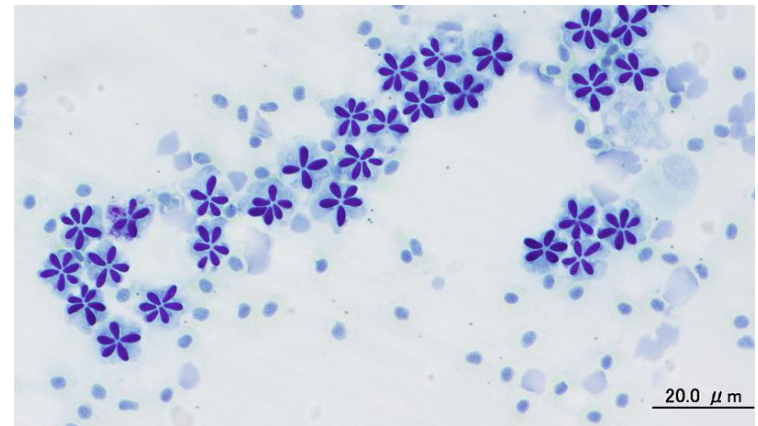


ヒラメ養殖業における *Kudoa* 対策



国立研究開発法人 水産総合研究センター
増養殖研究所 病害防除部
森 広一郎

発表内容

- ヒラメの養殖業について
- ヒラメ生産現場での *Kudoa* 対策
- 生産現場における防除対策に関する研究開発成果（レギュラトリーサイエンス新技術開発事業）

全国のヒラメ養殖生産量

県名	生産量 (トン)
大分	734
鹿児島	654
愛媛	537
三重	354
長崎	182
宮崎	173
その他(16県)	491
合計	3,125

全国のヒラメ養殖種苗販売数

県名	生産尾数（千尾）
愛媛	2,354
長崎	2,011
山口	1,436
香川	648
その他（20県）	6,354
合計	12,803

全国のヒラメ生産量

生産量(トン)

14000

12000

10000

8000

6000

4000

2000

0

■ 漁獲量

■ 養殖生産量

H14

15

16

17

18

19

20

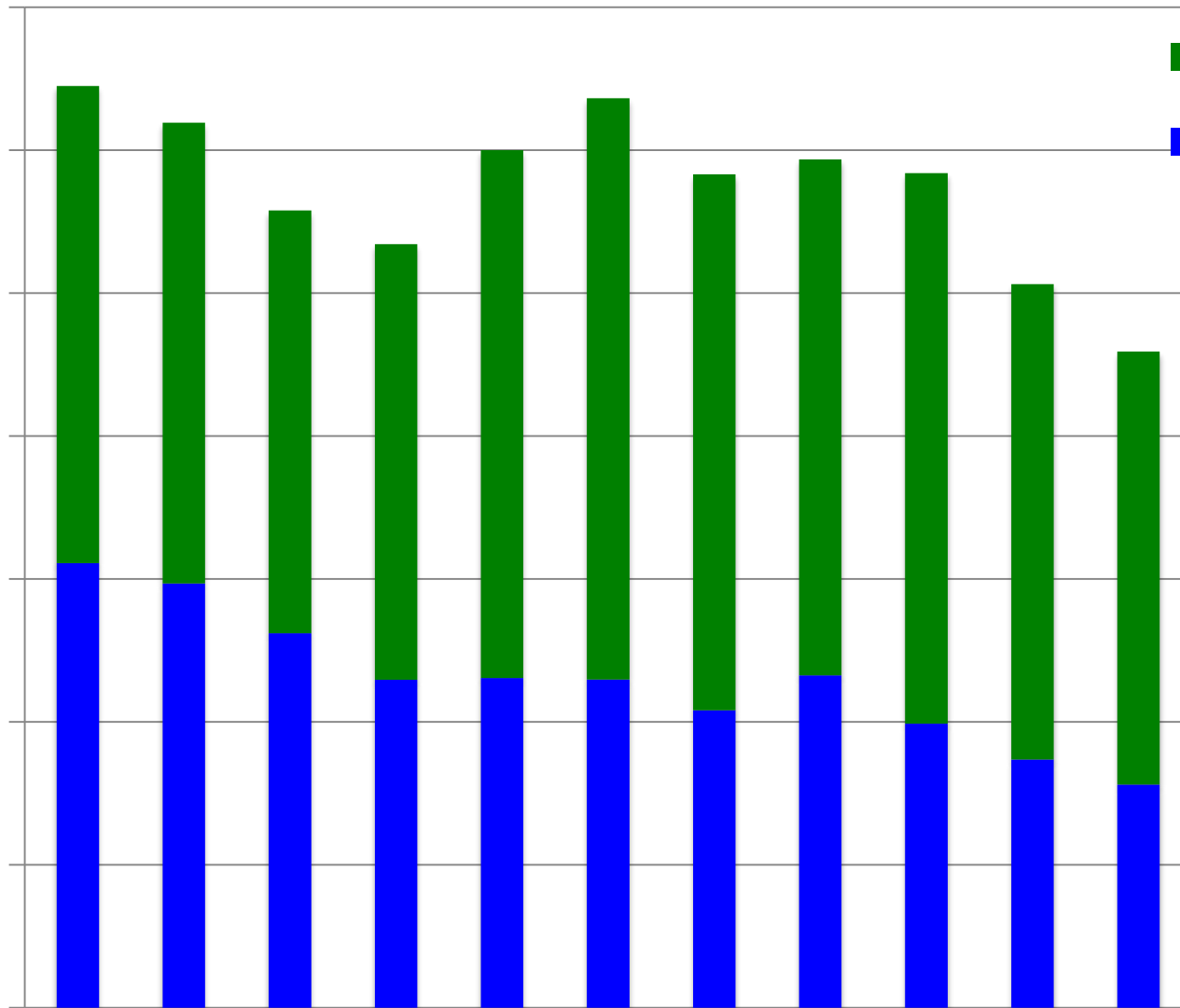
21

22

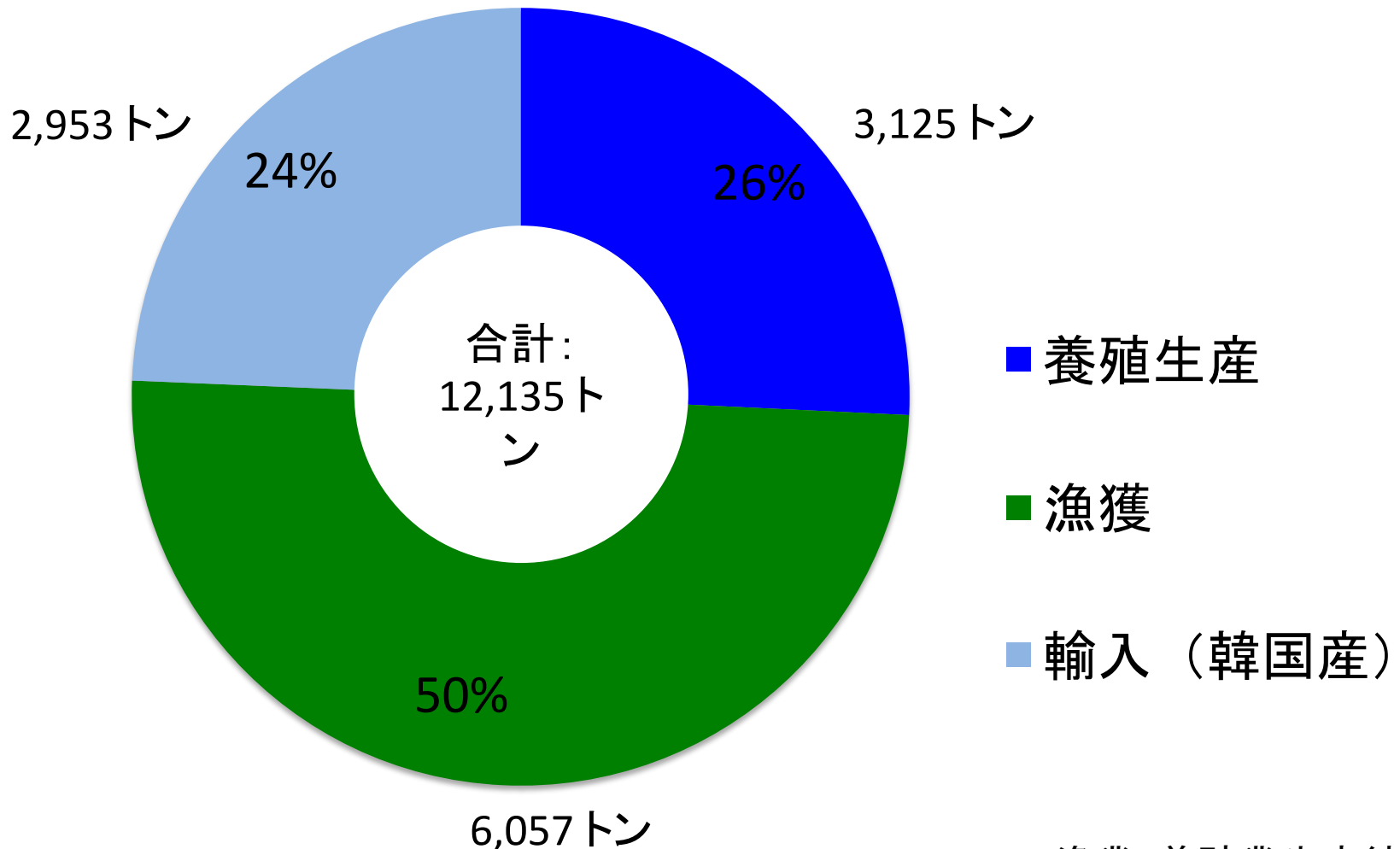
23

24

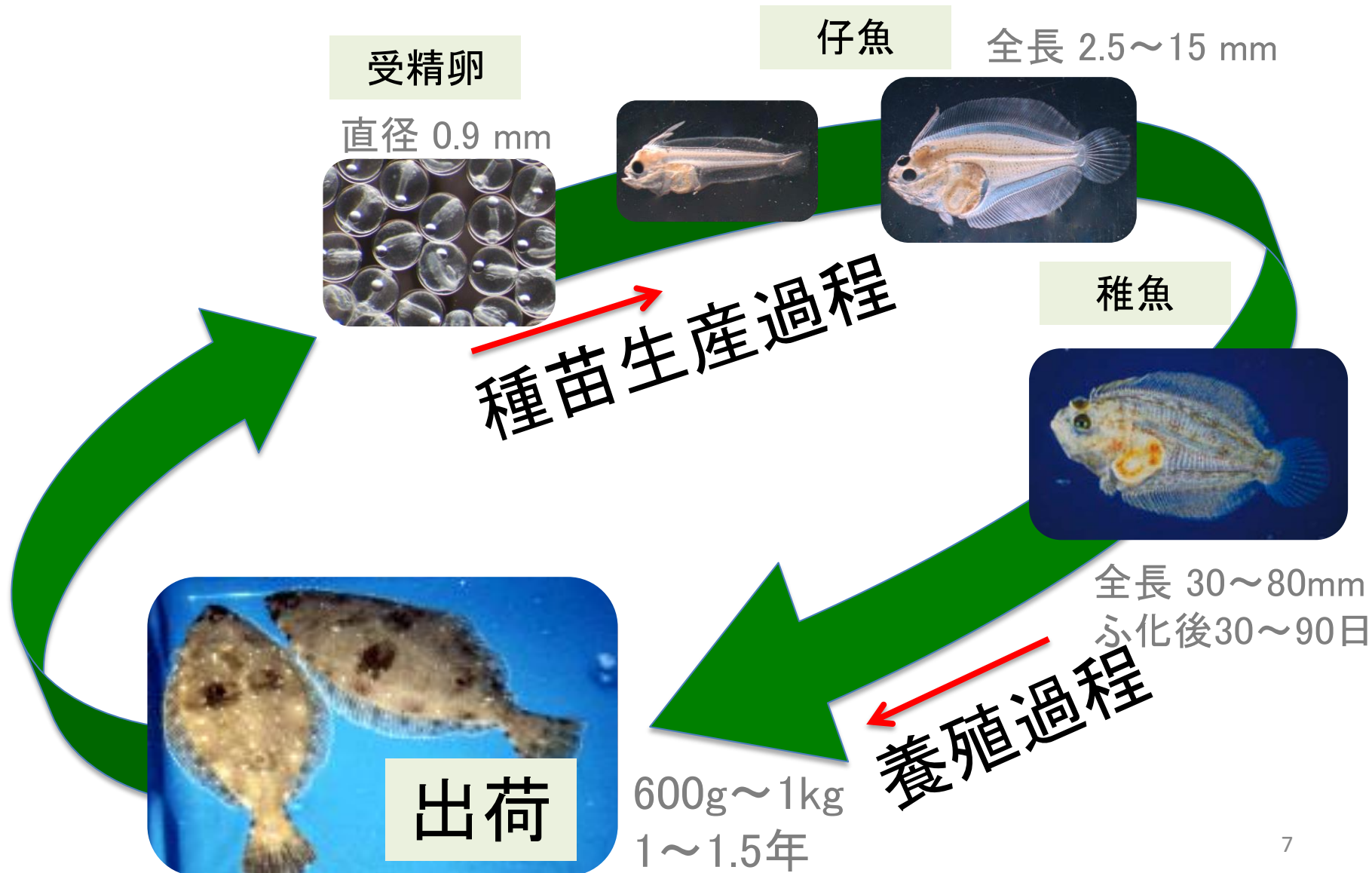
年次



全国のヒラメ消費量（平成24年）



ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) の養殖生産工程



種苗生産施設とは



陸上種苗生産施設(佐伯市)



施設内部(60kL水槽)

ヒラメ, マダイ, トラフグ, ハタ類, クロマグロ, ブリ, カンパチなど
多くの海産魚の種苗が同様の施設で生産されている.

陸上魚類養殖施設とは



陸上養殖施設(佐伯市蒲江)



施設内部(掛け流し)



ヒラメ



トラフグ

ヒラメ生産現場での *Kudoa* 対策

- 近年、生食用のヒラメに起因するとされる食中毒事例が多数発生
- 養殖ヒラメに寄生した新種のクドア属粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata* が原因と判明し食中毒として取扱開始
(平成23年6月17日, 食安発0617第3号)
- クドア胞子数がグラム当たり 1.0×10^6 個を超えると食品衛生法第6条違反となる(平成23年7月11日, 食安監発0711第1号)



農林水産省では, *Kudoa* 寄生ヒラメが出荷されることを防ぐため, 平成23年度実用技術開発事業「養殖ヒラメに寄生する新種のクドア属粘液胞子虫による食中毒の防止技術の開発」を実施

養殖ヒラメに寄生した*Kudoa septempunctata* による食中毒の防止対策 (平成24年6月1日水産庁通知)

1. 種苗の検査、養殖場への*Kudoa* 感染のない種苗の導入
2. 飼育群の来歴毎の飼育管理
3. 養殖魚の出荷前検査の実施
4. 飼育環境の清浄化
5. 飼育群毎の養殖日誌の作成
6. *Kudoa* 感染魚の取り扱い（加熱用，冷凍処理）

大分県産養殖ヒラメは安全・安心です

◎大分県産ヒラメは安全・安心！！ぜひ愛用してください！！

- 本県の養殖ヒラメ生産量は全国の約3割に当たる1,299トン（2010年）で日本一の生産量を誇っています。
- 日本一の生産量を誇る本県としては、県産養殖ヒラメの安全性を確保するため、全国に先駆け大分県独自の取組みとして対策ガイドラインを作成し、検査体制を通して出荷しています。

①種苗導入段階での検査

養殖業者は、種苗出荷業者に対し寄生虫検査（PCR検査）※
証明書を求めるなど、健全な種苗を確保します。

②養殖段階での検査

養殖業者は、種苗導入後も養殖場での新種クドア検査に努めます。

③出荷段階でロットごとに検査

出荷の際の検査は、新種クドア検鏡検査手順により、県の支援・指導に基づき養殖業者、漁協支店が行います。

- 水産庁ガイドライン（平成24年6月）に準拠し、県、県漁協、養殖業者が一体となって対応しています。

- 大分県漁協では、検査済みを証する活魚出荷用ケースを利用した出荷に取り組んでいます。



活魚出荷用ケース



検査済みタグ

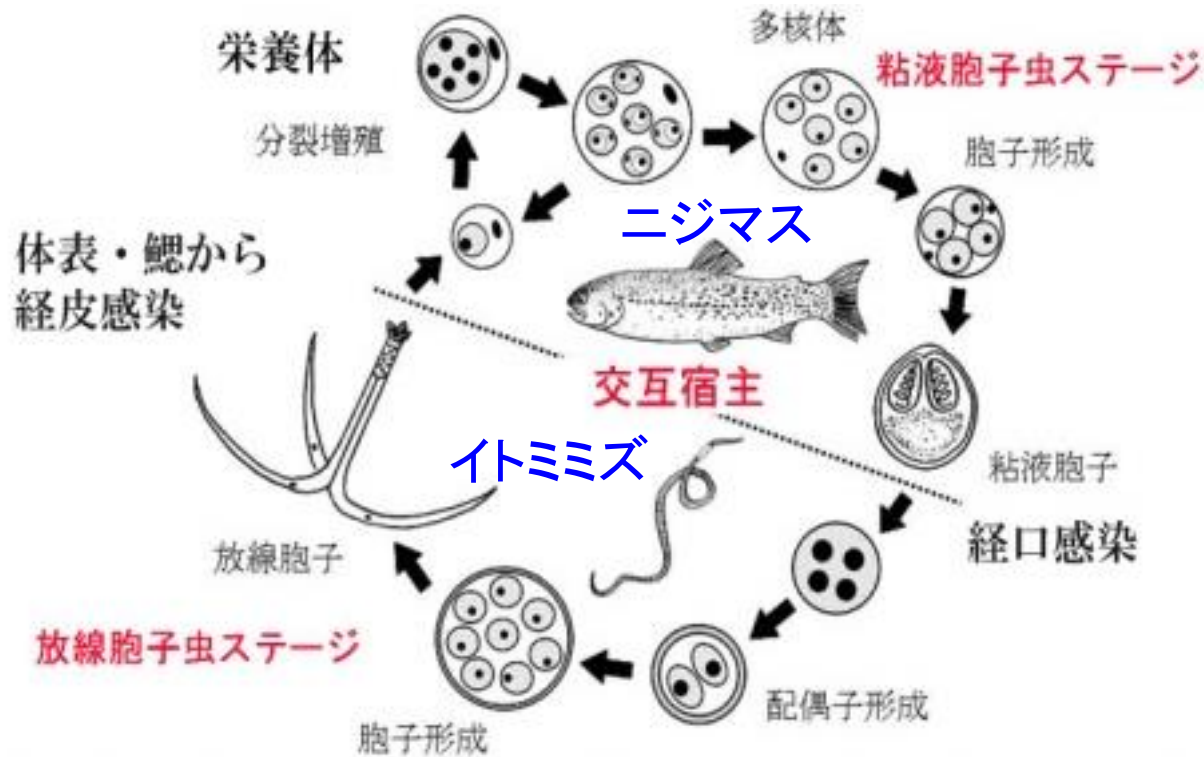
生産現場における防除対策に関する研究 開発成果

レギュラトリーサイエンス新技術開発事業（H24
～H26）

1. ヒラメの種苗生産・養殖施設等でのクドアの感染防除策の開発
2. 感染したヒラメ排除のための効率的な検査法等の開発
3. 商品価値を低下させずにクドアを冷蔵等により失活させる処理方法の開発
4. ヒラメ以外の魚種におけるクドアの感染状況調査

粘液胞子虫の生活環

旋回病 (*Myxobolus cerebralis*) の場合



ヒラメのクドア (*Kudoa septempunctata*) では生活環は不明

種苗生産場の地先周辺で採集された無脊椎動物のPCR検査結果

分類		平成24年	平成25年	平成26年
多毛類	ミズヒキゴカイ科	+		
	イトゴカイ科	+		
	ケヤリムシ科		+	
	フサゴカイ科			
	スピオ科			
	タケフシゴカイ科			
	サシバゴカイ科			
	シロガネゴカイ科			
	タマシキゴカイ科			
	チロリ科			
	ギボシイソメ科		+	
	ゴカイ科		+	
	イソメ科			
	ウロコムシ科	+		
ホシムシ類				
ユムシ類				
ヒラムシ類				
ヒル類				

: 1～10個体採取,
 : 11～20個体採取,
 : 21個体以上採取,
 +: クドアPCR検査陽性

飼育用水からのクドア遺伝子の検出

採集年月日	MF-Millipore (5 μ m)		Isopore (5 μ m)	
	コピー数/L	孢子数/L	コピー数/L	孢子数/L
H25/6/26	10.01	1.31	36.74	4.91
H25/7/5	1.94	0.31	0.30	0.05
H25/7/7	0.18	0.03	0.21	0.04
H25/7/31	0	0	1.18	0.2
H25/8/1	0	0	1.02	0.18

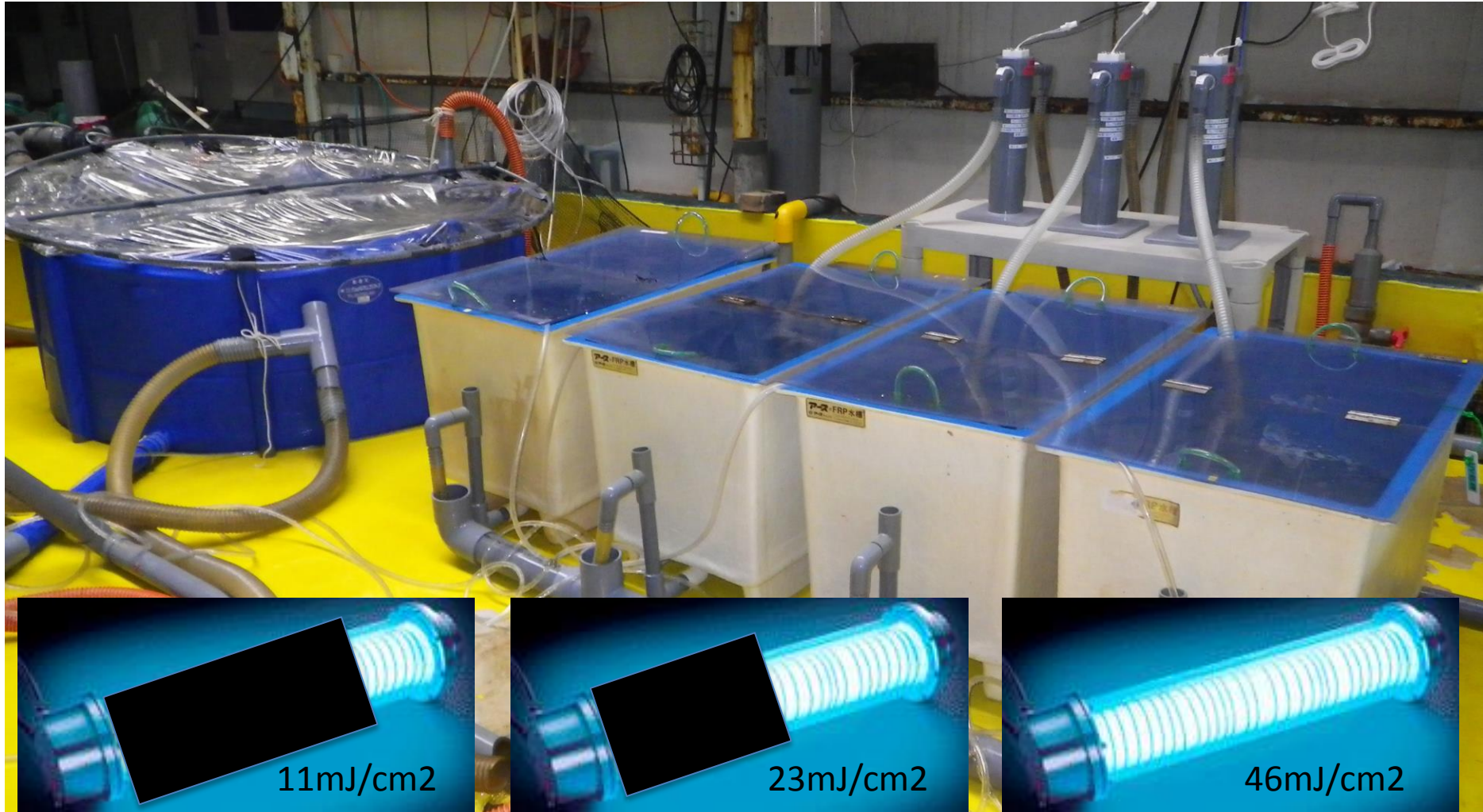
フィルター上に捕集した懸濁物よりDNAを抽出し定量PCR法 (Harada *et al.*, 2012) によりクドア遺伝子の有無を調べ, コピー数に基づき, クドア孢子数を算出した。

感染海域での月別の暴露試験結果

	試験実施時期					
	6月	7月	8月	9月	10月	12月
陽性数/ 検査数 (%)	2/30 (6.7%)	11/30 (36.7%)	3/30 (10.0%)	1/30 (3.3%)	1/30 (3.3%)	0/30 (0%)

各月に感染海域で2週間飼育後，非感染海域に移動し3カ月飼育し感染状況をPCR法により検査した。

飼育用水の処理によるクドア感染防除効果試験 試験風景(紫外線処理試験時)



飼育用水処理による防除法の検討結果

試験開始時期	試験区	部位	寄生率(陽性数/検査数)		
			1カ月	2カ月	3カ月
7月 (1回目)	無処理区	筋肉	20% (2/10)	20% (2/10)	37% (11/30) *
	砂ろ過区	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)
	UV区	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)
8月 (2回目)	無処理区	筋肉	10% (1/10)	10% (1/10)	10% (3/30)
	砂ろ過区	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)
	UV区	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)
9月 (3回目)	無処理区	筋肉	0% (0/10)	10% (1/10)	3.3% (1/30)
	砂ろ過区	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)
	UV区	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)

各条件で感染海域で2週間飼育後、非感染海域に移動し3カ月飼育し感染状況をPCR法により検査した。3回の試験を実施。*: 有意差有り (p<0.01)

紫外線照射量の検討

試験区	照射量 (mJ/cm ²)	部位	寄生率(陽性数/検査数)		
			1カ月	2カ月	3ヶ月
無処理区	0	筋肉	10% (1/10)	20% (2/10)	10% (3/30)
UV-1区	11	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/30)
UV-2区	23	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/30)
UV-3区	46	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/30)

各条件で感染海域で2週間飼育後、非感染海域に移動し3カ月飼育し感染状況をPCR法により検査した。*: 生海水区の寄生率と3回の合計の寄生率を比較し有意差有り(P<0.01)

実用規模でのクダア感染防除法の検証

給水 処理 試験区	照射量 (mJ/cm ²)	検査 部位	寄生率% (PCR検査陽性数/検査数)		
			1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月
無処理 区	0	筋肉	23% (7/30)	53% (16/30)	43% (13/30)
砂ろ過 +UV 処理区	46	筋肉	0% (0/30)	0% (0/30)	0% (0/30)

- ・ヒラメ稚魚800尾を1kL水槽で飼育
- ・感染海域で7月に1ヶ月飼育した後、非感染海域にて殺菌海水で2ヶ月飼育し感染状況をPCR法により検査した。

ヒラメの種苗生産・養殖施設等でのクドア感染 防除策の開発(まとめ)

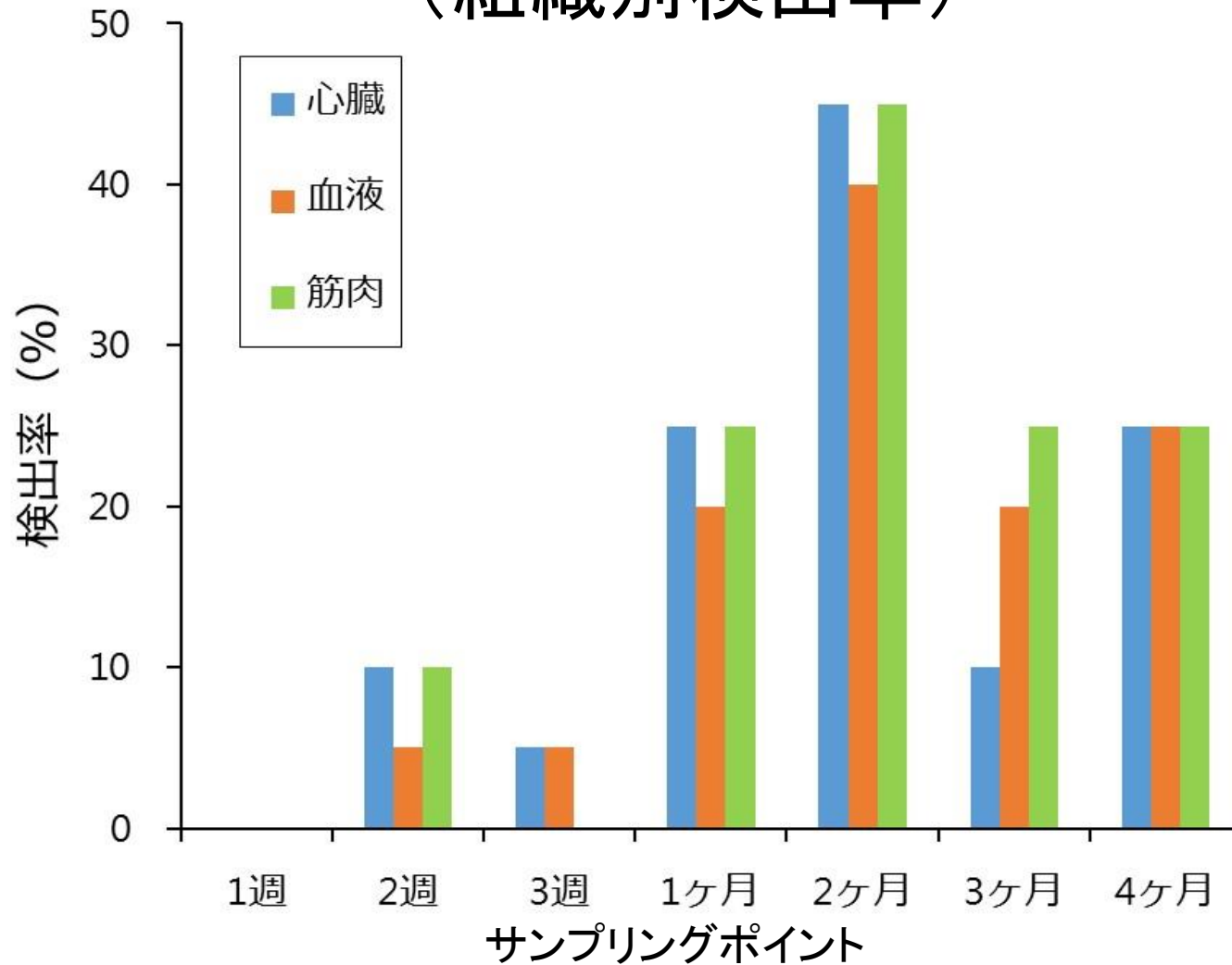
- 飼育用水を砂ろ過と紫外線照射(46mJ/cm²)で処理するクドア感染防除法を確立した。民間種苗生産業者が感染海域において事業レベルでクドア感染の無いヒラメ種苗の生産に成功し、本対策の実用性が証明された。
- クドアは夏季に高率に感染することから、特に用水の管理に十分注意する必要がある。
- 当歳魚及び1歳魚でも、本虫に感染しうることから、感染の恐れのある海域の陸上養殖施設でも用水処理が必要である。

生産現場における防除対策に関する研究 開発成果

レギュラトリーサイエンス新技術開発事業（H24
～H26）

1. ヒラメの種苗生産・養殖施設等でのクドアの感染防除策の開発
2. 感染したヒラメ排除のための効率的な検査法等の開発
3. 商品価値を低下させずにクドアを冷蔵等により失活させる処理方法の開発
4. ヒラメ以外の魚種におけるクドアの感染状況調査

ヒラメ稚魚の検査部位に関する試験 (組織別検出率)

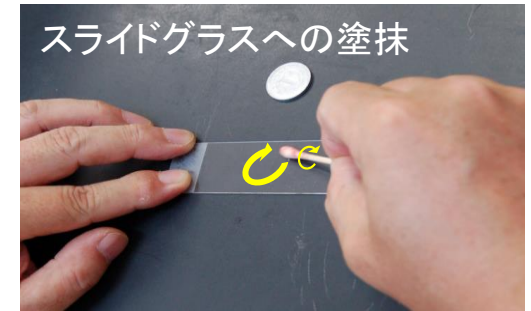
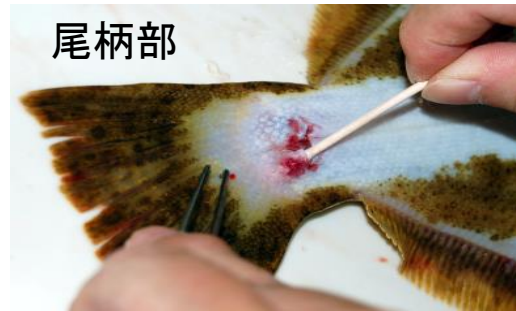
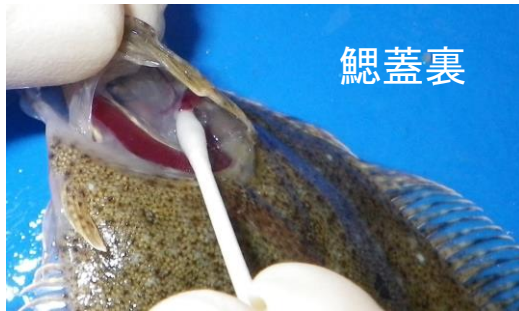


- ・感染海域の飼育施設で1ヶ月飼育後, 非感染海域にて殺菌海水で3ヶ月飼育
- ・各サンプリングポイントで20尾を採取し定量PCR法で組織別にクドアを検出

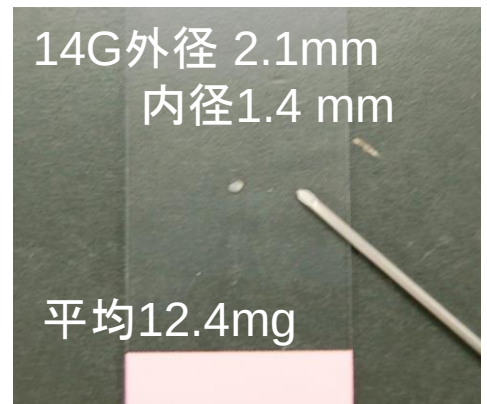
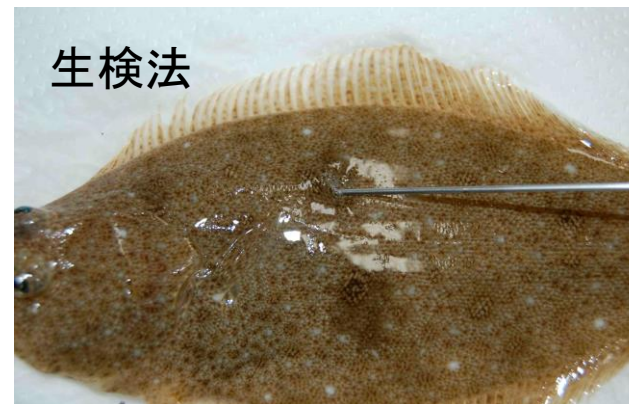
ヒラメを殺さず検査する方法について

ヒラメに寄生した*Kudoa septempunctata* の検査方法についてより(2012,5月, 水産庁)

簡易検査法

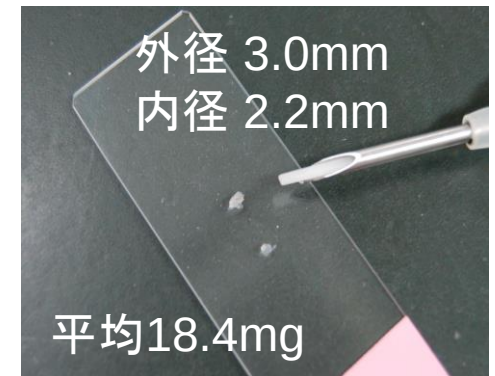


トップ社製
獣医針 14G



生検法

BIOMARK社製
Pit tag インジェクター12G

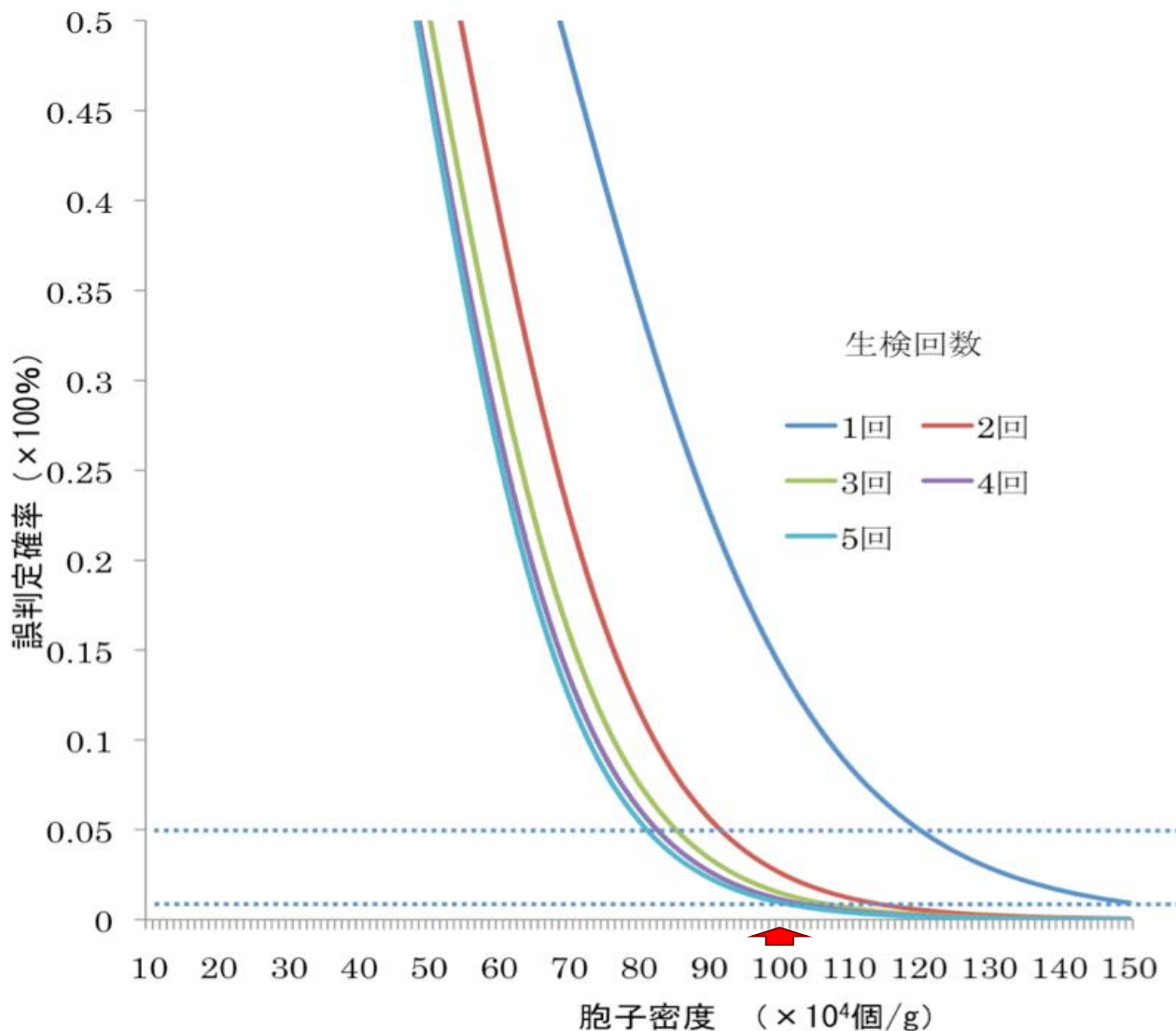


感染孢子密度が異なる個体の生検法による検出率

孢子密度 ($\times 10^4$ 個/g)	検査 個体数	12G注射針による生検法の検出率*(陽性数/検査数)				
		尾柄部	背部1	背部2	背部3	背部4
不検出	15	2/15	1/15	2/15	2/15	2/15
10～<100	7	1/7	1/7	2/7	2/7	2/7
100～ <1,000	15	15/15	14/15	14/15	15/15	14/15
1,000～ <10,000	5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
10,000～	3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

*: 注射針で採材した筋肉をウェットマウントし検鏡によりクドア孢子を確認

生検法の採取回数と誤判定の発生確率



1.0 × 10⁶個/g以上の感染個体であれば、1個体あたり2カ所からの採材による生検法で誤差判定が起こる確率を5%以下にできる（筋肉量10～20mg/箇所）

感染したヒラメ排除のための効率的な 検査法等の開発（まとめ）

- ヒラメ稚魚では、感染2週目以降では心臓、筋肉及び血液においても検査できることを確認し、養殖場に導入する前の種苗の検査部位に適していることを明らかにした。
- 養殖期間中あるいは出荷時にヒラメを殺さず検査する方法として、注射針を用い筋肉を採材し、ウェットマウント法により検鏡検査する方法を開発した。本法では、2カ所から採材することにより 1.0×10^6 個/g以上の胞子が感染している個体を問題なく検出できることを確認した。

生産現場における防除対策に関する研究 開発成果

レギュラトリーサイエンス新技術開発事業（H24
～H26）

1. ヒラメの種苗生産・養殖施設等でのクドアの感染防除策の開発
2. 感染したヒラメ排除のための効率的な検査法等の開発
3. 商品価値を低下させずにクドアを冷蔵等により失活させる処理方法の開発
4. ヒラメ以外の魚種におけるクドアの感染状況調査

商品価値を低下させずにクドアを冷蔵等により失活させる方法の開発(まとめ)

- 簡易に孢子の失活の有無を確認するHO&PI (HO: Hoechst 33342, PI: propidium iodide) による蛍光色素染色法を開発した。本法を用いて、80℃・10秒以上の加熱、25%以上のエタノール、10μl/mlのリモネン処理、-20℃・4時間以上、塩分濃度が0%、16%の条件下で精製クドア孢子が失活することを明らかにした。
- また、商品価値を低下させずにクドアを失活させる方法については、急速凍結(-50℃)し、-30℃貯蔵、氷水解凍することで、色や味などでは差がなく、厳密に鮮魚等と比較されない局面ならば、商品として受容される可能性が高い、処理方法を開発した。

生産現場における防除対策に関する研究 開発成果

レギュラトリーサイエンス新技術開発事業（H24
～H26）

1. ヒラメの種苗生産・養殖施設等でのクドアの感染防除策の開発
2. 感染したヒラメ排除のための効率的な検査法等の開発
3. 商品価値を低下させずにクドアを冷蔵等により失活させる処理方法の開発
4. ヒラメ以外の魚種におけるクドアの感染状況調査

天然ヒラメの *Kudoa septempunctata* 感染状況

採取 年度	調査 尾数	平均体重	PCR陽性数 (陽性率)	孢子密度が 1×10^6 個/gを超 えた個体数 (出現率)
H24～ 26年	1,138	0.97kg (0.01～12.9kg)	50 (4.4%)	3 (0.3%)

- ・主に感染海域及びその他の海域において、採集されヒラメを調査
- ・平成24年度は感染海域及びその他海域、平成25年度は感染海域と隣接海域、26年度は前年度の調査で感染個体が確認された海域のみ調査
- ・この結果は我が国沿岸での平均的な感染の程度を示すものではない

天然クロマグロの *Kudoa hexapunctata* 感染状況

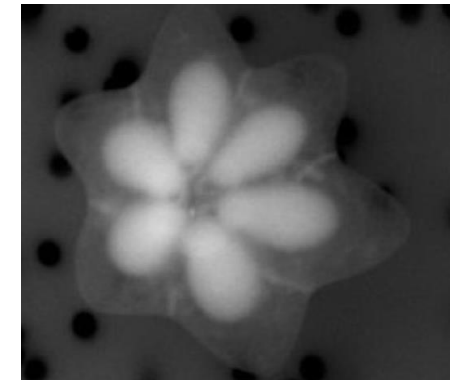
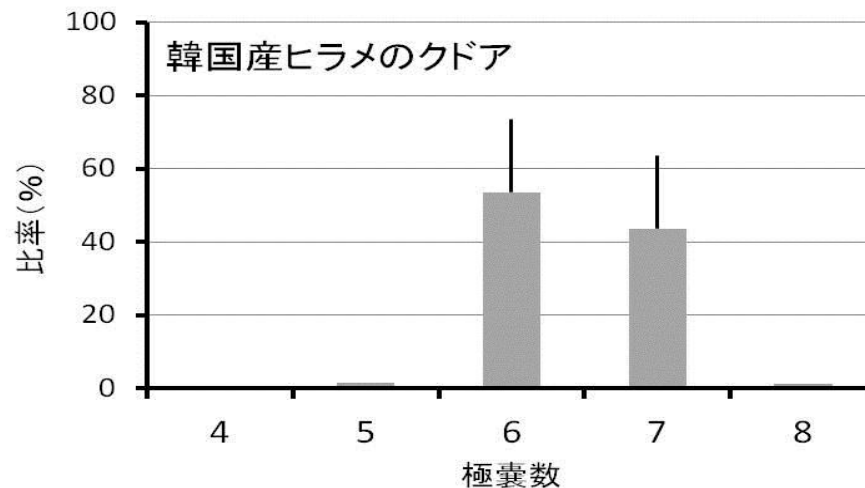
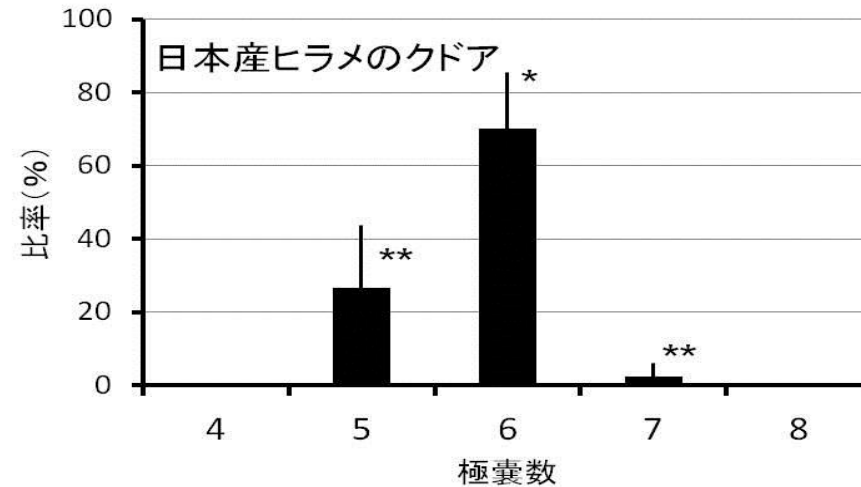
採取年度	調査 尾数	平均体重	PCR検査 陽性数 (陽性率%)	陽性個体の 孢子密度 (個/g)
H24～26年	427	5.4kg (64.3g～78kg)	178 (41.7%)	$10 \sim 1.1 \times 10^5$

- ・我が国沿岸海域で水揚げされたクロマグロの尾部筋肉の一部を採取し、28S rDNAの部分配列を増幅するプライマーによりPCR検査を行った。
- ・PCR陽性の検体は、顕微鏡観察にてクドア孢子数を計数した。

ヒラメ以外の養殖魚

- 平成24, 25年度に感染海域のマダイおよび隣接海域のマダイ, カンパチ, ブリ, スズキについて, 定量PCR, 28S rDNAを検出するPCRおよび検鏡法によりクドアの感染状況を調査した。
- いずれの海域の養殖マダイ, ブリ, スズキ, トラフグ, カンパチにおいてPCRおよび検鏡による検査で, クドアは検出されなかった。

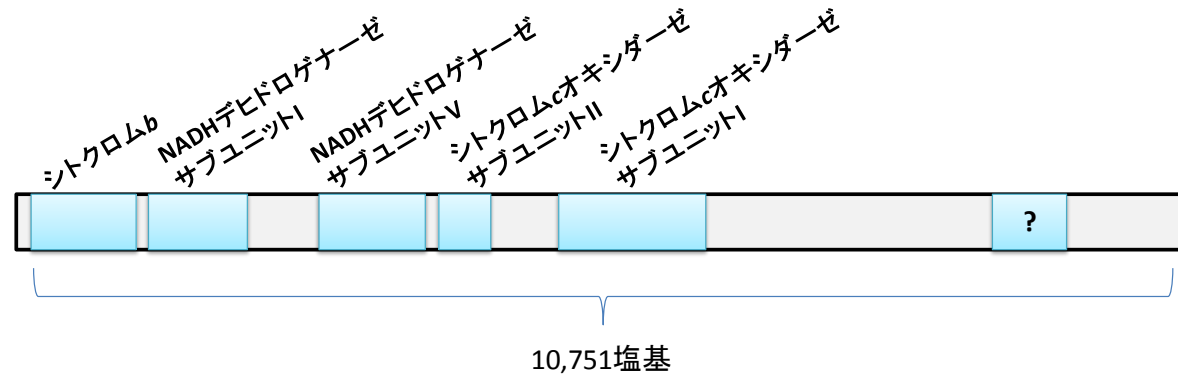
日本産ヒラメと韓国産ヒラメ由来のクドア胞子の形態学的比較(極囊数の出現割合)



K.Hexapunctata
(Suzuki et al. 2015)

・日本産と韓国産ヒラメ由来のクドア胞子における極囊数の出現割合。胞子200個のうちの、各極囊数を持つ胞子の割合。縦棒は標準偏差、*は $p<0.05$ 、**は $p<0.01$ で対応する極囊数の韓国産クドアと有意差が有ることを示す。

*Kudoa septempunctata*の遺伝学的比較 (ミトコンドリアDNAの株間での比較)



*Kudoa septempunctata*のミトコンドリアDNAの構成遺伝子

Japan	1	AGTT	CAGCTAAGATGCTTCAGCTGGCTAAGATGAGCATGAAAGCTATCAGGCT
Korea_I	1	AGCT	CAGCTAAGATGCTTCAGCTGGCTAAGATGAGCAGGAAAGCTGTTAGGCT
Korea_II	1	AGTT	CAGCTAAGATGCTTCAGCTGGCTAAGATGAGCATGAAAGCTATCAGACT
Unknown_I	1	AGCT	CAGCTAAGATGCTTCAGCTGGCTAAGATGAGCAGGAAAGCTGTTAGGCT
Unknown_II	1	AGTT	CAGCTAAGATGCTTCAGCTGGCTAAGATGAGCATGAAAGCTATCAGACT

国内由来1株、韓国由来2株および食中毒残品由来2株の*Kudoa septempunctata*のミトコンドリアDNAの株間での比較

ヒラメ以外の魚種におけるクドアの 感染状況調査(まとめ)

- 天然ヒラメでは、海域によっては*Kudoa septempunctata*感染個体が認められ、一部には出荷サイズとしては小型ではあったが胞子密度が 1.0×10^6 個/g以上を超えた個体が確認された。
- 日本周辺で漁獲される天然クロマグロに*K. hexapunctata*が感染していることを明らかにした。胞子密度は何れも 10^5 個/g以下であった。
- 感染海域の養殖マダイ及びその周辺の海域で養殖されたマダイ、ブリ、スズキ、トラフグ及びカンパチでは*K. septempunctata*の感染は認められなかった。マダイ等の他魚種では、本クドアは感染しないことが示唆され、感染海域においては、代替魚種としてヒラメ以外のこれらの魚種を養殖することで産業被害を軽減し得ることを明らかにした。
- クドアの韓国株と国内株の形態及び遺伝子配列を比較したところ、極囊数及びミトコンドリアDNAに株特徴的な変異領域が認められた。

ヒラメ生産現場における防除対策

種苗生産

- 飼育水(給水)の処理
 - 砂ろ過
 - UV殺菌
 - 夏季の流行に注意

稚魚導入時の検査(心臓, 血液, 筋肉)

養殖

- 飼育水(給水)の処理
 - 砂ろ過
 - UV殺菌
 - 夏季の流行や1歳魚でも感染するので注意

出荷時の検査(生検法で活魚にも対応)

出荷

- 簡易な孢子の不活化評価法を開発
- 冷凍による不活化条件を最適化