

# 養鰻における疾病の早期検知技術の開発

中城 岳・隅川 和・高月 明

## 1 目的

本県ではウナギ養殖が盛んに行われており、その産業規模は年間生産量 300～600 トン、年間生産金額 10～20 億円と、本県における重要な産業となっている。しかし、疾病によるへい死被害が大きな問題となっており、2019 年から 2023 年の県内養鰻業における魚病による年間平均被害金額は約 4 千万円にもものぼる。ウナギ養殖で被害をもたらす疾病はウイルス病、細菌病、寄生虫病の 3 種に大別されるが、県内ではこのうち、ウイルス病の 1 種である「ウイルス性血管内皮壊死症 (Viral endothelial cell necrosis of eel (以下、VECNE))」の被害が一定数を占めており、当該疾病による年間平均被害金額は約 1 千万円となっている (図 1)。

本病は Japanese eel endothelial cells-infecting virus (以下、JEECV) と呼ばれるウイルスを原因とした疾病で、ウナギ以外の魚種での発生は確認されていない。(小川ら, 2022)。本ウイルスは血管の内面を覆う内皮細胞を選択的に侵し、本病に罹患したウナギには鰓弁の中心静脈洞内への多量の血液の流入によるうっ血症状や、鰓蓋や鰭の発赤、腹腔内出血などの症状が見られる (小川ら, 2022)。過去の感染試験においては、死亡率が約 2 週間で 75%に達し (小川ほか, 2022)、致死率の高い疾病と言える。処置方法としては、35℃への昇温や給餌制限が有効であるとされている (田中ら, 2008) が、本病の感染拡大速度は非常に早く、飼育魚のへい死発生を確認した段階では既に飼育池全体に感染が拡大しており、前述の処置実施後もへい死被害が一定期間継続する場合が多い。飼育池内における疾病の感染拡大については、初期に感染した個体の放出する病原体が飼育水を介して他の個体に感染することで飼育池全体に蔓延していくと考えられ、へい死が発生する前段階で飼育水中の病原体が増加すると推察される。そのため、飼育池中のウイルス量の増加を判断基準として疾病の発生を早期に検知できる可能性がある。

本研究では、本県のウナギ養殖においてへい死被害の大きい VECNE の被害抑制を目的として、qPCR を用いた飼育池の飼育水からの原因ウイルス JEECV の定量検出による本病の早期検知技術の開発及び検証を実施した。また、本試験と併せ、分養による感染拡大リスクの解明を目的とした感染試験及び拭き取り検査キットを用いた養殖場内における JEECV 汚染状況の調査を実施した。

## 2 材料と方法

### (1) qPCR を用いた飼育池の飼育水からの原因ウイルス JEECV の定量検出

県内養鰻業者のうち、過去 5 年間で VECNE の発生が見られた A 業者及び B 業者の 2 業者をモニタリング対象とした。いずれの業者も年間通じて水温を約 30℃に加温して養殖を行う周年加温形式である。各業者の飼育池のうち、ウナギが池入れされている飼育池全てをモニタリング対象とした。モニタリング期間及び対象飼育池については、A 業者は 2024 年 5 月から 12 月までの 8 ヶ月間で 11 池を、B 業者は 2024 年 5 月から 2025 年 1 月までの 9 ヶ月間で 5 池を対象とした。これらの飼育池において、1 週間から 1 ヶ月の頻度で飼育水 100mL を採水し、-20℃で 24 時間以上凍結保存した。当該飼育水サンプルは冷凍状態で当所へ持ち帰り、解凍後、水産研究・教育機構 水産技術研究所 養殖部門

病理部ら（2024）の手法に従って、鉄凝集法によりウイルス粒子をフィルター濾過濃縮し、当該フィルターからDNAを抽出後、qPCRに供した。また、水質条件を早期検知の指標とすることを検討するため、飼育水サンプルの一部はポータブル中濃度アンモニア態窒素測定器 HI-97715（HANNA instruments）及びポータブル低濃度亜硝酸態窒素測定器 HI-97707（HANNA instruments）を用いて、飼育水中のアンモニア態窒素量及び亜硝酸態窒素量を測定した。

また、水温データロガー TidbitV2（Onset 社）を用い、各飼育池の調査期間中における1日ごとの水温の推移を測定した。なお、1日ごとの死亡尾数については、養鰻業者が記録した飼育日誌からデータを収集した。

## (2) 分養による感染拡大リスクの解明を目的とした感染試験

養鰻業においては、飼育魚の成長に伴う飼育密度の増加を防ぐために、一定期間ごとに魚体重別に飼育池を分散させる作業（＝分養）を行う。このとき、各飼育池の成長の遅い飼育群は総魚体重が少ないことから、複数の飼育池の飼育魚を同一の飼育池に池入れして飼育する 경우가ほとんどである。しかし、池入れして一定期間が経過した後に、当該飼育池で疾病が発生する事例が多い。これは各飼育群で疾病への感染歴が異なっており、既感染魚が保有していた病原体が未感染魚へ感染したことで疾病が発生したと考えられた。実際に県内養鰻場においては、VECNEの発症歴がある飼育群と発症歴がない飼育群を同一の飼育池に池入れした後、本病が発生し、飼育魚が大量へい死した事例が確認されている。

そこで、VECNE収束後の飼育池の生存魚（既感染群）と、その他の飼育池の魚（未感染群）を用いた同居感染試験を行うことで、既感染群から未感染群へのJEECV感染拡大の可能性を検証し、分養を行った際の感染拡大リスクの解明を試みた。

### ア 供試魚

供試魚は県内養鰻業者から入手した魚体重200～250g/尾のニホンウナギを用いた。既感染群については、VECNEの発症歴がある飼育池から、未感染群については、未発病の飼育池からそれぞれ入手した。なお、各群の10尾の鰓組織からDNeasy Blood & Tissue Kit（Quiagen）を用いてDNAを抽出し、水産研究・教育機構 水産技術研究所 養殖部門 病理部ほか（2024）の手法に従ってqPCRを行い、前者は10尾中6尾が陽性であり、後者は全て陰性であったことを確認している。

### イ 試験区及び飼育条件

試験区は、同居区（10尾+10尾）、既感染群単独区（20尾）、未感染群単独区（20尾）の3区とし、1区あたり500Lパンライト水槽に20尾を収容した。

各飼育池の飼育水容量は200Lで、1回転/5時間の微換水とした。また、飼育水の水温はヒーターで28℃に維持し、十分なエアレーションによって一定の溶存酸素量が保持されるようにした。飼育期間中はおとひめ（日清丸紅飼料株式会社）を給餌率1%で毎日2回に分けて給餌した。

### ウ 供試魚及び飼育水の分析

供試魚については、死亡個体は取り上げ後、実体顕微鏡による鰓組織の観察を行い、同部位か

ら DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて DNA を抽出し、水産研究・教育機構 水産技術研究所 養殖部門 病理部ら（2024）の手法に従って qPCR を行った。陽性反応が見られた場合は Qubit fluorometer (invitrogen) を用いて当該サンプルの DNA 量を測定し、それぞれの抽出 DNA 1.0ng あたりの JEECV 遺伝子量を算出した。なお、生存魚は試験終了日に全て取り上げ、同様の検査を実施した。

また、飼育水については、試験開始 0 日目から試験終了日まで、1 回/1～2 日の頻度でオーバーフロー排水を 100mL 採水し、前述と同様の手法で DNA を抽出した。

### (3) 養殖場内における JEECV 汚染状況の解明

疾病が発生した養殖場においては、施設内の設備や器具類等から病原体の遺伝子が検出された事例が複数報告されている（石川ら, 2021 ; Kawato et al., 2023）。これは疾病によるへい死魚を取り扱った作業員が施設内を移動することにより、手足等に付着した病原体が施設内に拡散されたと考えられている。これにより、未発生飼育池に病原体が侵入し、感染拡大を引き起こす危険性がある。また、JEECV のようなウイルスについては、酸素曝気用の水車の飛沫によって周辺の飼育池へ侵入する可能性も考えられる。

そこで、県内養鰻業者のうち、2024 年度に VECNE の発生が見られた 2 業者（(1) で飼育池のモニタリング調査を行った B 業者、C 業者）の養殖場を調査対象として、拭き取り検査用スワブファイナチェック（アズワン）を用いて、施設内において作業員の手が触れる頻度が高い設備や器具類、水車の飛沫が付着しやすい箇所を拭き取り、付着物から DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて DNA を抽出し、水産研究・教育機構 水産技術研究所 養殖部門 病理部ら（2024）の手法に従って qPCR を行うことにより、当該箇所における JEECV 遺伝子の有無を調査した。

## 3 結果及び考察

### (1) qPCR を用いた飼育池の飼育水からの原因ウイルス JEECV の定量検出

モニタリングを実施した B 業者の各飼育池における飼育魚の死亡尾数と JEECV 遺伝子量の推移は図 2～6 のとおりであった。また、No. 3 及び 6 池の水温の推移は図 7、各飼育池のアンモニア態窒素量及び亜硝酸態窒素量の推移は図 8 及び 9 のとおりであった。なお、A 業者については、調査期間中いずれの飼育池においても JEECV 遺伝子の陽性反応が見られなかったことから、遺伝子量等の推移についての図は記載していない。

B 業者の No. 3 池については、モニタリング開始当初の 5 月 17 日に死亡尾数が 56 尾/日まで急増したため、当センターで魚病診断を行ったところ、VECNE の発生を確認した。そのため、5 月 18 日は  $3.44 \times 10^6$  copies/mL と高い JEECV 遺伝子量が検出された。その後、 $10^3 \sim 10^4$  copies/mL まで減少したが、10 月初旬まで同程度の遺伝子量が検出された。死亡尾数についても、5 月 18 日以降は数尾～数十尾/日程度まで減少し、9 月頃まで同様の死亡状況が続き、その後、数尾/日に減少した。以上の結果から、VECNE 発生直後は発症魚が大量に死亡し、JEECV 遺伝子量も高かったが、その後死亡数が徐々に減少したにもかかわらず、遺伝子量が  $10^3 \sim 10^4$  copies/mL までしか低下しなかった理由は、軽症で治癒した個体や未発症個体がウイルスキャリアーとなって生存し、長期間 JEECV が飼育水中に排出され続けたためであると考えられた。

No. 4 及び 5 池については、特に VENCE の発生は確認していなかったが、飼育水中の JEECV 遺伝子量  $10^3 \sim 10^4$ copies/mL が検出され、数尾～数十尾/日死亡していたことから、死亡尾数の急増は見られていなかったものの、VECNE は発生していたと考えられた。

No. 6 池については、5 月初旬から中旬まで約 20 尾/日の死亡が確認されたが、5 月下旬は数尾～十数尾/日へ減少した。その後、6 月を除き、8 月下旬まで同様の死亡状況が続き、その後は数尾/日となった。JEECV 遺伝子量については、5 月 11 日から  $10^2 \sim 10^5$ copies/mL が検出され、8 月 29 日に未検出となったが、10 月 10 日に  $1.74 \times 10^5$ copies/mL まで急増した。以上の結果から、当飼育池においても VECNE が発生していたと考えられた。

No. 8 池については、JEECV 遺伝子量は 6 月 15 日から 9 月 14 日まで未検出であったが、10 月 10 日に  $2.63 \times 10^2$ copies/mL が検出され、10 月 21 日に一度未検出となったが、その後 12 月 19 日に  $5.44 \times 10^4$ copies/mL まで急増した。死亡尾数は 7 月初旬から 10 月中旬まで数尾～数十尾/日であったが、11 月 17 日から急増し、12 月 2 日には 170 尾/日が死亡した。その後 12 月 12 日以降は数十尾/日の死亡が続いた。当飼育池では、まず 8 月 22 日に他の養鰻業者から 160kg 分を追加池入れし、その後、11 月 12 日に No. 3 及び 6 池から出荷後の成長の遅い個体群計 1,860kg 分を追加で池入れしていた。さらに、11 月中旬の死亡尾数の急増後、11 月 29 日に死亡魚を用いて魚病診断を実施したところ、VECNE 発生が確認された。このため、VECNE 発生の原因としては、No. 3 池及び No. 6 からの既感染個体の池入れにより JEECV が持ち込まれた可能性が高いと考えられた。ただし、10 月 10 日の時点で既に JEECV 遺伝子が検出されていることから、他養鰻業者から池入れした個体が保有していた可能性も考えられる。本事例から、VECNE の発症歴がある飼育群と発症歴がない飼育群を同一の飼育池に池入れすることは、本疾病発生のリスクが高いと考えられた。また、今回は死亡尾数急増の直前における飼育水中の JEECV 遺伝子量をモニタリングすることができなかったが、1 週間に 1 回程度のモニタリングを行えば、死亡尾数の増加前に JEECV 遺伝子量が増加する傾向を捉えることができると考えられた。

水温については、JEECV 遺伝子量の推移と比較すると、 $32 \sim 34^\circ\text{C}$ の比較的高水温となる 8～9 月に JEECV 遺伝子が検出されなかった日があったことから、高水温によりウイルス活性が低下し、既感染群から飼育水へ排出される JEECV が減少したと考えられた。この結果は既報にも合致している (Umeda et al., 2024)。

アンモニア態窒素量については、No. 6 池において 6 月 1 日から 29 日までに  $0.66 \sim 0.89$ mg/L が検出されたが、その他の飼育池においては、概ね  $0.10 \sim 0.50$ mg/L の範囲で増減を繰り返す傾向が見られた。また、亜硝酸態窒素量については、 $50 \sim 200 \mu\text{g/L}$  の範囲で増減を繰り返し、期間中を通じて緩やかに減少する傾向が見られた。JEECV 遺伝子量の推移と比較すると、特に関連性は見られず、これらの水質条件を早期検知の指標とすることは難しいと考えられた。

## (2) 分養による感染拡大リスクの解明を目的とした感染試験

計 2 回の感染試験の結果は以下の通りである。

### ① 第 1 回試験 (2024 年 9 月 11 日～25 日)

試験期間中、試験区及び対照区のいずれも VECNE による死亡魚は発生しなかった。また、飼育水中の JEECV 遺伝子も試験期間中を通じて検出されなかった。試験終了後に供試魚を全て取

り上げ、体表や鰓、内蔵の症状を目視で確認したが、いずれの個体にも VECNE に見られる鰓蓋や鰓の発赤、鰓弁中心洞のうっ血、腹腔内の出血などの症状は見られなかった。また、鰓組織の一部を qPCR に供したところ、試験区の既感染群 10 尾のうち 4 尾から  $1.90 \times 10^0 \sim 1.09 \times 10^2$  copies/ng の JEECV 遺伝子が検出された。

## ②第 2 回試験 (2025 年 1 月 15 日～2 月 12 日)

試験期間中、試験区及び対照区のいずれも VECNE による死亡魚は発生しなかった。また、飼育水中の JEECV 遺伝子も試験期間中を通じて検出されなかった。供試魚の症状については、第 1 回試験と同様であった。また、鰓組織の一部を qPCR に供したところ、試験区の既感染群 10 尾のうち 2 尾から  $1.78 \times 10^1 \sim 1.65 \times 10^2$  copies/ng の JEECV 遺伝子が検出された。

計 2 回の感染試験を実施したが、いずれの試験についても既感染群から未感染群へのウイルス感染及び発症は確認されなかった。既報では既感染群から未感染群への水平感染が成立しており (Umeda et al., 2024)、今回の試験で感染が成立しなかった原因の 1 つとしては、既感染群の感染力の低下が考えられた。今回の試験における既感染群については、B 業者の VECNE 発生が見られた飼育池 (No. 3 池) の個体を供試した。5 月 17 日に VECNE の発症を確認後、6 月 14 日に当センターへ搬入したが、感染試験実施の 9 月及び 2025 年 1 月まで 3～7 ヶ月程度経過しており、その間に保有しているウイルス量が減少し、試験開始時点では他の個体への感染力が低下していたと考えられた。実際に、試験終了時点での既感染群の JEECV 遺伝子検出率は 20～40%であり、JEECV 遺伝子量も  $10^0 \sim 10^2$  copies/ng と低レベルであった。

また、試験期間中に給餌していた浮餌を十分に摂餌していなかったことも考えられた。JEECV に感染したウナギは増殖したウイルスによって鰓組織に障害を受けている状態であり、給餌によって酸素要求量が増えると鰓呼吸の負担が大きくなり、へい死するリスクが高まることが報告されている。今回の試験においては、既感染群及び未感染群ともに県内養鰻業者から購入した養殖ウナギを供試したが、いずれも練り餌の給餌を行っていた個体であり、当センターへ搬入後に予備水槽で浮餌への馴致期間を 2 週間程度設けていたものの、試験水槽内には残餌が発生している様子が散見された。また、予備水槽から試験水槽への移動の際のハンドリングによってストレスを受け、摂餌行動を行わなくなった可能性も考えられた。以上から、前述のとおり既感染群は JEECV を保有していたものの、積極的な摂餌が行われなかったため、鰓組織中で JEECV が増殖せず、未感染群への感染が成立しなかったものと考えられた。

このため、同居感染試験を実施する際は、既感染群の感染力を保つために、VECNE 発生後すぐの個体を供試魚として用いる、あるいはウイルス液の腹腔内注射で確実に感染させることが必要になると考えられた。また、供試魚の浮餌への馴致期間の長期化や、試験水槽への移動の際のハンドリング低減も効果的であると考えられた。

## (3) 養殖場内における JEECV 汚染状況の解明

拭き取り検査を実施した箇所及び当該箇所における JEECV 遺伝子の検出状況は表 1 のとおりで

ある。B 業者においては、VECNE が発生した No. 8 池の死魚回収用のタモ網やバケツ、飼育池内側の壁面の他、飼育棟及び作業棟の入口の取手からも検出された。また、C 業者においては、VECNE が発生した飼育池の死魚回収用のタモ網やウェダーの靴底から検出された。

以上の結果から、VECNE が発生した養殖場においては、本病が発生した飼育池で使用した器具類を複数の飼育池で使い回すことにより、未発病の飼育池へ JEECV が侵入し、感染拡大を引き起こすリスクがあると考えられた。また、飼育池の壁面からも JEECV 遺伝子が検出されたことから、曝気用水車から発生した飛沫により隣接する飼育池へ JEECV が拡散する可能性も考えられた。このため、VECNE が発生した場合は、タモ網やウェダーなどの器具類を他の飼育池と共有しない、使用後の器具類は必ず消毒剤の噴霧や消毒液への浸漬、天日干しなどの消毒作業を行う、他の飼育池への飛沫の拡散防止を目的とした水車の配置方向の変更やカーテンの設置などの対策が必要になると考えられた。なお、使用する消毒剤については、50%以上のエタノール、あるいは 20 ppm 以上の塩素を用いて 1 分間処理することで実験的に JEECV を不活化できており、(Umeda et al., 2024)、これらの消毒剤を用いることが効果的であると考えられた。また、今回の試験でモニタリング期間中を通じて JEECV 遺伝子が全く検出されなかった A 業者については、過去 3 年は VECNE が多発していたが、これらの感染対策を徹底したことで 2024 年は本疾病が発生しなかった。

#### 【謝辞】

本研究の実施にあたり、多大な情報や助言をいただきました、国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産技術研究所 病理部の梅田剛佑研究員に深く御礼申し上げます。

#### 【引用文献】

- 小川和夫・佐野元彦・横山博・倉田修（監修）：ウイルス性血管内皮壊死症（鰓うっ血症）.新魚病図鑑第 3 版, 緑書房, 2022, 78.
- 田中眞・佐藤孝幸・馬文君・小野信一（2008）ウイルス性血管内皮壊死症に対する昇温処理および無給餌の効果. 魚病研究, 43(2), 79-82.
- 水産研究・教育機構 水産技術研究所 養殖部門 病理部・静岡県水産・海洋技術研究所（2024）農林水産省戦略的プロジェクト研究推進事業「国内主要養殖魚の重要疾病のリスク管理技術の開発」成果普及資料, ウナギのウイルス性血管内皮壊死症診断・防除マニュアル
- 石川孝典・西村友宏・野中信吾・森 竜也・小原明香・小堀功男・久保田仁志・和田新平・佐野元彦（2021）：安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業「アユの異型細胞性鰓病の発病原因の解明と防除法の開発」－天然水域における PaPV 動態調査 2－. 栃木県水産試験場研究報告, 65, 9-10.
- Y. Kawato, Y. Takada, K. Mizuno, S. Harakawa, Y. Yoshihara, Y. Nakagawa, T. Kurobe, H. Kawakami, T. Ito (2023) Assessing the transmission risk of red sea bream iridovirus (RSIV) in environmental water: insights from fish farms and experimental settings. Microbiology Spectrum, 11, 5.

K. Umeda, T. Takano, S. Okazaki-Terashima, Y. Matsuura, Y. Kawato, T. Matsuyama (2024)  
Experimental Waterborne Infection of Japanese Eel Endothelial Cells-Infecting Virus  
(JEECV) and the Effects of Water Temperature on Infection. Fish Pathology, 59 (1), 17-24

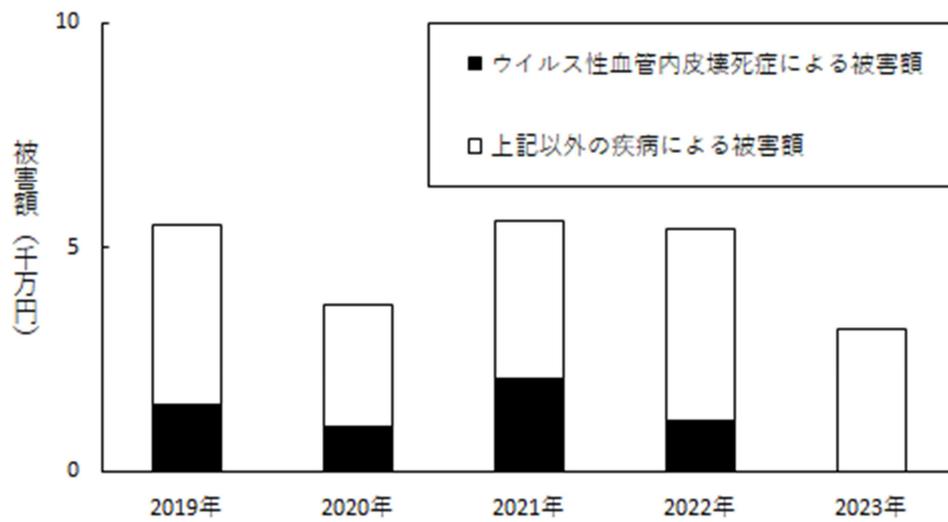


図1 平成31年（令和元年）から令和5年の県内養鰻業における魚病による被害金額とウイルス性血管内皮壊死症による被害額

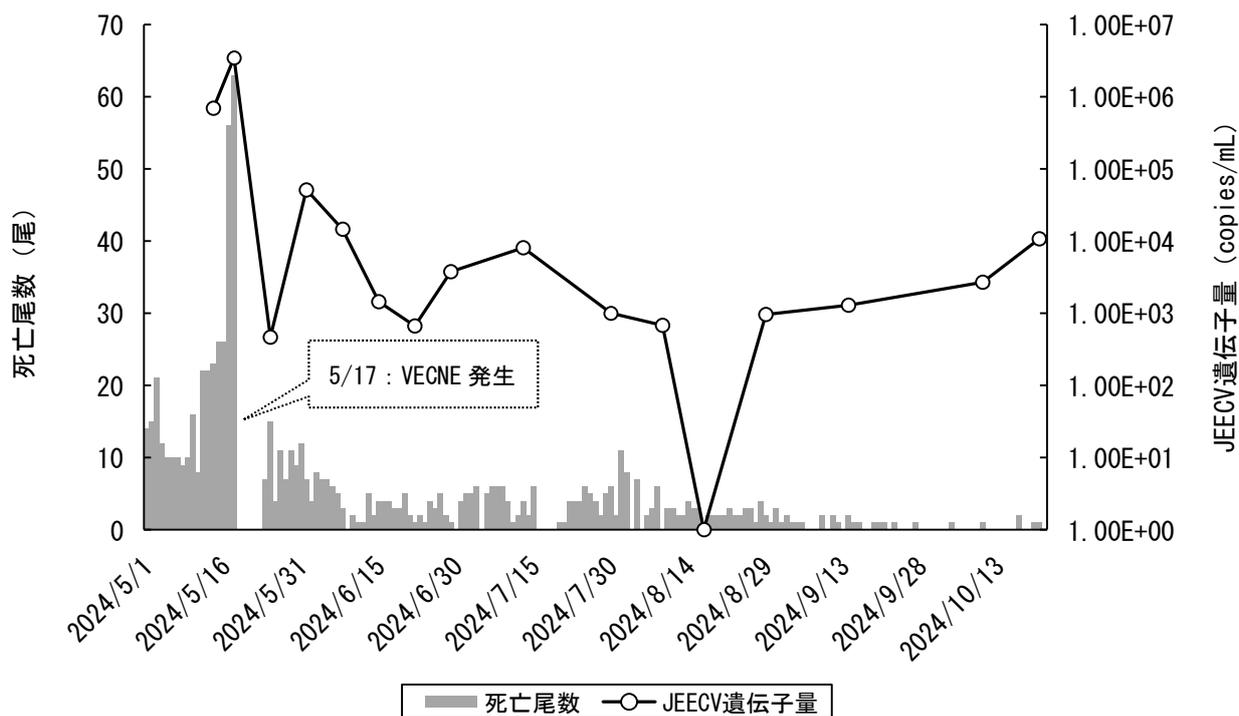


図2 B業者のNo.3池における死亡尾数と飼育水中のJEECV遺伝子量の推移

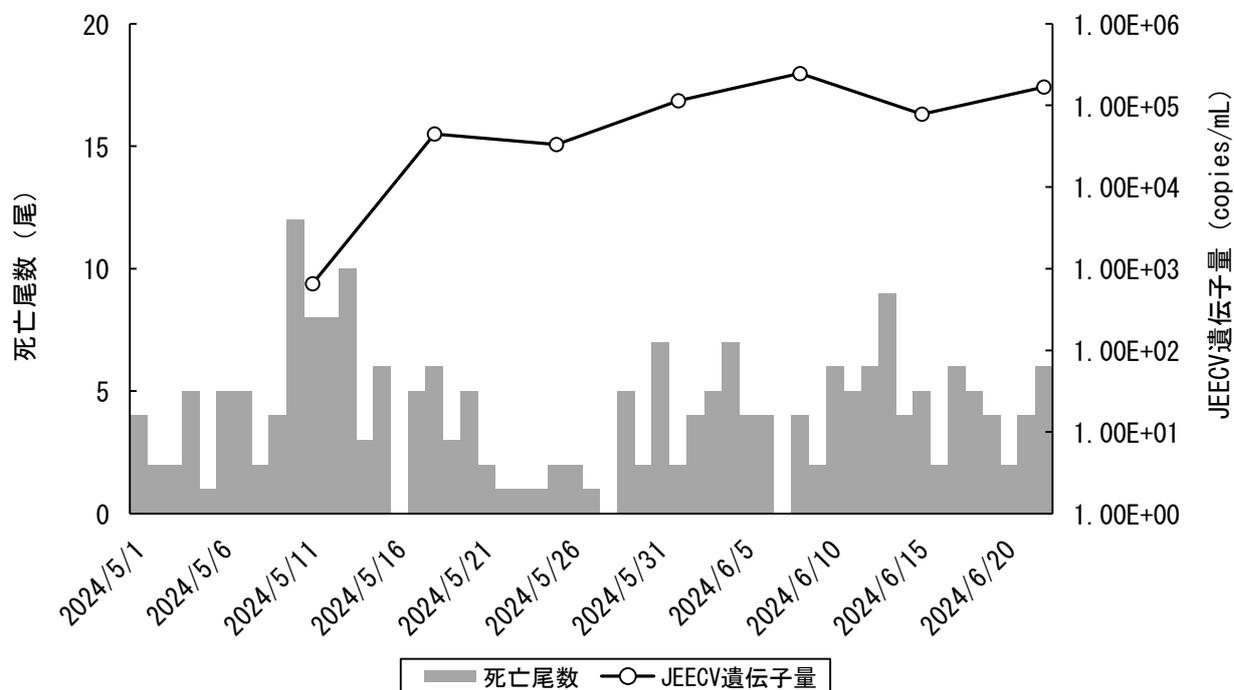


図3 B業者のNo.4池における死亡尾数と飼育水中のJEECV遺伝子量の推移

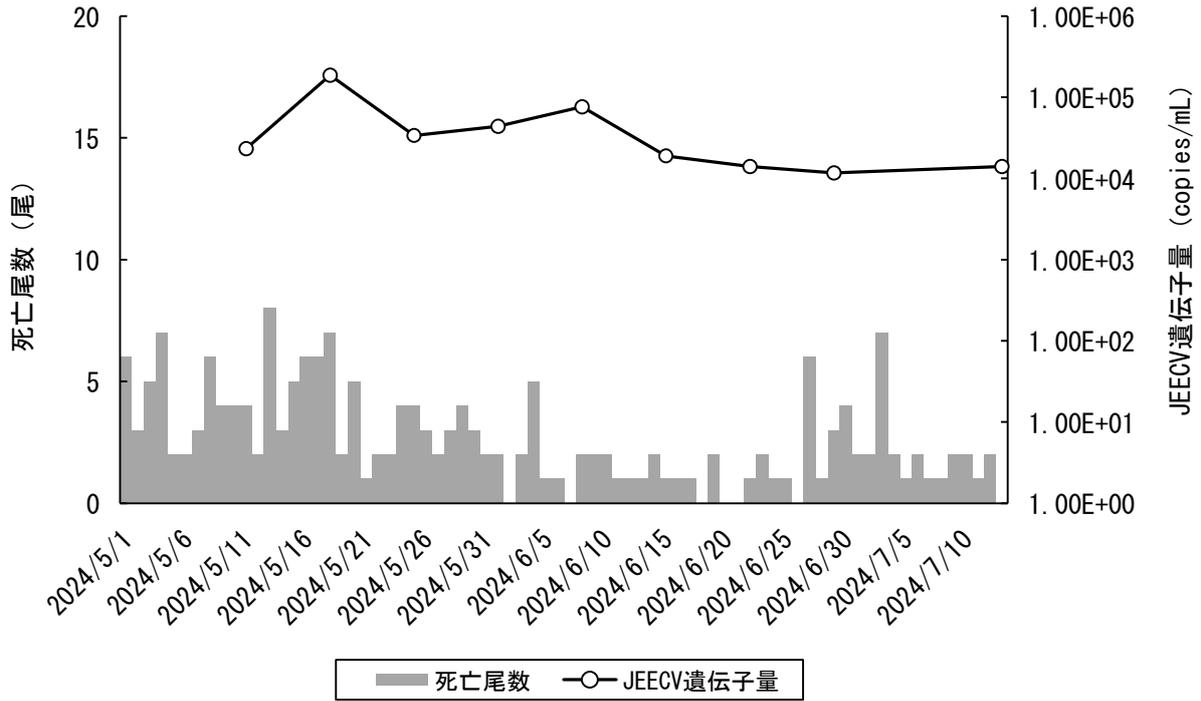


図4 B業者のNo.5池における死亡尾数と飼育水中のJEECV遺伝子量の推移

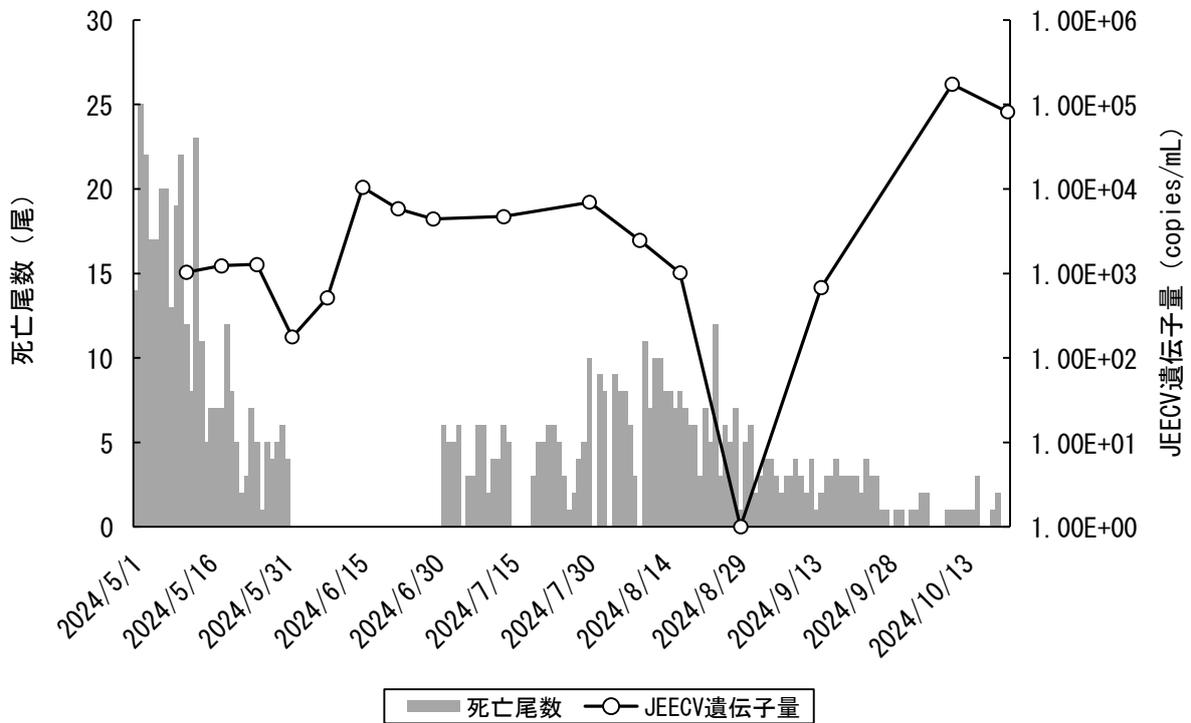


図5 B業者のNo.6池における死亡尾数と飼育水中のJEECV遺伝子量の推移

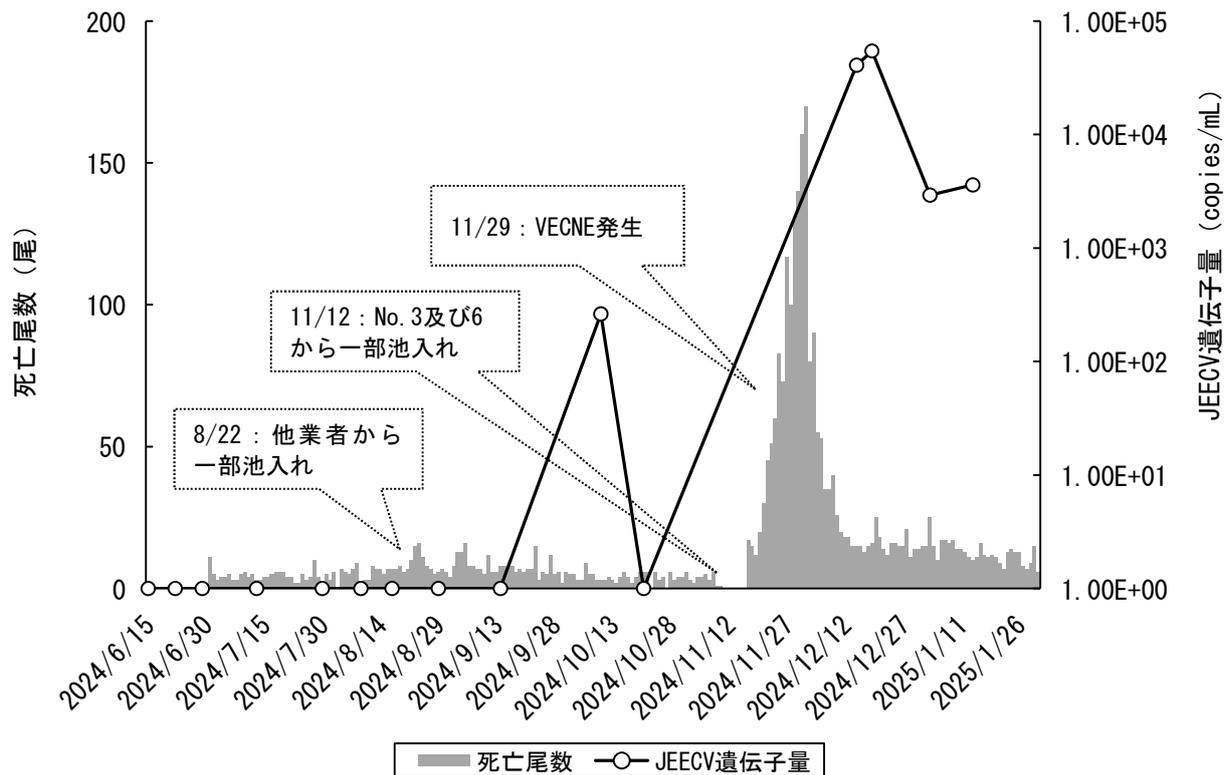


図6 B業者のNo. 8池における死亡尾数と飼育水中のJEECV遺伝子量の推移

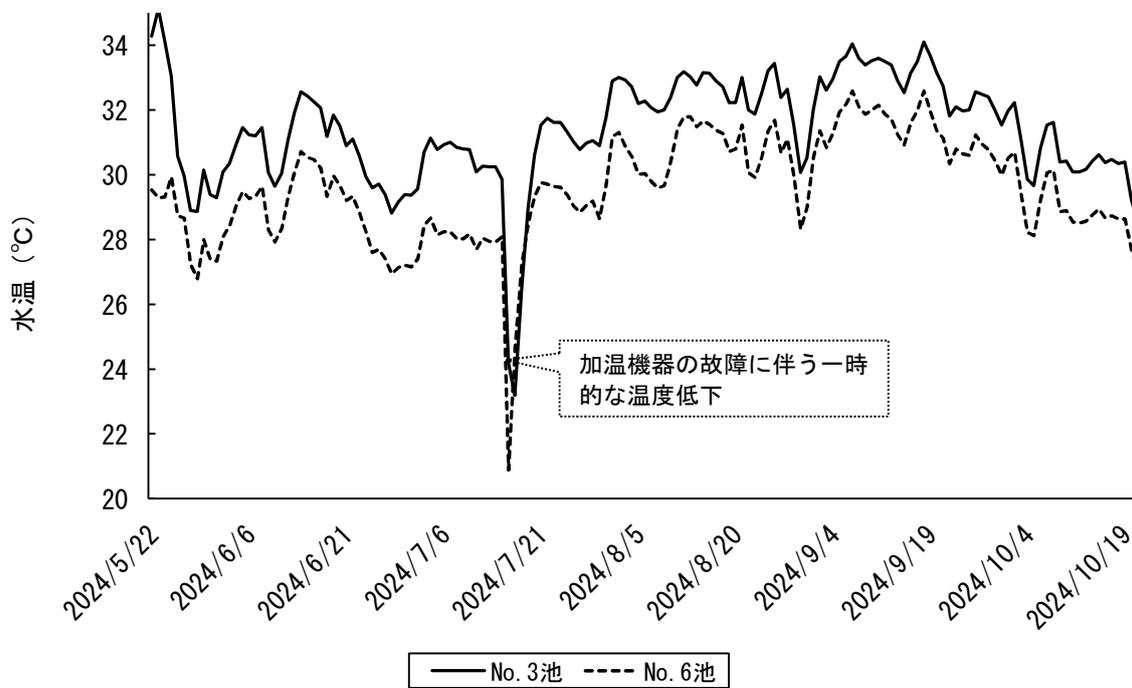


図7 B業者のNo. 3及び6池における水温の推移

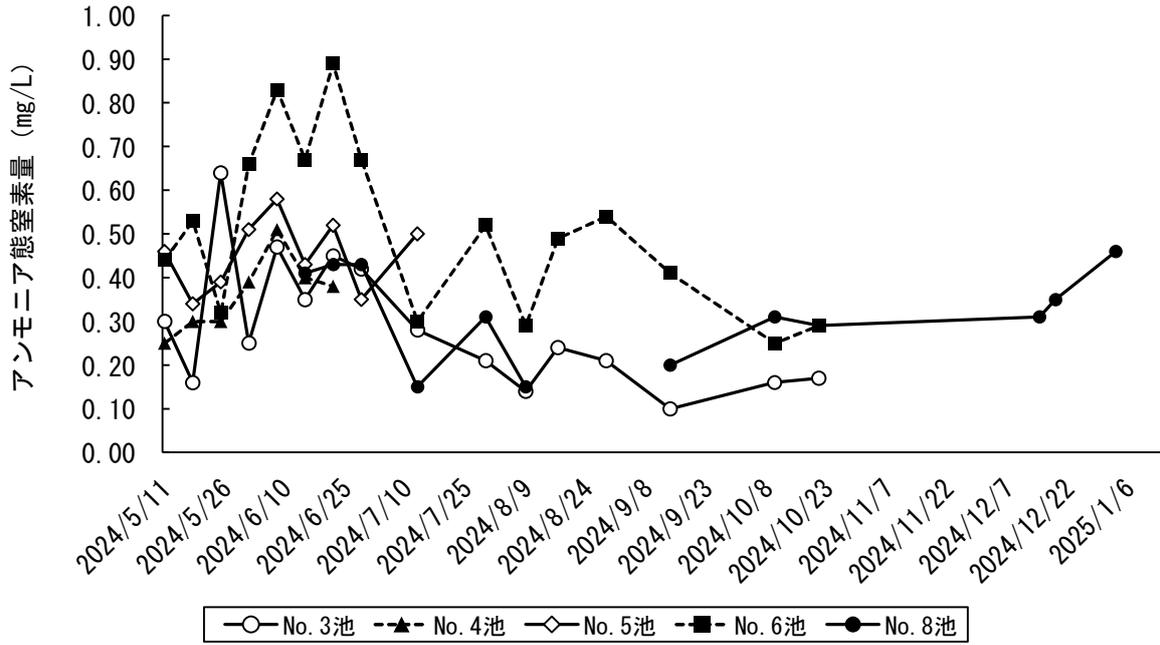


図8 B業者のモニタリング対象池における飼育水中のアンモニア態窒素量推移

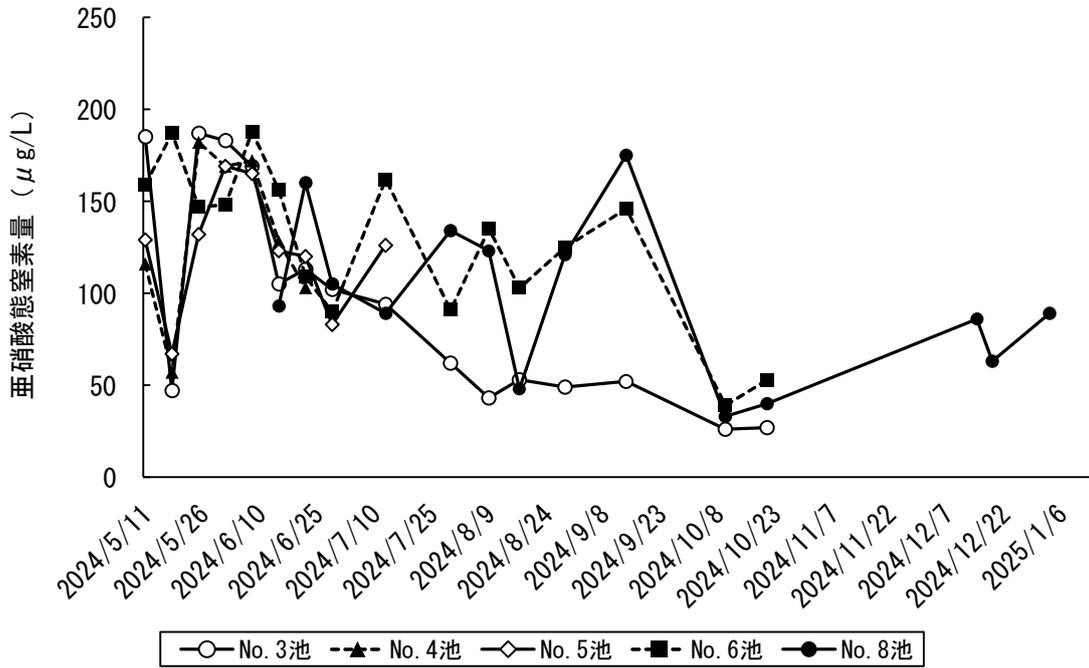


図9 B業者のモニタリング対象池における飼育水中の亜硝酸態窒素量推移

表1 拭き取り検査における JEECV 遺伝子の検出状況

業者名	採取日	拭き取り箇所	qPCR結果 (陽性：+、陰性：-)
B業者	2024/6/27	No. 3池タモ網持ち手	-
B業者	2024/6/27	No. 3池水車付近壁面	-
B業者	2024/6/27	No. 5池タモ網持ち手	-
B業者	2024/6/27	No. 5池水車付近壁面	-
B業者	2024/6/27	No. 6池タモ網持ち手	-
B業者	2024/6/27	No. 6池水車付近壁面	-
B業者	2024/6/27	飼育棟入口取手（内側）	-
B業者	2024/6/27	飼育棟入口取手（外側）	+
B業者	2024/6/27	冷凍庫取手	-
B業者	2024/6/27	作業棟入口取手（外側）	-
B業者	2024/10/1	No. 3池タモ網持ち手	-
B業者	2024/10/1	No. 3池水車付近壁面	-
B業者	2024/10/1	No. 6池タモ網持ち手	-
B業者	2024/10/1	No. 6池水車付近壁面	-
B業者	2024/10/1	No. 8池タモ網持ち手	-
B業者	2024/10/1	No. 8池水車付近壁面	-
B業者	2024/10/1	飼育棟入口取手（内側）	-
B業者	2024/10/1	飼育棟入口取手（外側）	-
B業者	2024/11/29	No. 8池タモ網持ち手	-
B業者	2024/11/29	No. 8池タモ網先端	+
B業者	2024/11/29	No. 8池死魚バケツ	+
B業者	2024/11/29	No. 8池水車付近壁面	+
B業者	2024/11/29	飼育棟入口取手（内側）	-
B業者	2024/11/29	飼育棟入口取手（外側）	-
B業者	2024/11/29	作業棟入口取手（内側）	-
B業者	2024/11/29	作業棟入口取手（外側）	+
C業者	2025/1/14	No. 7池タモ網先端（使用直後）	+
C業者	2025/1/14	ウェダ一靴底（使用后1日経過）	+
C業者	2025/1/14	事務所入口取手	-
C業者	2025/1/14	作業用台車持ち手	-
C業者	2025/1/14	冷凍庫取手	-
C業者	2025/1/14	階段手すり	-