いマレーシア・インドネシア・フィリピン・タイ・ベトナムとし、各国のクルマエビ類養殖業者を訪問して、各種疾病の発生案件について聞き取り調査によって情報を収集し分析する。一方で、各国で養殖生産されたクルマエビ類サンプルを入手し、実験によって疾病の同定をおこなう。ウイルス疾病に関しては、病原ウイルスの遺伝子変異領域を分析し、ウイルス疾病の伝播経路を推定するために適した領域を探索し、その領域の配列から感染経路を推定する。細菌性疾病については、エビ養殖池から採取した試料から病原性ピブリオ属細菌の分布状況を調査し、防除策を検討する。

4. 研究成果

疫学調査

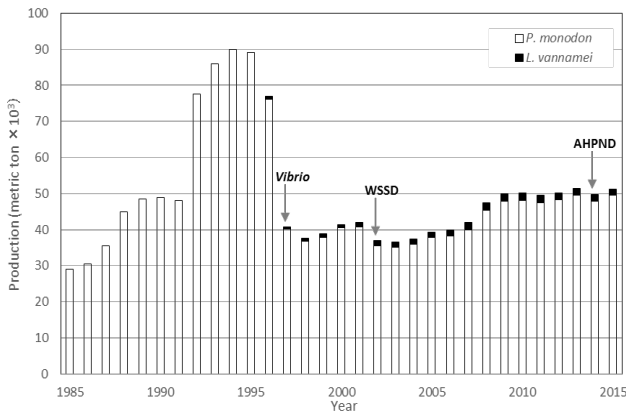
マレーシアでの調査では、*L. vannamei* の病気が深刻になり、在来種 *P. monodon* 養殖への回帰が希望されていた。*P. monodon* の親の採取は、近郊のアンダマン海およびボルネオ島サバ州沖および海外のモザンビーク産で、高成長の点からモザンビーク産が最も評価されていた。*L. vannamei* はシンガポール、タイ等から種苗を輸入していた。*L. vannamei* に急性肝臓壊死症(AHPND)が発生し急速に広がっている一方、ウイルス疾病に関する情報は得られなかった。



インドネシアでは、2006年に感染性筋壊死症(IMN)が発症し2009年まで頻繁に起こっていたが、現在はホワイトスポット病(WSD)のみが流行している。*P. monodon* の親は近海もので、*L. vannamei* の親はハワイから輸入し国内で種苗を生産していた。疾病の広がりから、近年は、親および種苗の輸入はやめ、国内産に切り替えようという動きが活発となっている。

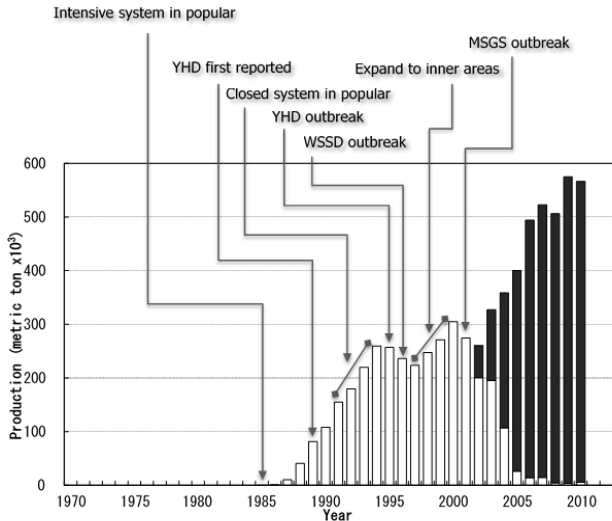
フィリピンでは、1990年の後半から

P.monodon と共に *L. vannamei* の養殖もおこなわれるようになった。疾病は、*P.monodon* で従来からのピブリオ病と WSD の被害が主である。*P.monodon* の親は近海で取れたものを使用している。



フィリピンの汽水エビ養殖の歴史

タイでの聞き取り調査では、集約的養殖業者の約 8 割が何らかの疾病被害を受けており、集約密度が低く天然の状態に近い環境と考えられている半集約養殖場でも 7 割を超える池で病気を経験していた。集約養殖場ではイエローヘッド病 (YHD) および WSD とと思われる症状が半分を占め、半集約養殖場では YHD のみが疑われていた。AHPND は *L. vannamei* の養殖場で発生していたが、近年は



収束傾向である。

タイの汽水エビ養殖の歴史

ベトナムでは、2000 年からバナメイ養殖が非公式に開始され、2008 年政府が承認した。その後、ホーチミンの北部の養殖場でバナメイ養殖に変わっており、南部のカマウ省の粗放養殖場でのみウシエビ養殖が行われるようになった。シンガポールおよびハワイからバナメイの親エビを購入し、国内で稚エビを養成している。時折 AHPND が池入れ後すぐに発症する。小規模バナメイ養殖場では、頻繁に病気が発生しており、WSD と AHP

ND に悩まされている。WSD では急激に死んでしまうが、EMS の場合の致死は遅い。一方、親ウシエビは地のものを使用している。2011 年のベトナムでの調査では、在来種ウシエビ養殖から外来種バナメイ養殖へと大きく変化していたが、2015 年の養殖による生産量はウシエビとバナメイがそれぞれ 50% となった。ウシエビ養殖では小規模の養殖業者が多く、南部のメコンデルタが養殖の主要地域であり、現在は活での販売が中心となっている。一方、バナメイは、細菌による疾病である AHPND および近年の微胞子虫によるマイクロスポリジア *Enterocytozoon hepatopenaei* による被害が深刻となり、生産は大企業によるビニールハウス内での養殖へと変化している。ビニールハウス内に底面をシートで覆った池 (約 1000m²) を作り、完全閉鎖式でバナメイを育てている。40 トン/ha のバナメイを生産できる (20 g/尾で計算すると 200 尾/m²)。バナメイは成長が早く、殻が柔らかく、小型のサイズで販売できるため、このような養殖法が可能であるとのこと。販売サイズはウシエビで 20-40 尾/kg で飼育に 4.5-5 ヶ月かかるが、バナメイでは 60-100 尾/kg で 2.5 ヶ月程度で出荷が可能。現在の主要な疾病はマイクロスポリジアで一年中発症する。肝臓に寄生し、共食いによって広がる。斃死率は低いが、感染すると成長が非常に遅くなる。被害は昨年度から深刻となっている。AHPND やウイルス病も発症していると考えられるが、実情ははっきりしない。種苗生産に使用する親エビはいずれも輸入で、バナメイは中国、タイ、ハワイから、ウシエビはアフリカ諸国、タイから。水産市場では、100g/尾を越える天然ウシエビ (氷上で 95 万ドン/kg) も売られていたが、近海で捕れる天然ウシエビは、種苗生産にはほとんど利用されていない。

疫学調査結果の傾向として、自国近海で捕獲された親エビを利用している国では疾病の種類は限られており、親エビや種苗を輸入している国では、新疾病が発生し、疾病の種類が増加している。

ウイルス保持検査

各国で入手した汽水エビについてウイルス保持検査を nestedPCR で行ったところ、ホワイトスポットウイルス (WSV) および伝染性皮下造血管壊死症ウイルス (IHHNV) は 5 カ国すべてにおいて検出され、IHHNV による強い感染が多く、国で見られた。イエローヘッドウイルス (YHV) はタイとマレーシアで検出され、特にタイでの感染例が多かった。インドネシアでは伝染性筋壊死症ウイルス (IMNV) の感染が特徴的であった。タウラシンドロームウイルス (TSV) はすべての国で検出されず、ウイルスフリー種苗が普及していることが窺われた。各国で AHPND の発生が深刻化した後、池入れの一ヶ月程度で発症し、ウイルス疾病が

顕在化しなくなっているが、依然としてウイルス疾病は存在していることが示唆された。

	WSSV	YHV	IMNV	TSV	IHHNV
マレーシア	+	+	-	-	++
インドネシア	++	-	++	-	++
フィリピン	+	-	-	-	+
タイ	+	++	-	-	++
ベトナム	+	-	-	-	++

伝播経路の推定

連続してホワイトスポット病が発生したクルマエビ養殖池（A養殖場1号池）から、養殖回次（親）の異なる罹患検体を入手し、ホワイトスポットウイルス（WSSV）保有検査により陽性と認められた天然クルマエビを加えて、WSSVの検査材料とした。罹患クルマエビの鰓、遊泳肢等からDNAを抽出し、試料とした。WSSV遺伝子のVNTR(variable number of tandem repeat)3箇所(ORF75、ORF94、ORF125)、Indel領域2箇所(Indel I、Indel II)を増幅、産物を精製後、塩基配列を決定し、パターンの判別を行った。同池で2回次生産の検体は、1回次生産の検体と比較してWSSV ORF125の配列においてはタンデムリピート数が2回少なく、またIndel IIの配列は他の感染エビのウイルス配列と比較すると欠損や挿入があり、両領域でウイルスの変異の判別が可能であった。同池で生産したエビであっても、養殖回次（親）が異なる場合には、WSSV遺伝子配列に違いがあることが明らかとなった。Indel I及びORF94の配列には差がなく、ORF75の配列は増幅断片が長いものがあり、それらの領域は不適であった。WSSV陽性天然クルマエビ(n=21)についてORF125配列を調べたところ、8種類のユニット(1ユニット=69bp)からなり、タンデムリピートが4回~11回(276-759bp)の18パターンと多様であった。増幅断片長が適当で、パターンを判別しやすいORF125領域が、感染経路の推定に適当であると思われた。

A養殖場 1号池 1回次	125T	125T	125U	125U		
A養殖場 1号池 2回次	125T	125T	125T	125T	125U	125U
A養殖場 2号池	125T	125T	125T	125T	125U	125U
B養殖場	125A	125T	125T	125U	125U	125U

同池であっても生産回次（親エビ）が異なる場合はウイルス遺伝子配列（ORF125）に違いが見られ、異池であっても親が同じ場合はウイルス遺伝子配列が同じであることを示している。ウイルスは親からの垂直感染によって伝播する可能性が高いことを示している。

YHVの場合も同様な結果が得られており、

YHV遺伝子のORF1b前半部分およびORF3の中央部分に明確な塩基置換が数箇所起こっており、感染経路の推定に相当であることが明らかとなった。

WSSVおよびYHV両ウイルス共に、親からの垂直感染を防ぐことが疾病防衛に大きく貢献することが示唆された。

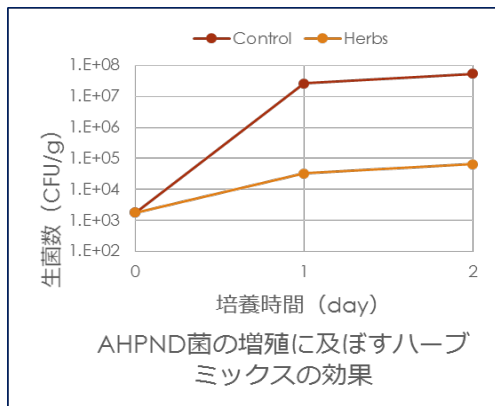
細菌疾病

東南アジアの汽水産養殖エビ類について病原性Vibrio属細菌の分布状況を調査した。タイ国内の14ヶ所のエビ養殖池（水温：29-32℃、塩分：1-5 ppt）から採取した16試料のうち15試料でV. choleraeが検出され、生菌数はエビ体重グラムあたり最大252,000 MPNであった。またV. parahaemolyticusは6試料で検出され、生菌数は最大6,300,000 MPN/g、V. vulnificusは2試料から最大1,300 MPN/gで検出された。Vibrio属細菌235菌株の抗生物質感受性(主要12種類)を検討したところ、一部の分離株でampicillinおよびoxytetracyclineへの耐性が見いだされた。耐性菌株からはoxytetracycline耐性遺伝子が検出され、プラスミド等の可動性因子の一部であった。また新興養殖エビ類感染症であるAHPNDの原因菌V. parahaemolyticus(Vp-AHPND)の分布調査(マレーシア)では、当該疾病の発生が疑われた6養殖池のうち4養殖池でVp-AHPNDが分離された。分離されたVp-AHPND11株のうち5株は水産養殖で多用されるoxytetracyclineに耐性を示し、耐性遺伝子も検出された。これらの結果はoxytetracyclineはAHPNDに対する予防的・治療的効果は薄いだけでなく、環境中でのAHPND菌の蔓延を助長する可能性を示唆している。

AHPND菌の防除策

AHPND菌に対するハーブ・スパイス類の抗菌効果(モデル試験)

エビ人工胃内容物(乾燥餌料1g+エビ肝臓抽出液1ml+ハーブミックス抽出液2ml)を作成し、これにAHPND菌を初発菌数1,000/gとなるよう接種した。30℃で培養後の生菌数変化を寒天培地塗布法により検討した。対照区ではハーブ抽出液を生理食塩水で置き換えた。その結果、対照区の生菌数は、培養24時間で10の8乗(1億/g)レベルに達した。一方、ハーブ添加区(最終4%濃度)では、培養24時間で10の4乗/gレベルであった。この結果は、消化管内におけるAHPND菌の増殖を餌料へのハーブミックス添加によって制御できる可能性を示している。



拮抗阻害による AHPND 菌の増殖抑制

養殖エビの AHPND は、Vibrio parahaemolyticus の特定タイプ (AHPND 菌) により引き起こされる。マレーシアにおける養殖エビ調査 (2014 年 3 月) により、6 養殖池のエビから合計 682 株 (43~160 株/池) を分離し、4 養殖池から 64 株の AHPND 菌を分離した。このとき V. parahaemolyticus 全体の分離頻度は、養殖池間で 34~60%であったが、AHPND 菌の分離頻度は 0.8~29%と養殖池間で大きく異なった。次に、AHPND 菌と非 AHPND 菌の共存培養試験 (72 時間) を行ったところ、非 AHPND 菌 14-54 株は、培養後集団内の 99.9% 以上となり、共存させた AHPND 菌は検出限界以下となった。これらの結果は V. parahaemolyticus の株間での競合による AHPND 菌制御の可能性を示唆している。

エビ養殖池におけるビブリオ・パラヘモリティカスおよび AHPND 菌の分離頻度 (2014 マレーシア)

養殖池	分析株数	頻度 (%)	
		V-para	AHPND
A	160	34.3	10
B	43	55.8	2.3
C	51	45.1	0
D	158	37.3	29.1
E	122	42.6	0.8
F	144	60.1	0

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

P. Srisapoome, K. Hamano, I. Tsutsui, S. Pankao, N. Areechon, S. Tunkijanukij, and K. Iiyama. Acute toxicity, immunostimulation effects and disease resistance against yellow-head virus of lignin in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). JIRCAS Working Report, 査読有, 75, 2012, 159-164

Y Yano, K Hamano, M Satomi, I Tsutsui, M Ban, D Aue-um neoy. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Vibrio species related to food safety isolated from

shrimp cultured at inland ponds in Thailand, Food Control, 査読有, 38, 2013, 30-36

Y Yano, K Hamano, I Tsutsui, D Aue-um neoy, M Ban, M Satomi. Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine of shrimps cultured at inland low salinity pond, Food Microbiology, 査読有, 47, 2015, 21-27

K Hamano, T Miyoshi, D Aue-umneoy, P Srisapoome, Y Maeno, I Tsutsui. Waterborne and cannibalism-mediated transmission of the Yellow head virus in *Penaeus monodon*, Aquaculture, 査読有, 437, 2015, 161-166

K Hamano, Y Maeno, S Klomkling, D Aue-umneoy, I Tsutsui. Presence of viral pathogens amongst wild *Penaeus monodon* in Thailand, JARQ 査読有 2016, accepted

〔学会発表〕(計 5 件)

浜野かおる、三好達夫、筒井 功、前野幸男、ウシエビ YHV 感染経路推定の試み、平成 25 年 3 月 9 日、平成 25 年度日本魚病学会春季大会、日本大学生物資源科学部湘南キャンパス (神奈川県・藤沢市)

浜野かおる、三好達夫、筒井 功、マーシーワイルダー、ウシエビにおける YHV 感染経路推定の試み、平成 26 年 3 月 30 日、平成 26 年度日本魚病学会春季大会、函館国際ホテル (北海道・函館市)

三好達夫、久留嶋祥貴、浜野かおる、佐藤 純、WSSV ウイルス検査法による偽陰性発生の検証、平成 26 年 3 月 30 日、平成 26 年度日本魚病学会春季大会、函館国際ホテル (北海道・函館市)

浜野かおる・阿部啓美・Dusit Aue-umneoy・筒井功、タイ沿岸域ウシエビ野生集団における病原ウイルスの存在について、平成 28 年 3 月 13 日、平成 28 年度日本魚病学会春季大会、日本獣医生命科学大学 (東京都・武蔵野市)

阿部啓美・浜野かおる・佐藤純、クルマエビ WSSV 感染経路推定のためのウイルス遺伝子領域の特定、平成 28 年 3 月 13 日、平成 28 年度日本魚病学会春季大会、日本獣医生命科学大学 (東京都・武蔵野市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜野かおる (HAMANO Kaoru)

国立研究開発法人・水産研究教育機構・瀬戸内海区水産研究所・海産無脊椎動物研究センター・研究員

研究者番号：40371827

(2)研究分担者

筒井 功 (TSUTSUI Isao)

国立研究開発法人・国際農林水産業研究センター・水産領域・研究員

研究者番号：80425529

矢野 豊 (YANO Yutaka)

国立研究開発法人・水産研究教育機構・北海道区水産研究所・研究員

研究者番号：70371854

高橋 徹 (TAKAHASHI Toru)

熊本保健科学大学・保険科学部・教授

研究者番号：70369122