

## ■研究課題名

### 最先端クルマエビ養殖技術の構築—安全・安心・健康なエビを作る

## ■研究の目的

日本のクルマエビ養殖はホワイトスポット病原因ウイルス（WSDV）の感染によって被害を受けており、特に、採卵用親エビとして天然から採捕したクルマエビがWSDVに感染していた場合、卵や稚エビへの垂直感染が確認されている。このため、病原ウイルスを持たない（ウイルスフリー）親エビの供給が、安全・安心・健康なクルマエビ生産に必要とされている。そこで、本課題では、飼育システム・飼料・診断法・ワクチンなどを開発し、これらの成果を結集することで、ウイルスフリー親エビの生産手法の確立を目的とする。

## ■研究項目・実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ①病原ウイルスフリー親エビの生産手法の確立  
（◎酒井正博／宮崎大学農学部）
- ②ウイルスフリークルマエビの生産を目的とした完全閉鎖循環式飼育システムの構築  
（鈴木祥広／宮崎大学工学部）
- ③親エビ育成飼料および性成熟促進飼料の開発とその評価  
（越塩俊介／鹿児島大学）
- ④エビ由来のプロバイオティクスを用いた新規バイオ飼料の開発  
（前田 稔／株式会社九州メディカル）



酒井正博

## ■研究の内容・主要な成果

- ①WSDVワクチンと迅速定量診断法の開発…WSDVに対するDNAワクチン、サブユニットワクチン（無細胞発現系利用）を開発し、WSDVの感染に対し極めて高い防御能をクルマエビに付与することに成功した。また、等温核酸増幅法を用いて、WSDV、イエローヘッド病ウイルス（YHV）、タウラ症候群ウイルス（TSV）および伝染性皮下造血管壊死症ウイルス（IHHNV）の迅速・高感度定量検出法の開発に成功した。
- ②完全閉鎖循環式飼育システムの構築…設置条件に適用させて、任意の規模のシステムを設計・構築し、クルマエビの長期間の連続飼育を実施できる技術を完成させた。
- ③育成・催熟用飼料の開発…ムラサキガイ、フコイダン、ビタミン類等の成長促進物質を添加した高品位育成飼料とゴカイ中性脂質、高度不飽和脂肪酸、ビタミン類を含有する催熟用配合飼料を開発した。
- ④新規バイオ飼料の開発…クルマエビから2,990株の消化管内細菌コレクションを構築した。この中から抗菌作用や免疫賦活作用などを有する菌株を選抜し、新規プロバイオティクスを開発した。

## ■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①WSDVワクチンならびに高感度定量検出法によって、クルマエビ養殖の最大の疾病問題であったWSDVによる被害は低減され、安定的生産・生産量の増加が見込まれる。
- ②エビ養殖産業における親エビ・種苗流通ルートの整備に加えて、実用化システムの構築および継続的に運転・維持管理できる技術力を備えた民間企業あるいは公的機関（部門）を創出することが予想される。
- ③開発した育成・催熟飼料は他のエビ類にも転用可能であり、アジアでの展開も考慮して低コスト化を図る。
- ④抗菌作用や免疫賦活作用などを有する微生物混合飼料を使用することで、親エビを含む養殖クルマエビの健全な生育に貢献できる。

## ■公表した主な特許・論文

- ①特願 PCT/JP2010/060503：甲殻類急性ウイルス血症に対するワクチン：宮崎大学
- ②Mekata, T., Kono, T. *et al.* Identification of cDNA encoding Toll receptor, MjToll gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 24, 122-133, 2008.
- ③Jean, F., Chakraborty, G. *et al.* Rapid detection of vibriosis in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* by loop-mediated isothermal amplification. *FEMS Microbiology Letter*, 288, 171-177, 2008.
- ④Mekata, T., Sudhakaran, R. *et al.* A novel gene of tumor necrosis factor ligand superfamily from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 28, 571-578, 2010.
- ⑤Inada, M., Mekata, T. *et al.* Molecular cloning and characterization of the nitric oxide synthase gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 28, 701-711, 2010.

研究成果の具体的図表

### ワクチンの開発 (宮崎大農)

①DNAワクチン (プラスミドDNA)      ②サブユニットワクチン (組換えタンパク質)

抗原を発現するプラスミドDNA      組換えタンパク質

ワクチン

開発したワクチン(DNA,サブユニット)は、ウイルス感染時の生残率を対照区と比べ、50%以上高めた(左グラフ)。さらに、ワクチンの接種によって、抗菌ペプチドなどの免疫関連遺伝子の発現が増強された。また、サブユニットワクチンは、注射法での投与に加え、飼料に混合する形で終口投与しても、その効果が発揮されることを確認した。

ウイルス人為感染試験によるワクチン効果の判定

ウイルス感染後日数 (日)	ワクチン接種区	対照区1	対照区2
0	100	100	100
5	100	100	100
10	100	100	100
15	100	100	100
20	100	100	100
25	100	100	100

### 迅速診断法の確立 (宮崎大農)

	本研究におけるLAMP法	従来のPCR法
検出時間	20分~1時間	約3時間
検出感度	従来のPCR法の10~100倍	-
反応温度	等温(60-65℃)	95℃→98℃→72℃
特異性	非常に高い	高い

●DNA,RNA抽出      ●サンプルの調整      ●遺伝子増幅

検出までの時間 約20~60分

従来のPCR法は、検出までに約3時間を要していたが、本研究では、60分以内の検出を可能にした。また、高い特異性と10<sup>2</sup>の微量な核酸を検出する高い感度を有しており、クルマエビの重要な病原性ウイルス4種類に対する、より迅速な高感度定量診断法を確立した。

### 泡沫分離プロセスを利用した完全閉鎖循環式飼育システム (宮崎大工)

任意の規模の構築し、ウイルスフリー環境でクルマエビの長期間の連続飼育が可能!

### プロバイオティクスの開発 ((株)九州メディカル)

抗菌活性  
*Bacillus amyloliquefaciens* D1768株

免疫賦活活性、成長促進  
*Lactococcus lactis* D1813株

クルマエビ消化管内細菌から、抗菌作用や免疫賦活作用などを有する菌株を選抜し、新規プロバイオティクスを開発した。

### 育成飼料および性成熟促進用飼料の開発 (鹿児島大水産)

ふ化率とふ化幼生数に及ぼすゴカイ抽出成分(中性脂質+トリクロ酢酸可溶成分)の効果

ゴカイ中性脂質成分の添加により成熟に要する日数が減少

ビタミンCとの添加によりふ化幼生の生残率が向上

### ウイルスフリー親エビからウイルスフリー卵を獲得

ムラサキイガイ、フコイダン、ビタミン類等の成長促進物質や機能性成分を添加した高品位育成飼料は、成長が速いだけでなく免疫応答も向上させることが確認された。

また、ゴカイ中性脂質、高度不飽和脂肪酸、ビタミン類等を配合することで、卵巣成熟を促進し、健康な幼生を作出可能な催熟用飼料を開発した。