

## 2015年3月OIE水生委員会報告書に対する日本のコメント

我が国は、水生動物委員会（水生委員会）に対し、その成された仕事及び水生動物衛生コード改正案にコメントを提出する機会を与えてくれたことに謝意を表します。

### 1. 急性肝臓壊死症（新規章）

#### 一般的なコメント

本マニュアルは意味を理解しにくい部分があり、マニュアル全体を見直すべきである。少なくとも、以下の指摘については対処すべきである。

#### 2.1.1. 病原体、病原体の分離

急性肝臓壊死症（AHPND）の病原体は細菌である (Tran, 2013a; 2013b; Zhang *et al.*, 2012)。VP<sub>AHPND</sub> と呼ばれる *Vibrio parahaemolyticus* の特定の病原性を示す株が本病を引き起こし、これは、固有の今までに報告がない、最長で 70 kbp の大きさの染色体外プラスミドを一つ又は複数持つ。

(Gomez-Gil *et al.*, 2014; Gomez-Jimenez *et al.*, 2014; Kondo *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014)。このプラスミドは **pVPA3-1 pVA1** であり、大きさは若干変わることがある。pVA1 を除去（キュアリング）すると *V. parahaemolyticus* の病原性株の AHPND を引き起こす能力が失われる。pVA1 を除去した株は、本病の初期に起こる病理組織学的な特徴である肝臓の小管の細胞を大量に脱落させることができない。 (Lee *et al.*, 2015)。

(略)

#### 理由

2つの記号「pVPA3-1」及び「pVA1」は同じプラスミドを指す。

#### 2.2.5. キャリアへの持続感染

**データなし第2.1.4項生活環を参照。**

#### 理由

第2.1.4項には「該当なし」と書かれている。

加えて、第2.1.4項は病原体となる細菌についての項であり、ここで参照する

ことは適当ではないと考えられる。

### 2.3.1. 伝播の仕組み

死亡は、ポストラバ (PL) や稚エビ (重さ: 15mg~1g) を池入れしてから 30 日以内に起こりうる。 (Nunan *et al.*, 2014; Leaña & Mohan, 2013; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b)。

実験感染では、1g 当たり  $VP_{AHPND}$  を  $10^8$  CFU (コロニー形成単位) 付着させた餌を経口接種させると 12 時間以内に死亡が起こる (Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b)。

また、接種する浸漬液が 1g 当たり  $10^8$  CFU/ml で始まる又はそれ以上の量を含む場合、死亡が起こる (Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b)。

#### 理由

修辞上の修正及び明確化

### 2.4.4. 耐病性育種

本病に耐病性を示す一つの AHPND-エビの系統がメキシコとエクアドルで作出されている。これは、SPF (特定の病原体に感染していないこと) よりもむしろ成長や生存がよい系統を、10 年かけて、集団選抜したことによりできた (Lightner, unpublished data)。

#### 理由

耐病性を有するものは、病原体ではなく宿主である。また、エビの種も特定すべきである。

### 3.3. サンプルのプール

分子学的な検査には、エビの頭胸部 (cephalothoracies) のサンプルを用いることができる (プールしたものが 0.5g 未満の場合)。

特に、0.5g 以下の PL 又は標本のサンプルはプールすることができる。これより大きなエビはプールせず、個別に取り扱うべきである (Lightner, 未発表)。

理由

修辞上の修正

#### 4.1.1. 外観症状

臨床症状は推定診断に用いることができる。推定診断は各個体レベルでは病理組織により確定することができるが、外観症状としては、結合組織被膜の色素の消失による肝臓の白化、肝臓の顕著な萎縮、内容物が不連続又はなくなることによる殻及び消化管の軟化、場合によっては肝臓の黒い点又は縞がみられ、また、軟化した肝臓が親指と人差し指で簡単に押しつぶせなくなり、る。臨床症状及び死亡の開始は池入れ後早ければ 10 日で始まる見られることがある (NACA, 2012; 2014)。

理由

修辞上の修正及び明確化

#### 4.2.2. 顕微鏡観察

(The Am) 急性期は、中央から背側の肝臓の小管が急性、重度及び進行性の変性を起こし、肝臓の小管の上皮細胞は、肝臓の小管、集合管及び細菌細胞がない場合は胃の中に、丸くなり脱落することが特徴である (is) (FAO, 2013; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013a; 2013b; 2014a; 2014b)。

末期は、肝臓の小管の細胞の壊死及び脱落に伴い、著しい管内への血球の浸潤や重度の細菌の二次感染の進行が特徴である (phase is) (FAO, 2013; Leño & Mohan, 2013; NACA, 2012; 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013a; 2013b; 2014a; 2014b)。

理由

修辞上の修正

4.2.5. 切片の固定 (ISH) :

*In-situ* ハイブリダイゼーションは、適切に使うと有効な手法である。ISH では、適切な染色液で宿主の組織を対比染色することにより、病原体となる細菌の存在をはっきりと観察できる。の結果は、ピスマルタブラウンで染色される物質が残ることで明らかとなる。これは、AHPND の組織と感染していない組織とを区別するために使われる。

理由

修辞上の修正及び明確化

4.3.1.2. 病原体の分離、同定

寒天培地や血清培地では、 $VP_{AHPND}$  の株はスウオーミングすることができる (Han *et al.*, 2015)。これにより、特に、 $PirB^{VP}$  は  $PirA^{VP}$  よりも強い毒素を産生するため、病エビやその他のサンプルから、細菌を分離するための標準培地により *V. parahaemolyticus* のうち毒素を産生する  $PirB^{VP}$  を分離することができる。 (Lee *et al.*, 2015; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015)。

*V. parahaemolyticus* であるかは、レクチン依存性の溶血素遺伝子を特定する PCR 法を使用することで確認でき (Taniguchi *et al.*, 1985)、AHPND を引き起こすであろう能力があるかは、第 4.3.1.2.3. 項に記載された PCR 法により確認できる。AHPND を引き起こすか確定するためには、この後、バイオアッセイを行わなくてはならない。

理由

$VP_{AHPND}$  が寒天培地でスウオーミングできるからといって、なぜ本菌を分離することが可能であるのか。読者が意味を理解できるよう、本項は、全体的に書き直すべきである。

#### 4.3.1.2.3.1. 培養物又は病エビから AHPND を引き起こす細菌を検出するための PCR のプロトコル

(略)

AP3 法及びその他のより最近発表された 45 つの方法は、AHPND *pirA<sup>VP</sup>* 遺伝子 (Pir<sup>VP</sup>A 法、VpPirA-284 及び TUMSAT-Vp3) 及び *pirB<sup>VP</sup>* 遺伝子 (Pir<sup>VP</sup>B 法 及び VpPirB-392) をターゲットとしているワンステップ PCR 法であるが、キャリアのようなもの及び堆積物や生物膜といった環境試料から AHPND を引き起こす細菌を検出するために用いた場合には、感度は比較的低い。このようなサンプルについては、経験上、これらの PCR 法ではキャリアのようなものから少ない数の細菌の細胞を十分に検出できるほどの感度がなく、また nested PCR のプロトコルを用いても非特異的なアンプリコンができるため成功しないことから、予め濃縮することが推奨される。

さらに、AP4 と呼ばれる two-tube nested PCR 法が開発されており、上記の AP3 の認証に使われたものと同じ 104 の分離された細菌を用いたところ、AHPND を引き起こす細菌の陽性検出率は 100% であった (www.enaca.org and manuscript in preparation に公表)。この方法は、非特異的なアンプリコンを生じず、AHPND を引き起こす細菌から抽出した DNA の最低は 1fg で検出する感度があり、組織や環境試料を濃縮することなく直接使うことができる。

#### 理由

修辭上の修正及び明確化

#### 4.3.1.2.3.1.2 病原体の精製

AHPND の原因病原体は、ビブリオ菌を分離する標準的な細菌の培地により、病エビ、キャリアのエビ又は環境試料から純粋培養したものより分離できる (Lightner, 1996; Tran *et al.*, 2013a; 2013b)。AHPND を引き起こすか確定するためには、純粋培養したものから分離した後、PCR 及び/又はバイオアッセイを行わなくてはならない。

~~API (AHPND プライマー セット 1)~~

~~APIF: 5' - CCT-TGG-GTG-TGC-TTA-GAG-GAT-G-3'~~

~~APIR: 5' - GCA-AAC-TAT-CGC-GCA-GAA-CAC-C-3'~~

AP1 アンプリコン シークエンス 700 bp (Lee <i>et al.</i> , 2015).
AP2 (AHPND プライマー セット 2)
AP2F: 5' -TCA-CCC-GAA-TGC-TCG-CTT-GTG-G-3'
AP2R: 5' -CGT-CGC-TAC-TGT-CTA-GCT-GAA-G-3'
AP2 アンプリコン シークエンス 700 bp (Lee <i>et al.</i> , 2015).

**理由**

プライマーAP1 及び AP2 を用いた PCR では AHPND を引き起こさない株を検出する可能性があるが (第 4.3.1.2.3.1.項)、ここでは、分離された細菌の本病を引き起こす能力が、これらのプライマーにより確認できるかのように書かれている。

4.3.1.2.3.1.4 AHPND 細菌をワンステップ PCR で検出するための PCR プライマー				
AP3、Pir <sup>VPA</sup> 、Pir <sup>VPB</sup> 、VpPirA 及び、VpPirB 及び TUMSAT-Vp3 の 5-6 つのワンステップ PCR 法が VP <sub>AHPND</sub> を検出するために開発されている (上記参照)。The AP3、Pir <sup>VPA</sup> 及び、VpPirA 及び TUMSAT-Vp3 法は <i>pirA<sup>VP</sup></i> 遺伝子をターゲットにしており、Pir <sup>VPB</sup> 及び VpPirB 法は <i>pir<sup>VPB</sup></i> 遺伝子をターゲットにしている。これらのプライマーは表 4.1 にそれぞれの予想されるアンプリコンの大きさと共に記載されている。				
<b>表 4.1. VP<sub>AHPND</sub> をワンステップ PCR で検出するための PCR プライマー</b>				
方法名	プライマー	ターゲット遺伝子	予想されるアンプリコンの大きさ	参考文献
AP3	AP3-F: 5' -ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3' AP3-R: 5' -GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA-GAA-3'	<i>pirA<sup>VP</sup></i>	333	Sirikharin <i>et al.</i> , 2014 Sirikharin <i>et al.</i> , 2015
Pir <sup>VPA</sup>	<i>Pir<sup>VPA</sup></i> F: 5' -ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-G-3' <i>Pir<sup>VPA</sup></i> R: 5' -TTA-GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA-G-3'	<i>pirA<sup>VP</sup></i>	336	Lee <i>et al.</i> , 2015

Pir <sup>VPB</sup>	<i>PirvpB</i> F: 5' -GAG-CCA-GAT-ATT-GAA-AAC-ATT-TGG-3' <i>PirvpB</i> R: 5' -CCA-CGC-AGC-GAG-TTC-TGT-AAT-GTA-3'	<i>pirB<sup>VP</sup></i>	438	Lee <i>et al.</i> , 2015,
VpPirA-284	VpPirA-284F: 5' -TGA-CTA-TTC-TCA-CGA-TTG-GAC-TG-3' VpPirA-284R: 5' -CAC-GAC-TAG-CGC-CAT-TGT-TA-3'	<i>pirA<sup>VP</sup></i>	284	KM067908 Han <i>et al.</i> , 2015
VpPirB-392	VpPirB-392F: 5' -TGA-TGA-AGT-GAT-GGG-TGC-TC-3' VpPirB-392R: 5' -TGT-AAG-CGC-CGT-TTA-ACT-CA-3'	<i>pirB<sup>VP</sup></i>	392	KM067908 Han <i>et al.</i> , 2015
TUMSAT-Vp3	TUMSAT-Vp3F: 5' -GTG-TTG-CAT-AAT-TTT-GTGC-A-3' TUMSAT-Vp3R: 5' -TTG-TAC-AGA-AAC-CAC-GAC-TA-3'	<i>pirA<sup>VP</sup></i>	360	Tinwongger <i>et al.</i> , 2014

**理由**

TUMSAT-Vp3 は AHPND の *pirA<sup>VP</sup>* 遺伝子をターゲットとしており、その特異度及び感度は表 4. 1. に記載されている他の 5 つのプライマーと同等である。

**5. 使用目的ごとの検査法の評価**

**コメント**

外観症状、病理組織及び透過電子顕微鏡による観察は、確定診断法として「a」（有効性、実用性並びに診断の特異度及び感度の点から推奨される診断法である）と評価されている。しかし、これらの方法は、確定診断法として明らかに不適切である。PCR もまた確定診断法として「a」と評価されているが、本マニュアルに記載されているいくつかの PCR 法は確定診断法として適切ではない。そのため、確定診断として推奨される PCR 法を指定すべきである。（例：表の脚注等）

**2. その他のコメント**

第 2. 2. 6 章「ホワイトスポット病」、第 2. 2. 7. 項「キャリアとわかっている又は疑いのある天然の水生動物」に対するコメント

「軟体動物」という単語は以下の文から削除すべきである：

「…と同様にその他の海産の軟体動物及び多毛類は (Vijayan *et al.*, 2005)、感染の根拠はないが本ウイルスを機械的に運ぶ可能性がある (Lo & Kou, 1998)。」

理由は、この文で参照されている 2 つの論文の中にも、軟体動物のベクターが存在することを裏付けるような根拠はないからである。Vijayan *et al.*

(2005) は、多毛類を本ウイルスのベクターとして、また Lo & Kou (1998) は甲殻類及びいくつかの節足動物をリザーバーとして報告しているのみであり、いずれの著者も軟体動物については言及していない。