

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

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

令和6年3月

## 目次

はじめに .....	3
1. ウイルス性血管内皮壊死症の診断方法 .....	4
1.1 肉眼・顕微鏡下での観察 .....	4
1.2 組織中のウイルス DNA の検出 .....	4
1.3 飼育水中のウイルス DNA の検出 .....	7
1.4 抗体の検出に基づくウイルス感染歴の検査 .....	12
2. 防除方法および被害軽減策 .....	13
2.1 キャリア魚と健康魚の隔離飼育 .....	13
2.2 器具等の消毒 .....	14
2.3 病気が発生した場合の取り扱い .....	15
付録 被害リスク低減のためのチェックシート .....	16
リスクが高くなる要因 .....	16
リスクを低くするための管理 .....	16

## はじめに

ウナギのウイルス性血管内皮壊死症(鰓うっ血症・棒状うっ血)は養鰻において毎年大きな被害を引き起こしている病気の一つです(図1)。1983, 84年頃に静岡県の吉田地方で初めて発生した後、他の主要生産地にも被害が拡大し、現在まで続いています。この病気の発生は春から初夏、および秋口に多く報告されています。これは真夏の高水温がウイルスの増殖に不適であるためと考えられます。養殖形態に関しては、単年養殖に比べ、周年養殖の養鰻場で発生報告が多くなっています。これは前年から飼育している魚がウイルスを保有した状態(キャリア)となっており、そこから健康魚に伝播しているためと考えられます。シラスウナギの時点で既に感染していることは稀です。被害の規模は養殖場では死亡率20%ほど、実験感染では80%ほどに達することもあります。

症状としては鰓の棒状うっ血が特徴的ですが、他にも肝臓・腎臓における出血・うっ血、鰭や体表の発赤など、全身に症状が現れます(図2)。深刻な場合には腹腔内の出血や腹水の貯留も見られます。病原体は Japanese eel endothelial

cells-infecting virus (JEECV) と呼ばれる DNA ウイルスで、このウイルスは血管内皮細胞および壁柱細胞に特異的に感染し、核内で増殖、やがて細胞を破壊して放出されます。板状出血症・点状出血症と呼ばれる症状(図3)を呈した病魚の一部からも JEECV は検出されており、このウイルスによる別症状の可能性もあります。しかし、また別のウイルスによるものとする説もあり、鰓以外に特徴的な症状も少ないことから、「板状」「点状」として報告されてきた病気に異なる原因のものが混在している可能性もあります。決定的な情報はまだありませんが、ウイルス感染を防ぐという点では、血管内皮壊死症と同様の方法により一定の効果が期待できます。

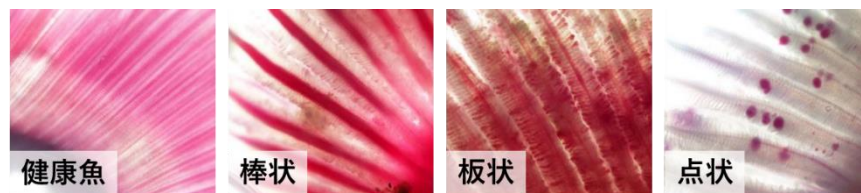


図3. ウナギの鰓の実体顕微鏡像

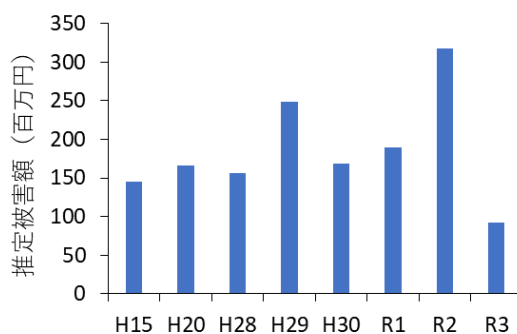


図1. ウナギのウイルス性血管内皮壊死症による国内の推定被害額の推移

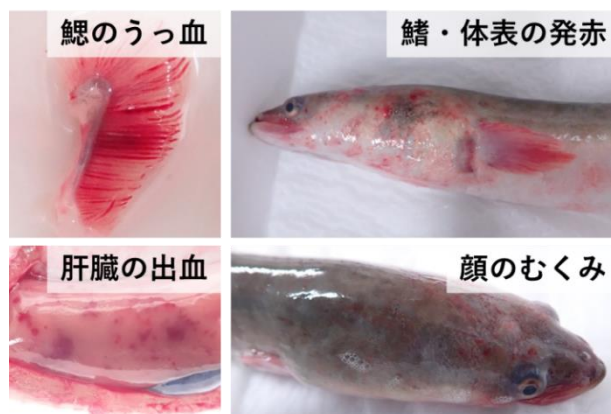


図2. 病魚の写真

## 1. ウイルス性血管内皮壊死症の診断方法

### 1.1 肉眼・顕微鏡下での観察

外観的には胸鰭、鰓蓋孔、下顎、腹部、臀鰭などに発赤が生じます。鰓蓋が膨らんでおたふく状になることもあります。外観症状はウイルスが増殖した後に急激に生じるため、外観症状がないからといってウイルスに感染していないとは限りません。末期的な病魚では腹腔内に出血や腹水の貯留が見られます。鰓の観察では鰓弁中央の中心静脈洞に強いうっ血（棒状うっ血）が見られるのが特徴です。板状出血・点状出血については、鰓全体の鰓薄板に小さな出血点が生じているものを「板状」、出血点一つ一つが比較的大きなものを「点状」と呼んでいますが、区別は明確ではありません。

### 1.2 組織中のウイルス DNA の検出

#### ① Conventional PCR・Real-time PCR

##### (1) 組織からの DNA 抽出

##### 材料

- QIAamp DNA Mini Kit
- 99.5%エタノール
- マイクロチューブ
- ヒートブロック
- 遠心機

##### 方法（QIAamp DNA Mini Kit の説明書通り）

1. 組織片 (25 mg 程度) をマイクロチューブに入れ、Buffer ATL 180  $\mu$ L および Proteinase K 20  $\mu$ L を添加。
  - \* 組織は基本的に鰓を使用している。肝臓・腎臓等からも検出は可能。
  - \* 先に必要量の Buffer ATL と Proteinase K を混合して分注すると手間が少ない。
2. 56°C で 1~3 時間、溶け残りがなくなるまでインキュベート。
  - \* 時々ボルテックスしたり、振盪したりしながら加温すると早い。
3. Buffer AL を 200  $\mu$ L 添加、15 秒間ボルテックス。
  - \* コンタミを避けるためフタを空ける際は一度スピンドウンしてから。以降同様。
4. 70°C で 10 分インキュベート。
5. 99.5% EtOH を 200  $\mu$ L 添加し、15 秒間ボルテックス。
6. スピニングカラムに溶液を添加し、6,000  $\times$  g で 1 分間遠沈。
7. 濾液を捨て、Buffer AW1 を 500  $\mu$ L 添加、再度遠沈
8. 濾液を捨て、Buffer AW2 を 500  $\mu$ L 添加、20,000  $\times$  g で 3 分間遠沈。
9. 濾液を捨て、20,000  $\times$  g で 1 分遠沈
10. カラムを新しいマイクロチューブにセットし、Buffer AE 200  $\mu$ L を添加。1 分間静置。

11. 6,000×g で1分遠沈し、溶出。
12. 抽出した DNA 溶液は分光光度計等で濃度を測定しておく。  
\* 抽出 DNA 溶液は使用まで-30℃凍結保存。

## (2) Conventional PCR

### 材料

- Gene RED PCR Mix Plus (ニッポン・ジーン)
- JEECV 用プライマー  
Forward : 025-1 (5'-TTGCCGCACCTGCTTCAG-3'),  
Reverse : 025-2 (5'- CGAACACCGTAATTGGAATAAAGC -3')
- PCR チューブ
- サーマルサイクラー
- 1.5%アガロースゲル  
(1×TAE バッファー 100 mL にアガロース 1.5g を加えて電子レンジで加熱、溶解)
- 電気泳動槽
- 蛍光染色液 (核酸蛍光染色試薬を 1×TAE バッファーで希釈)
- トランスイルミネーター

### 方法

1. 目的のサンプルの数+2 反応分程度の反応液を調製。  
反応液組成 (1 反応あたり)  

Gene Red PCR Mix Plus	10 μL
Forward primer (10 μM) (終濃度 200 nM)	0.4 μL
Reverse primer (10 μM) (終濃度 200 nM)	0.4 μL
Nuclease-free water	7.2 μL
<hr/>	
Total	18 μL
2. 反応液を 18 μL ずつ分注後、DNA サンプルを 2 μL ずつ添加
3. PCR (95℃ 5分 → [95℃ 30秒 → 55℃ 30秒 → 72℃ 1分] x40 サイクル → 72℃ 7分)
4. 電気泳動 (1.5%アガロースゲル、100 V、25分)
5. トランスイルミネーターを用いて泳動結果を確認

## (3) Real-time PCR

### 材料

- FastStart Essential DNA Probes Master (Roche)
- JEECV 用プライマー

Forward : 025-1 (5'-TTGCCGCACCTGCTTCAG-3'),  
Reverse : 025-2 (5'- CGAACACCGTAATTGGAATAAAGC -3')

- JEECV 用プローブ  
025-P (5'- FAM-ACACGCTGCTCAAATTGCTGCTGCCT-TAMRA -3')
- JEECV 用スタンダードサンプル  
\* PCR 産物を組み込んだプラスミドを段階希釈したもの。コピー数は予め計算済み。
- Real-time PCR 用 8 連チューブ or 96 ウェルプレート
- Real-time PCR 装置 (水産技術研究所病理部では Lightcycler 96 (Roche) を使用)

## 方法

1. (目的のサンプルの数+スタンダードサンプルの数) ×2+2 反応分程度を調製。

\* 「×2」は Real-time PCR を duplicate で実施する場合の計算。

反応液組成	(1 反応あたり)
FastStart Essential DNA Probe Master Mix	10 $\mu$ L
Forward primer (10 $\mu$ M) (終濃度 200 nM)	0.4 $\mu$ L
Reverse primer (10 $\mu$ M) (終濃度 200 nM)	0.4 $\mu$ L
Probe (10 $\mu$ M) (終濃度 200 nM)	0.4 $\mu$ L
<u>Nuclease-free water</u>	<u>6.8 <math>\mu</math>L</u>
Total	18 $\mu$ L

2. 反応液を 18  $\mu$ L ずつ分注後、DNA サンプルを 2  $\mu$ L ずつ添加  
\* スタンダードサンプルは高濃度でありコンタミのもとになりやすいため、目的のサンプルの反応液をすべて調製し終え、チューブのフタを閉めた後で扱うことを推奨。
3. Real-time PCR (95°C 10 分 → [95°C 10 秒 → 60°C 30 秒] x45 サイクル)
4. スタンダードサンプルの Ct 値を用いて検量線を引き、各サンプル反応液中のウイルス DNA コピー数を求める。
5. 抽出 DNA 濃度を元に Total DNA 1  $\mu$ g あたりのウイルス DNA コピー数を計算する。

## ② Chelex 抽出 + LAMP 法

本法に関しては詳細な条件検討は完了していませんが、簡便な検査法として掲載しておきます。

## 材料

- Chelex 100 Chelating Resin, molecular biology grade, 200–400 mesh, sodium form (Bio-Rad)
- WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix (New England Biolabs)
- LAMP プライマー  
LO6F3 (5'-CGTACCAGCGGAAGTACAC-3')

LO6B3 (5'-ACCTCGCTGTGCACTAGG -3')

LO6FIP (5'-ATTGCGGCCTGTAGGCCAACTGCAGAGACCAGATTGAGCA -3')

LO6BIP (5'-CGCACTGGAACACCCTGACAGCCAACAACCGACAGAACAA -3')

LO6LF (5'-GTACGGCAGGGCACACA -3')

LO6LB (5'-CCGCTACAGAACATGCACGA -3')

- PCR チューブ
- ヒートブロック

## 方法

1. 10x Primer Mix を調製する。

LO6F3 (100 μM) (終濃度 2 μM)	4 μL
LO6B3 (100 μM) (終濃度 2 μM)	4 μL
LO6FIP (100 μM) (終濃度 16 μM)	32 μL
LO6BIP (100 μM) (終濃度 16 μM)	32 μL
LO6LF (100 μM) (終濃度 8 μM)	16 μL
LO6LB (100 μM) (終濃度 8 μM)	16 μL
Nuclease-free water	96 μL
<hr/>	
Total	200 μL

2. LAMP Reaction Mix を調製し、PCR チューブに 14 μL ずつ分注しておく。

\* 混合・分注した状態で冷凍保存可

反応液組成	(1 反応あたり)
WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix	10 μL
10x Primer Mix	2 μL
Nuclease-free water	6 μL
<hr/>	
Total	200 μL

3. Chelex 100 Resin 5 g を蒸留水に懸濁して 100 mL にメスアップし、5% (w/v) Chelex 液を調製。
4. マイクロチューブに入れた組織片に 5% Chelex 液をよく振ってから 1 mL 加え、95°C で 45 分間加温。
5. LAMP Reaction Mix の入った PCR チューブに抽出 DNA 溶液を 2 μL ずつ加え、65°C で 45 分間加温。
6. 色の変化を確認する。  
\* 元はピンク色の試薬が、陽性の場合には黄色に変化する。

### 1.3 飼育水中のウイルス DNA の検出

#### ① Real-time PCR

## (1) 鉄凝集法によるウイルス粒子の濾過濃縮

### 材料

- 塩化鉄 (III) 溶液 (DW 100mL に対して塩化鉄 (III) 6 水和物 4.83 g を溶解)
  - \* 鉄イオン濃度が 10 mg/mL
  - \* 常温・遮光保存し、沈殿が生じたら更新すること。
- 不活化 RSIV 液 (ウイルス回収率計算のための内部標準用)
  - \* 原液を 100 倍希釈してから使用する。
  - \* ウイルス回収率は相対定量なので、原液の濃度自体は重要でない。
- 人工海水粉末 (こちらではシーライフ (マリンテック) を使用)
- マイクロチューブ
- 三角フラスコ
- マグネチックスターラー
- 0.8  $\mu\text{m}$  ポリカーボネートメンブレンフィルター (アドバンテック K080A047A)
- 吸引濾過器

### 方法

1. 飼育水 100 mL を三角フラスコに移す。
  - \* 用いる飼育水サンプルを 500 mL 等に増やせば検出感度は上がると考えられるが、フィルターの目詰まりも起きやすくなるため 100 mL に設定している。
2. 人工海水 1 g を添加し、スターラーで攪拌して溶解。
3. 不活化 RSIV 液 50  $\mu\text{L}$  を添加、スターラーで攪拌。
  - \* 回収率計算のためのコントロールとして、別途マイクロチューブ 1 本に不活化 RSIV 液 50  $\mu\text{L}$  を取り分けておく。濾過濃縮作業が終わるまで室温に置いておき、濾過後のメンブレンフィルターを冷凍するときと一緒に冷凍、他のサンプルと同時に DNA 抽出に供する。
4. 塩化鉄 (III) 溶液 50  $\mu\text{L}$  を添加 (Fe 終濃度 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。
5. スターラーで 1~3 時間、穏やかに攪拌。
6. 0.8  $\mu\text{m}$  フィルターを用いて吸引濾過。
  - \* 濾過後のフィルターは茶色になる。これを鉄凝集ができた目安とする。
7. ピンセットを用いてフィルターを折りたたみ、マイクロチューブに入れる。
  - \* 濾過の際に上側だった面を内側に。凍結保存可。

## (2) フィルターからの DNA 抽出

### 材料

- QIAamp DNA Mini Kit
- 99.5%エタノール



- マイクロチューブ
- ヒートブロック
- 遠心機

#### 方法 (QIAamp DNA Mini Kit の説明書を一部改変)

1. 凍結保存したフィルターに Buffer ATL 360  $\mu$ L、Proteinase K 40  $\mu$ L を添加し、よく攪拌 (ボルテックスおよび指でのタッピング、転倒混和)。
  - \* フィルターがバッファーに浸かりやすいよう、キット説明書の2倍量を用いている。先に必要量を混合してから分注・添加すると手間が少ない。
2. 56°Cで1~3時間インキュベート。
  - \* 時々ボルテックスする。
3. Buffer AL を 400  $\mu$ L 添加、よく攪拌。
  - \* コンタミを避けるためフタを空ける際は一度スピンドウンしてから。以降同様。
4. 70°Cで30分インキュベート。
5. チップでフィルターを押しつぶしながら、チューブ内の液体を新しいマイクロチューブに回収。
6. 回収した液に 99.5% EtOH を 400  $\mu$ L 添加し、よくボルテックス。
7. スピнкаラムに溶液の半量を添加し、6,000 $\times$ g で1分遠沈。
  - \* 汚れが多いときはカラムに移す前に長めにスピンドウンして上清を用いる。
8. 濾液を捨て (or コレクションチューブを交換)、溶液の残りをカラムに添加、再度遠沈。
  - \* これ以降はキットの説明書通り。
9. 濾液を捨て、Buffer AW1 を 500  $\mu$ L 添加、再度遠沈
10. 濾液を捨て、Buffer AW2 を 500  $\mu$ L 添加、20,000 $\times$ g で3分遠沈。
11. 濾液を捨て、20,000 $\times$ g で1分遠沈
12. カラムを新しいマイクロチューブにセットし、Buffer AE 200  $\mu$ L を添加。1分静置。
13. 6,000 $\times$ g で1分遠沈し、溶出。
  - \* 抽出 DNA 溶液は使用まで-30°C冷凍保存。

#### (3) Real-time PCR

##### 材料

- FastStart Essential DNA Probes Master (Roche)
- JEECV 用プライマー  
025-1 (5'-TTGCCGCACCTGCTTCAG-3'),  
025-2 (5'-CGAACACCGTAATTGGAATAAAGC-3')
- JEECV 用プローブ  
025-P (5'-FAM-ACACGCTGCTCAAATTGCTGCTGCCT-TAMRA-3')

- RSIV 用プライマー  
RSIV-MCP186F (5'-CGGCCAGGAGTTTAGTGTGACT-3')  
RSIV-MCP288R (5'-GCTGTTCTCCTTGCTGGACG-3')
- RSIV 用プローブ  
RSIV-MCP239P (5'-FAM-TGTGGCTGCGTGTTAAGATCCCCTCCA-BHQ1-3')
- JEECV 用・RSIV 用スタンダードサンプル  
\*PCR 産物を組み込んだプラスミドを段階希釈したもの。コピー数は予め計算済み。
- Real-time PCR 用 8 連チューブ or 96 ウェルプレート
- Real-time PCR 装置 (水産技術研究所病理部では Lightcycler 96 (Roche)を使用)

## 方法

1. (目的のサンプルの数+スタンダードサンプルの数)×2+2 反応分程度の反応液を調製。

\*「×2」は Real-time PCR を duplicate で実施する場合の計算。

反応液組成 (1 反応あたり)

FastStart Essential DNA Probe Master Mix	10 μL
Forward primer (10 μM) (終濃度 200 nM)	0.4 μL
Reverse primer (10 μM) (終濃度 200 nM)	0.4 μL
Probe (10 μM) (終濃度 200 nM)	0.4 μL
Nuclease-free water	6.8 μL
Total	18 μL

2. 反応液を 18 μL ずつ分注後、DNA サンプルを 2 μL ずつ添加  
\*スタンダードサンプルは高濃度でありコンタミのもとになりやすいため、目的のサンプルの反応液をすべて調製し終えてチューブのフタを閉めた後で取り扱う。
3. Real-time PCR (95°C 10 分 → [95°C 10 秒 → 60°C 30 秒] x45 サイクル)
4. JEECV・RSIV それぞれについて、スタンダードサンプルの Ct 値を用いて検量線を引き、各サンプル反応液中のウイルス DNA 量を求める。
5. 取り分けておいた不活化 RSIV 溶液の定量結果と、各飼育水サンプルの RSIV DNA の定量結果を比較し、ウイルス DNA の回収効率を計算する。
6. 各サンプル反応液の JEECV DNA の定量結果を、上のウイルス回収率を用いて補正し、飼育水 1 mL 中の JEECV DNA コピー数を求める。  
\*飼育水サンプル 100 mL を Buffer AE 200 μL で溶出し、これを PCR 反応液へ 2 μL (溶出量全体の 1/100) 添加しているの、反応液中の DNA 量は元の飼育水 1mL 分。

### ③ Chelex 抽出 + LAMP 法

本法に関しては詳細な条件検討は完了していませんが、簡便な検査法として掲載しておきます。

## 材料

- Chelex 100 Chelating Resin, molecular biology grade, 200–400 mesh, sodium form (Bio-Rad)
- WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix (New England Biolabs)
- LAMP プライマー  
LO6F3 (5'-CGTACCAGCGGAAGTACAC-3')  
LO6B3 (5'-ACCTCGCTGTGCACTAGG -3')  
LO6FIP (5'-ATTGCGGCCTGTAGGCCAACTGCAGAGACCAGATTGAGCA -3')  
LO6BIP (5'-CGCACTGGAACACCCTGACAGCCAACAACCGACAGAACAA -3')  
LO6LF (5'-GTACGGCAGGGCACACA -3')  
LO6LB (5'-CCGCTACAGAACATGCACGA -3')
- PCR チューブ
- ヒートブロック

## 方法

1. 10x Primer Mix を調製する。

LO6F3 (100 $\mu$ M) (終濃度 2 $\mu$ M)	4 $\mu$ L
LO6B3 (100 $\mu$ M) (終濃度 2 $\mu$ M)	4 $\mu$ L
LO6FIP (100 $\mu$ M) (終濃度 16 $\mu$ M)	32 $\mu$ L
LO6BIP (100 $\mu$ M) (終濃度 16 $\mu$ M)	32 $\mu$ L
LO6LF (100 $\mu$ M) (終濃度 8 $\mu$ M)	16 $\mu$ L
LO6LB (100 $\mu$ M) (終濃度 8 $\mu$ M)	16 $\mu$ L
<u>Nuclease-free water</u>	<u>96 <math>\mu</math>L</u>
Total	200 $\mu$ L
2. LAMP Reaction Mix を調製し、PCR チューブに 14  $\mu$ L ずつ分注しておく。  
\* 混合・分注した状態で冷凍保存可  
反応液組成 (1 反応あたり)

WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix	10 $\mu$ L
10x Primer Mix	2 $\mu$ L
<u>Nuclease-free water</u>	<u>6 <math>\mu</math>L</u>
Total	200 $\mu$ L
3. Chelex 100 Resin 50 g を蒸留水に懸濁して 100 mL にメスアップし、50% (w/v) Chelex 液を調製。
4. 飼育水サンプル 1mL に対して 50% Chelex 液を 100  $\mu$ L 加え、95°C で 45 分間加温。
5. LAMP Reaction Mix の入った PCR チューブに抽出 DNA 溶液を 2  $\mu$ L ずつ加え、65°C で 45 分間加温。

6. 色の変化を確認する。

\*元はピンク色の試薬が、陽性の場合は黄色に変化する。

1.4 抗体の検出に基づくウイルス感染歴の検査

検査対象個体が過去に JEECV に感染したことがあるか、ELISA を用いた血清中の抗 JEECV 抗体の検出により調べる方法です。

材料

- 96 ウェル ELISA プレート
- Coating buffer (炭酸ナトリウム 15 mM, 炭酸水素ナトリウム 35 mM, pH9.6)
- 組換え JEECV LO4 タンパク質 (必要時には水産技術研究所にご相談ください。)
- TBS w/ 0.2% Tween 20 (TBST)
- Blocking solution (5% skim milk/TBS)
- 抗ウナギ IgM マウスモノクローナル抗体 (HRP 標識, 50%グリセロール)  
(必要時には水産技術研究所にご相談ください。)
- KPL TMB Peroxidase Substrate・ Peroxidase Substrate Solution B (LGC Clinical Diagnostics)
- Stop solution (1 M リン酸)
- マイクロプレートリーダー

方法

Day 0

1. ウナギの胸部を開き、心臓動脈球から採血。
2. 室温に 30 分間静置後、2,000 ×g で 10 分間遠沈し、血清を回収。
3. 1:1 でグリセロールと混合後、使用するまで-30°C冷凍保存。

Day 1

1. 組換え JEECV LO4 タンパク質を Coating bugger で希釈 (5 µg/mL)。
2. 希釈した組換えタンパク質 50 µL を ELISA プレートの各ウェルに分注 (750 ng/cm<sup>2</sup>) 。
3. 4°Cで一晩インキュベート。

Day 2

1. TBST 200 µL で各ウェルを洗浄。
2. Blocking solution 200 µL を各ウェルに添加し、室温で 1 時間インキュベート。
3. TBST 200 µL で 3 回洗浄。
4. 血清サンプルを TBST で 10 倍希釈し、各ウェル 50 µL 添加。室温で 1 時間インキ

- ュベート。
5. TBST 200  $\mu$ L で 3 回洗浄。
  6. モノクローナル抗体を TBST で 500 倍希釈し、各ウェル 50  $\mu$ L 添加。室温で 1 時間インキュベート。
  7. TBST 200  $\mu$ L で 3 回洗浄。
  8. TMB Peroxidase Substrate と Peroxidase Substrate Solution B を 1:1 で混合。
  9. 基質溶液を各ウェル 50  $\mu$ L 添加し、発色まで室温でインキュベート (10~20 分間)。
  10. Stop solution を各ウェル 50  $\mu$ L 添加。
  11. マイクロプレートリーダーで波長 450 nm の吸光度を測定。

## 2. 防除方法および被害軽減策

### 2.1 キャリア魚と健康魚の隔離飼育

養鰻場単位で見ると、単年養殖に比べて周年養殖の養鰻場でウイルス性血管内皮壊死症の発生報告が多く、また、周年養殖の養鰻場でも発生のないところと何年も続けて発生しているところに二極化している傾向が見られます。発生が多い周年養殖の養鰻場では、場内にウイルスのキャリアとなっている魚が常に存在し、新たに池入れされた健康魚にウイルスが伝播することが継続していると考えられます。ウイルス性血管内皮壊死症の発生歴のある養鰻場で長期間飼育された魚は、見た目が健康でもウイルスを保有しているかもしれないという認識を予め持つておくことが重要です。

選別・池替えのような、ウナギの移動を伴う作業は特に注意が必要です。分養によって複数の池のウナギが混ぜられた 1~2 週間後からウイルス性血管内皮壊死症による死亡が増加した例が確認できただけでも複数あります。症状のある群を他の群と混ぜることは感染を拡大させます。また、目立った症状や死亡が治まっても、感染歴のある群の池からは 1 年以上に亘ってウイルス DNA が検出された調査結果もあるため、このような魚を他の池の魚と混ぜることもできるだけ避けるべきです。JEECV はウナギ同士の直接の接触がなくても、飼育水を介して伝播します。キャリアとなっている可能性のある魚と新たに池入れした健康魚を隣接する池で飼育すると、飛び散った水などを介してウイルスが伝播してしまう可能性があります。可能な範囲で、物理的に距離を離して飼育する、作業の動線を分け、作業は養殖期間の短いウナギから順に行い、使う道具は池ごとに分けておく、といった対策がリスク低減に役立つと考えられます。出荷後の池も池干しを行うことを推奨します。池の状態によって池干しに必要な時間は変わりますが、一例では 3~4 週間の池干し後にウイルス DNA が検出されなくなりました。ハウス養鰻の場合、夏場は高水温が維持されることで病気の発生は抑えられますが、秋になって水温が下がってくるとウイルスの増殖適温になるため、この時期は特に注意が必要です。

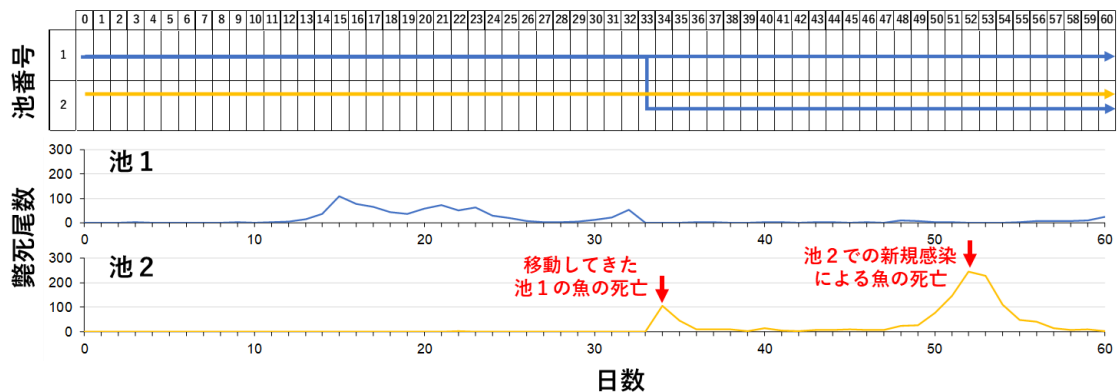


図4. 池替えと斃死尾数の関係

## 2.2 器具等の消毒

可能であれば使う道具は池ごとに分けておく方が感染リスクを低くすることができます。池間を移動する際には手指や長靴も消毒することを推奨します。実験条件では 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ウイルスを不活化できています (表 1)。実際に消毒を行う際には揮発・分解等により消毒剤が有効濃度を下回ることがないように注意が必要です。塩素消毒液は泥などの有機物に触れると効果が落ちるため、汚れはある程度落としてから消毒液に浸すようにします。JEECV による汚染が疑われる池で作業したあとには手指をエタノールで消毒する、ビニールハウスの前に踏み込み消毒槽を設置して出入りの際に長靴を塩素消毒する、使用後の網やカゴも塩素に浸けて消毒するといった

対策を日常的に行うことで感染リスクの低減効果が期待できます。特に死魚の回収作業を行った後には、他の池に移動する前に胴長等は消毒を行う

表 1. JEECV に対する消毒剤の効果

表中の数字は試験した 4 サンプル中ウイルスの増殖が観察されたサンプル数

処理時間 (分)	エタノール 濃度 (%)					次亜塩素酸ナトリウム 濃度 (ppm)					
	0	10	30	50	70	0	2	5	10	20	50
1	4	4	3	0	0	4	4	4	3	0	0
5	4	4	0	0	0	4	4	3	0	0	0
15	4	4	0	0	0	4	4	0	0	0	0
30	4	4	0	0	0	4	4	0	0	0	0

か、完全に着替えてしまう方が良いでしょう。

ウイルス性疾病に限った話ではありませんが、他の養鰻場などとカゴや網などを共有すると、病原体も共有してしまうリスクが生じます。共有元で大きな病気がないように見える場合でも、飼育条件の違いによって共有先では病原体が活性化し、疾病が発生する可能性があります。病気の予防のためには道具の共有はなるべく避け、もし他の養鰻場のウナギや飼育水と接触した可能性のあるカゴや器具、長靴等がある場合は、次に使う前に一度消毒することを推奨します。

### 2.3 病気が発生した場合の取り扱い

ウイルス性血管内皮壊死症に対して有効な薬剤は現状では分かっていません。死亡率は水温や給餌条件に大きく左右されるため、ウイルス性血管内皮壊死症が発生してしまった場合には昇温や餌止めが被害を減らすのに効果的です。死亡率は 30°C前後で最も高くなりますが、35°Cまで昇温することで感染魚の死亡を抑制することができ、感染魚から未感染魚へのウイルスの伝播も起きにくくなります。32~33°Cでは 35°Cほどの効果はありません。37°Cにまで達すると逆に高水温によるウナギへのダメージが大きいため、昇温しすぎにならないよう注意が必要です。給餌を行うと酸素要求量が増え、ウイルス感染によって鰓に障害を受けたウナギにとっては負担が大きくなります。これを避けるため、ウイルス性血管内皮壊死症による死亡が増えている場合には餌止めが推奨されます。ただし、パラコロ病等の細菌性疾病との合併症の場合は昇温処理によって斃死が増加することがあるため、注意が必要です。

病気が発生してしまった場合に特に重要なのは感染を他の魚・池に広げないことです。感染魚を健康魚の池に移したり、健康魚を感染魚の池に移したりすることは避ける必要があります。感染魚同士の場合は群を混ぜても JEECV 感染による斃死が増えるリスクは低いと考えられますが、分養作業自体のストレスの影響には注意が必要です。死魚の回収などの作業を行う際には、病気が起きていることが分かっている池は病気の起きていない池よりも後回しにするなど、順番を工夫することで池から池にウイルスが伝播するリスクを低減できます。感染魚を扱った後には、上にも書いたようにエタノールを用いた手指の消毒や塩素を用いた器具の消毒を行い、乾かしておくことが推奨されます。

### 参考文献

- 和田和彦 (1992) 鹿児島県における淡水養殖魚の疾病発生状況 ②ウナギの点状充血症、板状充血症、鰓うっ血症, 養殖, 29(10), 77-80
- 反町稔 (1994) 最新魚病対策 魚種別重要疾病の予防と治療 ウナギ, 養殖, 31(2), 121-123
- 小野信一・若林耕治・永井彰 (2007) 養殖ウナギのウイルス性血管内皮壊死症の原因ウイルスの分離, 魚病研究, 42(4), 191-200
- 田中眞・佐藤孝幸・馬文君・小野信一 (2008) ウナギの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
- 水谷哲也 他 (2011) Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, Virology, 412, 179-187
- 梅田剛佑 他 (2024) Experimental waterborne infection of Japanese eel endothelial cells-infecting virus (JEECV) and the effects of water temperature on infection, Fish Pathology, 59 (1), 1-8 (In press)

## 付録 被害リスク低減のためのチェックシート

ウイルス性血管内皮壊死症による被害リスクを低減するために日ごろから意識してほしい項目をリストアップしました。養鰻場ごとに実施可能な項目は違ってくると思いますが、現在の体制を一度確認してみましょう。特に、リスクが高くなる要因に多くチェックが付いた場合は、リスクを低くするための管理をより意識してみてください。

### リスクが高くなる要因

- 過去にウイルス性血管内皮壊死症が発生したことがある。
- 周年養殖を行っている（前年度のウナギと今年度のウナギを同時に飼育している）。
- 前年度のウナギと新たに池入れしたウナギを隣接する池で飼育している。
- 飼育水温は 30°C前後である。
- 複数の養鰻池で器具類を共有している。
- 分養の際、多少の死亡・症状がある群と他の群とを混ぜてしまう。

### リスクを低くするための管理

- ビニールハウスごと、池ごとに使う器具を分けている。
- 使用後の器具は塩素消毒している。
- 長靴の塩素消毒のため、踏み込み消毒槽を設置している。
- 塩素消毒槽の有効塩素濃度を確認している。
- 池間の移動の際、手指をエタノール消毒している。
- 作業の順番は養殖期間の短いウナギからにしている。
- 死魚の回収時に用いた胴長等は次の作業に移る前に履き替え、または消毒している。
- 分養の際、感染歴のある群とない群を混ぜることがないようにしている。
- 選別の際、別の池のウナギを扱う前には選別台、選別池を洗浄している。
- 出荷を終えた池は消毒や池干しを行っている。
- 新たに池入れしたウナギは出荷まで従前からいたウナギと隔離して養殖している。