

# PAV診断におけるPCR検査の問題点

濱田 豊市・片山 幸恵・筑紫 康博\*  
(豊前海研究所)

## Problem in PAV Diagnosis by PCR

Toyoichi HAMADA, Sachie KATAYAMA and Yasuhiro CHIUKUSHI\*  
(Buzenkai Laboratory)

クルマエビ類の急性ウイルス血症 (PAV ; *Penaeid acutu viremia*) は、1993年に初めて西日本のクルマエビ養殖場で発生し、死亡率が高く、産業上極めて被害の大きい感染症として報告された<sup>1, 2)</sup>。その発生源は中国産のクルマエビ種苗と推定されている。その後、本疾病は全国的な広がりを見せ、'95年には種苗生産施設や中間育成施設での発生も確認され、その防疫は本県においても大きな課題となっている。本症の診断方法としては、暗視野顕微鏡下で感染核を検出する簡易診断法や電子顕微鏡で本疾病の原因ウイルスであるPRDV (*Penaeid rod shaped DNA virus*) 粒子を確認する方法、及び極微量なDNAでも検出可能なPCR (polymerase chain reaction) 法によってウイルスの遺伝子 (DNA鎖) を検出する方法が用いられている<sup>3)</sup>。中でもPCR法は、検査精度が高く結果に信頼がおけることから、多くの研究機関がこの検査法を導入している。

豊前海研究所でも今年からPCR法を導入し、中間育成中のクルマエビ、ヨシエビを対象にPAV診断を実施した。

その結果、Nested-PCRにおいて陽性 (感染率5%と仮定した場合に95%の信頼性を有す) と判断された育成群が頻繁に出現した。しかし、陽性であった育成群を継続飼育しても、発病することもなく、再検査では陰性になるなど、その判断に苦慮していたところである。

そこで本報では、Nested PCR法において、陽性と診断されたにもかかわらず、その後発病することもなく、再検査の結果陰性に転化する例 (以下、「疑陽性」とい

う。) について、その出現のメカニズムと対策を検討し、若干の知見を得たので報告する。

## I 「疑陽性」出現のメカニズム (配合飼料の検査)

### 材料及び方法

PCR検査には、体液 (血液) や胃の上皮細胞からDNAを抽出し、それを検体とするのが良いされている。しかし、中間育成では、栽培公社から出荷された稚エビ (体長約12mm) を放流サイズの体長30mmまで飼育しており、処理能力の関係から実際には、中間育成エビの頭胸部や胃を摘出し、これらから抽出されたDNAを検査サンプルとして用いざるを得ない。

この検査サンプルの採取法の問題点として、胃の内容物が含まれるという点に着目し、飼育に使用する配合飼料について単独にPCR検査を実施した。

検査対象には、本県の種苗生産施設や中間育成施設で使用している配合飼料と本県では使用していないがエビ類飼育を目的に調整された配合飼料数種を用いた。

配合飼料からのDNAの抽出には、ISOGEN法を用いた。なお、配合飼料は乾燥物であるため抽出前の処理として、超純水を用いて軟らかくしておいた。

また、配合飼料の原材料 (魚粉、イカミール及びエビ殻ミール及びオキアミミール) についても、製造メーカーに分与をお願いし、同様の検査を実施した。このPCR検査は、Cool-Start法 (Takara-Taq使用 ; 以下、C-S法と略す。) 及びHot-Start法 (Amplitaq Gold使用 ; 以下、H-S法と略す。) の二つの方法で行い、前者の場合は、Nested PCRで判定を行った。

\* 現筑前海研究所

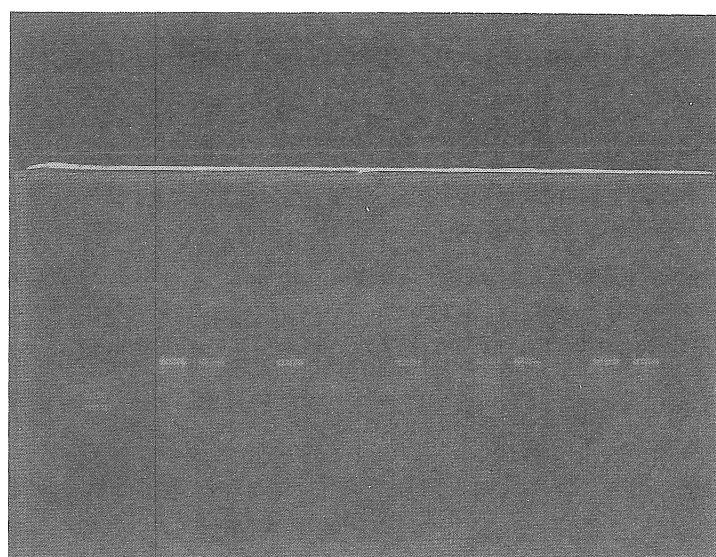
結 果

検査結果を表1にまとめて示した。例として、電気泳動結果(H-S法)を図1に示した。

表1 配合飼料及びその原料のPCR検査結果 (H-S法, C-S法)

サンプル	区分	方法 段階 プライマー	Cool-Start		Hot-Start
			1st	ネステッド	1st
			1-2	3-4	3-4
ネガティブコントロール			-	-	-
配合飼料1	A社		+	+	+
配合飼料2	A社		-	+	+
配合飼料3	B社		-	-	-
配合飼料4	C社		-	+	+
配合飼料5	D社		-	+	+
配合飼料6	E社		-	-	-
配合飼料7	F社		-	+	+
原料1 魚粉	F社		-	-	-
原料2 イカミール	F社		-	-	-
原料3 エビ殻ミール	F社		+	+	+
原料4 オキアミミール	F社		-	-	-
配合飼料7'	F社		-	+	+
ポジティブコントロール			+	+	+
ネガティブコントロール			-	-	-

- 1 ; ネガティブコントロール
- 2 ; 配合飼料1 A社
- 3 ; 配合飼料2 //
- 4 ; 配合飼料3 B社
- 5 ; 配合飼料4 C社
- 6 ; 配合飼料5 D社
- 7 ; 配合飼料6 E社
- 8 ; 配合飼料7 F社
- 9 ; 原料1:フィッシュミール F社
- 10 ; 原料2:イカミール //
- 11 ; 原料3:エビ殻ミール //
- 12 ; 原料4:オキアミミール //
- 13 ; 配合飼料7' //
- 14 ; ポジティブコントロール
- 15 ; ネガティブコントロール
- 16 ; pHY Marker



16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

\*1~8は、配合飼料

\*9~12は、配合飼料原料

\*13は、9~11を原料としてできた配合飼料

検査結果をみると、配合飼料7種類(6社)のうち5種類(4社)において陽性が認められた。また、配合飼料の原料からは、エビ殻ミールのみ陽性がみられた。

考 察

検査結果から、「疑陽性」出現の原因は、配合飼料の原料の一つであるエビ殻ミールにあると推定された。また、配合飼料及びエビ殻ミールのPCR検査で増幅されたDNAについては、広島大学にシーケンス(塩基配列解析)を依頼した結果、PRDVのDNAと同一であることが確認された。この結果は、筑紫らが行った配合飼料のPCR産物のシーケンス結果(未発表)と同じであった。これらのことから、「疑陽性」出現のメカニズムは、エビの頭胸部や胃をサンプルとしたために、PRDVのDNAに汚染されたエビ殻を原料とした配合飼料が胃内容物とともに検出されたためと推定された。

II 「疑陽性」の出現を回避するためのサンプリング法の検討

「疑陽性」出現のメカニズムは、前述したように配合飼料に由来することが判明した。したがって、PCR検査を実施するうえでこの「疑陽性」を回避するためには、

図1 配合飼料及びその原料のPCR検査(電気泳動)結果(H-S法)

胃を含む消化管内容物に左右されない体液（血液等）を用いるか、PRDVのDNAによって汚染されていない配合飼料を使用すればよいと考えられた。しかし、前者の場合は、検査対象物のエビが小さいため、個別別に体液を採取することは困難であり、後者の場合においても、配合飼料は、既製品で成分に手を加えることは不可能に近く、市販のものを使わざるを得ない状況にある。そこで今回は、PRDVのDNAによって汚染された配合飼料を使用した場合において、サンプリングの仕方を変える方法を検討した。

### 材料及び方法

配合飼料に含まれるPRDVのDNAは、消化管を通過するだけのものか、また体内に取り込まれるものを検討するために、豊前海研究所で種苗生産されたヨシエビを用いて、配合飼料を投与した後、経時的に胃及び排泄物についてPCR検査を実施した。飼育は、プラスチック製水槽（48×62×44cm）を用い、ネットでエビと排泄物が分離できる二重底方式で行った。なお、試験開始時の収容尾数は、200尾であった。

胃については、給餌前、給餌直後（0時間後）、3、6、12、20、32及び44時間後に摘出し、内容物を含んだまま冷凍保存した。また、排泄物については、残餌回収後1、3、6、12、20、32及び44時間目に水槽の底に溜まったものをネットで回収し、遠心分離器で余分な水分を除き冷凍保存した。排泄物を経過時間毎に限定するために、回収後はその都度水槽の清掃とエビの移し替えを行った。検査供試エビには、表2に示したように平均全

表2 供試エビ一覧表

サンプリング	日時	サンプル尾数	体 長 (mm)			
			平均	最大	最小	
10月18日	9:00	12	33.2±5.5mm	43	26	
	13:10	12	27.2±4.9mm	37	20	
	14:10	12	32.4±4.6mm	43	24	
	16:10	12	33.3±5.9mm	43	22	
	19:10	10	32.9±4.7mm	38	24	
10月19日	1:10	12	33.5±5.0mm	40	21	
	9:10	12	34.6±5.8mm	40	23	
10月20日	21:10	12	32.8±5.2mm	41	22	
	9:10	12	33.1±5.9mm	42	21	
			106	32.5±5.5mm	43	20

試験水温；21.0～21.1℃

摂餌可能時間；4時間10分

長32.5mm（20～43mm）のものを用いた。また、給餌において供試エビが摂餌できた時間は、4時間10分で、試験期間中の水温は、21.0～21.1℃であった。

冷凍保存標本からのDNA抽出は、ISOGEN法で行った。なお、胃のPCR検査においては、採集時毎にまとめて処理した。

PCR検査は、前述のC-S法及びH-S法で行った。

### 結 果

胃及び排泄物のPCR検査結果を表3に示した。

表3 胃及び排泄物のPCR検査結果（H-S法，C-S法）

サンプル	区 分	方法			
		方法 段 階 プライマー	Cool-Start		Hot-Start
			1st 1-2	ネステッド 3-4	1st 3-4
ヨシエビ（胃）	給餌前		-	-	-
	給餌後	0時間	-	-	+
	1時間	-	+	+	
	3時間	-	-	-	
	6時間	-	+	+	
	12時間	-	-	-	
	20時間	-	-	-	
	32時間	-	-	-	
ヨシエビ（排泄物）	給餌後	0～1時間	-	+	+
	1～3時間	-	+	+	
	3～6時間	-	-	+	
	6～12時間	-	+	+	
	12～20時間	-	-	-	
	20～32時間	-	-	-	
	32～44時間	-	-	-	

胃を検査対象とした場合、対照と考えられる給餌前は、C-S法、H-S法いずれの検査においても陰性であった。摂餌後の陽性出現状況を見ると、C-S法（Nested）では給時後1時間及び6時間後に確認されたが、H-S法では給時直後から3時間後を除く6時間後まで陽性が確認された。

一方、排泄物の場合は、C-S法では、3～6時間分を除き給時後1時間に排泄されたものから6～12時間後まで陽性が確認された。一方、H-S法では6～12時間後分まで継続して陽性が認められた。しかし、12時間以降では、何れの検査法によっても陽性はみられなかった。

## 考 察

胃の検査において、3時間後に両検査法とも陽性が確認されなかった理由は不明であるが、少なくとも6時間後までは胃に配合飼料が滞留すると考えられた。また、排泄物の検査結果では、6～12時間後まで陽性が確認されるが、その後はみられないことから、PCR診断の供試エビには、少なくとも12時間以上無給餌で飼育したものを使用すれば、「疑陽性」の出現は回避されたと考えられた。今回の試験には、平均体長が32.5mmと放流サイズよりやや大きいヨシエビを使用した。実際の中間育成池での標本（検体）採集においては、餌料の排泄時間を考慮した方法が肝要と考えた。また、今回の試験では、体内への取り込みは認められなかったが、これは追跡時間が短過ぎたとも考えられるため、本件については再試験の必要があると考える。

## Ⅲ エビ類中間育成現場におけるPCR検査

## 材料及び方法

豊前海区では、クルマエビを蓑島及び吉富の2箇所それぞれ2回、ヨシエビを柄杓田、蓑島及び吉富の3カ所で1回の中間育成が行われている。今年から、豊前海研究所は、1回の中間育成について、育成中と放流前の最低2回のPCR検査を実施している。そこで、このPCR検査結果の推移と飼育状況の目安になる歩留りを整理した。なお、PCR検査にあたっては、必用標本数を統計的に考慮し、60個体（95%の信頼率を有する<sup>4)</sup>）とした。

検体採集は、1回目のクルマエビについては、消化時間等を考慮することなしに実施したが、2回目は、配合飼料の滞留を考慮して配合飼料給餌前の早朝に実施した。また、ヨシエビについては、配合飼料の消化管内滞留時間を検討するために前回投餌時間と検体採集時間を記録として残した。

## 結 果

中間育成におけるPCR検査結果と放流時の歩留まりについて整理したものを表4-1～3に示した。

クルマエビについては、消化時間を考慮しなかった1回目の中間育成において（表4-1）吉富分4水槽中の2水槽（NO.2, 4）で6月23日（中間育成開始27日目）に初めてNested-PCR陽性が確認された。しかし、翌

表4-1 クルマエビ中間育成（1R）におけるPCR検査結果と歩留り

蓑 島	検査月日	調査部位	水 槽			備 考
			No.1	No.2	No.3	
(中間育成) 5月26日 (15mm)	6月11日	頭胸部	—*1 22.9*2	— 25.4	— 25.4	
	6月23日	頭胸部	— 33.2	— 32.2	— 33.6	
	6月24日	頭胸部	—	—	—	
	6月26日	胃全体	—	—	—	
	7月2日	胃全体	— 36.3	— 37.6	— 37.7	
放 流 7月3日	40日間*3	放流時 歩留り	— 41.4	38.8*4 41.4	48.0 41.4	

吉 富	検査月日	調査部位	水 槽				備 考
			No.1	No.2	No.3	No.4	
(中間育成) 5月27日 (No.1,2; 14mm)	6月9日	頭胸部	— 20.9	— 21.9	— 20.3	— 21.4	
	6月23日	頭胸部	— 26.6	— 28.8	— 24.9	— 22.9	
	6月24日	頭胸部	—	—	—	—	
	6月26日	胃全体	+	+	— 32.2	—	
放 流 6月27日	31日間	放流時 歩留り	84.0 30.1	85.7 30.1	81.5 30.1	87.3 30.1	

\*1；PCR検査結果（Cool-Start法；Nested-PCR）

\*2；平均体長；mm \*3；中間育成日数；日

\*4；放流時歩留り；%

表4-2 クルマエビ中間育成（2R）におけるPCR検査結果と歩留り

蓑 島	検査月日	調査部位	水 槽			備 考
			No.1	No.2	No.3	
(中間育成) 7月28日 (15mm)	8月8日	胃全体	—*1	—	—	給餌前採集
	8月18日	胃全体	—	—	—	〃
放 流 8月21日	24日間*2	放流時 歩留り	65.5*3 30.9*4	67.3 30.9	68.3 30.9	

吉 富	検査月日	調査部位	水 槽				備 考
			No.1	No.2	No.3	No.4	
(中間育成) 8月4日 (15mm)	6月9日	胃全体	—	—	—	—	給餌前採集
	8月26日	胃全体	—	—	—	—	〃
放 流 8月30日	26日間	放流時 歩留り	46.0 32.0	60.7 32.0	54.1 32.0	56.8 32.0	

\*1；PCR検査結果（Cool-Start法；Nested-PCR）

\*2；中間育成日数；日 \*3；放流時歩留り；%

\*4；平均体長；mm

日のサンプリングでは、両水槽ともに陰性であった。更に、放流前の検査においては、2水槽（NO.1, 2）でNested-PCR陽性が確認されたが、これは6月23日に

表4-3 ヨシエビ中間育成におけるPCR検査結果歩留り

柄杓田	検査月日	調査部位	水 槽		備 考
			No.1	No.2	
(中間育成) 8月25日 (12mm)	9月8日	胃全体	— <sup>*1</sup> 23.7 <sup>*3</sup>	— 22.9	約13時間後 <sup>*2</sup>
	9月24日	胃全体	+	— 29.7	約4時間後
放 流 9月29日	35日間 <sup>*5</sup>	放流時 歩留り	87.4 <sup>*4</sup> 33.5	80.3 33.5	

蓑 島	検査月日	調査部位	水 槽			備 考
			No.1	No.2	No.3	
(中間育成) 8月25日 (12mm)	9月9日	胃全体	— 21.0	— 18.7	— 20.0	約10時間後
	8月2日	胃全体	+	+	— 32.5	約7時間後
放 流 9月27日	33日間	放流時 歩留り	84.4 33.0	85.4 33.0	85.4 33.0	

吉 富	検査月日	調査部位	水 槽				備 考
			No.1	No.2	No.3	No.4	
(中間育成) 9月1日 (16mm)	9月18日	胃全体	+	—	—	—	約10時 間後
	9月28日	胃全体	— 31.7	— 28.7	— 28.7	— 30.1	約12時 間後
放 流 10月1日	30日間	放流時 歩留り	84.0 30.1	85.7 30.1	81.5 30.1	87.3 30.1	

\*1; PCR検査結果 (Cool-Start法; Nested-PCR)  
 \*2; 前回給餌から標本採集までの経過時間  
 \*3; 平均体長; mm \*4; 放流時歩留り; %  
 \*5; 中間育成日数; 日

陽性がみられた水槽 (NO. 2) と初めて確認された水槽 (NO. 1) であった。また、一度Nested-PCR陽性が確認された水槽 (NO. 4) は、今回も陰性であった。一方、歩留りについては、陽性が確認された水槽において異常斃死が見られることもなく、31日間飼育で4水槽とも歩留り80%以上と大差なく、PCR陽性が全く確認されなかった蓑島よりむしろ良い結果となった。2回目のクルマエビ中間育成 (表4-2) においては、2箇所の7水槽ともPCR陽性はみられず、歩留りは概ね50%以上であった。

ヨシエビの場合 (表4-3) は、全ての中間育成場でNested-PCR陽性が確認された。しかし、吉富の場合、中間 (9/18) 検査で陽性が確認された水槽 (NO. 1) において、10日後の放流前 (9/28) 検査では、陰性に転化していた。

柄杓田、蓑島の場合は、放流前の検査において柄杓田2水槽中1水槽 (50%)、蓑島3水槽中2水槽 (67%) で陽性が確認された。歩留りについては、3箇所の水槽全

てが80%以上と非常に良好であった。

## 考 察

中間育成時におけるPCR検査結果と歩留りをみると、検査時によってNested-PCRで異なる結果が出るばかりか、育成中にPAVも発生せず、放流時の歩留りも良好であった。これらの飼育事例から、配合飼料が「疑陽性」の原因になっても、PAVの原因になることはないと考えられた。これは、配合飼料ができ上がるまでに幾度となく加熱処理を加えられるため、PRDVが不活化されたと推察される。

検体採集時間についてみると、クルマエビでは、早朝給餌前 (前回給餌から概ね13時間後) に採集したものは、全てNested-PCRにおいても陰性であった。また、ヨシエビでは、Nested-PCR陽性が確認されたのは、給餌後10時間までで、13時間後では確認されなかった。これらのことから、前述したように給餌後12時間以上経過したものを検体として用いることは「疑陽性」の出現を防ぐ対策として有効であると考えられた。

## 総 合 考 察

本報告では、PAV診断のためのPCR検査で、「疑陽性」出現の原因は配合飼料の原料であるエビ殻ミールにあることを明らかにした。餌料メーカーからの聞き取りによると、このエビ殻ミールは、台湾南部に生息する”通称; ケンエビ”の殻で、干しムキエビ (食用) 製造時の副産物とのことである。詳細は不明であるが、本種がPRDVの宿主である可能性も十分考えられる。

直面する問題は、配合飼料からPRDVのDNAが確認され、PRDVの存在が示唆されたことであり、これが病原性を有するか否かである。今回は、飼育事例から発病の有無を検討したが、今後は配合飼料が活性を有したPRDVを有しているか否かを更に検討する必要があると考える。

## 要 約

- 1) 「疑陽性」出現の原因は、PRDVのDNAに汚染されたエビ殻を原料とした配合飼料によることが判明した。
- 2) 市販の配合飼料を使用せざるを得ない状況下での「疑陽性」は、検査対象エビの消化時間等を考慮したサンプリングで回避できると考えられた。

育成現場においては、12時間以上餌止めした状態のエビを検査対象とすればよいと考えられた。

3) 飼育事例からは、配合飼料がPAVの直接原因になることはないと考えられた。

### 謝 辞

本試験を実施するうえで、資料の分与等に協力を頂いた各餌料メーカーの担当者に感謝の意を表します。また、PCR産物のシーケンスを快く引き受けて下さった広島大学生物生産学部中井敏博先生に深く感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) 中野平二ら；1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死：発生状況及び感染実験.魚病研究, 29, 135-139 (1994)
- 2) 桃山和夫ら；1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死：病理組織観察.魚病研究, 29, 141-148 (1994)
- 3) 木村武士ら；PCR法におけるPRDVの検出.魚病研究, 31, 93-98 (1996)
- 4) 社団法人 日本水産資源保護協会：魚類病原体の検出法ならびに同定法（第3版）：アメリカ水産学会 魚類保険部会.魚類防疫技術書シリーズ, 4 (1987)