

農林水産省委託事業

# 特定疾病診断マニュアル

平成 28 年 10 月



公益社団法人 日本水産資源保護協会



## 特定疾病診断マニュアル 目次表

疾病名	病性鑑定指針	病性鑑定資料
<b>魚類</b>	<b>3</b>	<b>113</b>
ウイルス性出血性敗血症(IVa型を除く。)(VHS)	5	115
サケ科魚類のアルファウイルス感染症 (SAV)	9	131
流行性造血器壊死症 (EHN)	13	135
ピシリケッチア症	19	147
レッドマウス病 (ERM)	23	155
旋回病	27	167
コイ春ウイルス血症 (SVC)	31	173
コイヘルペスウイルス病 (KHV)	37	185
マダイのグルゲア症	43	197
<b>甲殻類</b>	<b>47</b>	<b>199</b>
イエローヘッド病 (YHD)	49	201
壊死性肝臓炎 (NHP)	53	209
タウラ症候群 (TS)	57	215
伝染性皮下造血器壊死症 (IHHN)	61	223
急性肝すい臓壊死病 (AHPND)	65	229
伝染性筋壊死症 (IMN)	69	235
バキュロウイルス・ペナエイ感染症	73	243
エビの潜伏死病 (CMD)	77	249
鰓随伴ウイルス病 (GAV)	81	255
モノドン型バキュロウイルス感染症	85	261
<b>貝類等</b>	<b>89</b>	<b>267</b>
アワビヘルペスウイルス感染症	91	269
アワビの細菌性膿疱症	95	275
カキヘルペスウイルス $\mu$ Var 感染症	99	283
パーキンサス・クグワディ 感染症	103	289
マボヤの被囊軟化症	105	297



# 病性鑑定指針



# 1. 魚 類



ウイルス性出血性敗血症(IVa 型を除く。)  
 Viral haemorrhagic septicaemia (excluding Genotype IVa)(VHS)

担 当	検査チャート
都 道 府 県	<pre> graph TD     A["(1)疫学調査"] --- B["(2)臨床検査"]     A --- C["(3)剖検"]     B --- C     C --- D["(4)①(ア)培養細胞によるウイルス分離"]     C --- E["(4)①(ウ)臓器からの RT-PCR 検査"]     D --- F["(-)"]     D --- G["(+, ±)"]     G --- H["(4)①(イ)間接蛍光抗体法"]     H --- I["(-)"]     H --- J["(+, ±)"]     E --- K["(+, ±)"]     E --- L["(-)"]     </pre>
増 養 殖 研 究 所	<pre> graph TD     M["(4)②(ア)培養細胞によるウイルス分離"] --- N["(+)", "(-)"]     N --- O["(4)②(イ)間接蛍光抗体法および (4)②(ウ)遺伝子配列解析"]     O --- P["(+)", "(-)"]     </pre>
判 定	<p style="text-align: center;">-   -   +   -   -   -</p>
その他	<p>本疾病の診断は培養細胞によるウイルス分離を行うことが原則であるが、国内で遺伝子型 IVa が確認されていない魚種において、かつ臨床的に疾病を発症している場合においては(4)①(ウ)をもって初動診断とすることができる。</p>

# ウイルス性出血性敗血症 (IV a 型を除く。)

## Viral haemorrhagic septicaemia (excluding Genotype IVa)(VHS)

疾病名：ウイルス性出血性敗血症 (IV a 型を除く。)

Viral haemorrhagic septicaemia (excluding Genotype IVa)(VHS)

病原体：Viral hemorrhagic septicemia virus (ラブドウイルス科ノビラブドウイルス属)

### (1) 疫学調査 (遺伝子型 IVa を除く。)

① 宿主域：ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*)、ブラウントラウト (*Salmo trutta*)、タイセイヨウサケ (*S. salar*)、カワマス (*Salvelinus fontinalis*)、パイク、ターボット (*Scophthalmus aquosus*)、グリーンランドハリバット (*Reinhardtius hippoglossoides*)、マスキー、ブルーギル (*Lepomis macrochirus*)、コクチバス (*Micropterus dolomieu*) など 30 魚種以上から分離。

### ② 発生 (分離) 地域

Ia、Ib、Id、Ie、II 型；ヨーロッパ大陸及びその周辺海域

III 型；ヨーロッパ周辺海域及びフレミッシュ・キャップ (北大西洋カナダ沖)

IVb 型；北米五大湖

IVc 型；カナダ大西洋側の河口 (汽水) 域

(なお、I、Ic 型による疾病は近年確認されていない。)

③ 当該種苗は上記の地域から輸入した、またはその種苗と接触した可能性がある。

④ 当該養殖場は過去に上記地域から種苗を導入したことがある。

⑤ 若齢魚ほど顕性感染を受けやすい。

⑥ 冬から春にかけての水温 7 ~ 15℃ の時期に発生しやすい。

### (2) 臨床検査

① 体色が黒化する。

② 眼球の突出や腹部の膨満がみられる。

③ 眼球、体表、鰓、鰭基部に出血がみられる。

④ 貧血症状がみられる。

### (3) 剖検所見

① 腹膜、腸管膜、内臓脂肪組織に広範囲の出血が観察される。

② 腎臓および肝臓に充血、腫脹、褪色がみられる。

③ 骨格筋に点状出血がみられる。

### (4) 診断法

① 初動診断法：(ア) ウイルス分離

使用細胞；FHM 細胞または BF-2 細胞

接種材料；疾病の盛期では腎臓、脾臓又は卵巣漿液が適しているが、終息期に

はこれらに心臓又は脳を加えたほうが望ましい。

培養方法；15℃前後で7から10日間培養。

成績；球形化を特徴とするCPEを確認する。

(イ) 間接蛍光抗体法

(4) ① (ア) で分離されたウイルス培養液を新たに準備したFHM細胞またはBF-2細胞に接種し、そのウイルス感染細胞をVHSウイルス特異抗体(IP5B11(OIE)) および遺伝子型IVa VHSウイルス特異抗体(VHS-10(Ito et al., 2010, 2012)) を用いて蛍光染色させ、これらの反応性の組み合わせにより、遺伝子型IVaがそれ以外の遺伝子型であるか判定する。すなわち、同定すべき試料がIP5B11 およびVHS-10抗体に対し陽性である場合、遺伝子IVa型のVHSウイルス(日本既存のVHSウイルス)と判定され陰性となる。一方、IP5B11抗体に対し陽性で、VHS-10抗体に対し陰性である場合、その試料は遺伝子IVa型以外のVHSウイルス(特定疾病対象VHSウイルス)と判定され、陽性となる。

(ウ) RT-PCR 検査(逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法：キット使用)

材料；腎臓、脾臓、心臓、脳もしくは卵巣漿液からの抽出RNA。

プライマー；

Forward primer：5'-GGG-GAC-CCC-AGA-CTG-T-3'

Reverse primer：5'-TCT-CTG-TCA-CCT-TGA-TCC-3'

逆転写反応；50℃で30分間反応後、94℃で2分間処理。

PCR反応；94℃で30秒間、52℃で30秒間、68℃で1分間を35サイクル、最後に68℃で7分間。

増幅産物サイズ；811bp

② 最終診断法：

(ア) ウイルス分離

初動診断法と同じ。

(イ) 間接蛍光抗体法

初動診断法と同じ。

(ウ) 遺伝子配列解析

材料；分離ウイルス培養上清または腎臓、脾臓、心臓、脳もしくは卵巣漿液からの抽出RNA。

方法及び判定；RT-PCRによりVHSウイルスのG-遺伝子を増幅後、全G-遺伝子の配列を解析し、データベースに登録されているVHSウイルスのG-遺伝子の塩基配列を参考に、遺伝子型を判定する。

(5) 病理組織学的所見

- ① 腎臓の泌尿系と造血組織に壊死が認められる。
- ② 肝臓、脾臓、膵臓に壊死が認められる。

## (6) 類似疾病検査

臨床検査では既存の遺伝子型 IVa による VHS とそれ以外の遺伝子型による VHS を区別することは難しいことから、剖検の次段階検査として培養細胞によるウイルス分離検査に続く VHS ウイルス特異抗体および遺伝子型 IVa VHS ウイルス特異抗体による検査の実施が望ましい。なお、検出感度の観点から「(4) ① (イ) 間接蛍光抗体法」に用いる試料は「(4) ① (ア) 培養細胞によるウイルス分離」で分離されたウイルス培養液を用いることが望ましいが、疾病の発生状況等によって迅速な診断が必要である場合には「(4) ① (ア) 培養細胞によるウイルス分離」に用いた試料 (臓器磨砕液等) を用いても暫定的な一次診断を実施することが出来る。

## (7) 消毒

- ① 30% プロパノールで 30 秒間の消毒 (PBS(-))、20% プロパノールで 2 分間の消毒 (人工海水)
- ② 2.5% フェノールで 5 分間の消毒 (PBS(-)、人工海水)
- ③ 0.1% クレゾールで 5 分間の消毒 (PBS(-))、0.25% クレゾールで 15 分間の消毒 (人工海水)

## (8) その他

- ① サーベイランスのように症状が明らかでない魚の検査を行う場合には、培養細胞によるウイルス分離を行う必要がある。
- ② 検出感度の観点から (4) ① (イ) に用いる試料は (4) ① (ア) で分離されたウイルスを新たに蛍光抗体検査用の培養細胞に接種することが望ましいが、迅速な診断が必要である場合には、直接 (4) ① (ア) の細胞を用いて蛍光抗体法により初動診断を実施することが出来る。
- ③ 一次診断の間接蛍光抗体法の結果が曖昧な場合は、最終診断において培養細胞によるウイルス分離を再度試みる (4) ② (ア) 培養細胞によるウイルス分離)。その結果、明らかな CPE が観察されなくとも 4) ② (イ) 及び (ウ) の検査を行う。



## サケ科魚類のアルファウイルス感染症 Infection with salmonid alphavirus

疾病名：サケ科魚類のアルファウイルス感染症

Infection with salmonid alphavirus

病原体：Salmonid alphavirus (トガウイルス科アルファウイルス属)

### (1) 疫学調査

- ① 宿主域：タイセイヨウサケ (*Salmo salar*)、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*)、ブラウトラウト (*S. trutta*) (人為感染)  
\*幼魚から成魚まで全ての成育段階で罹患する。
- ② 発生地域：ヨーロッパ諸国
- ③ キャリア：天然海域の異体類。
- ④ ベクター：サケジラミ (*Lepeophtheirus salmonis*)
- ⑤ 発症水温は 8 ~ 15℃。8℃以下でも慢性的に発生する。

### (2) 臨床検査

- ① 食欲不振が認められる。
- ② 遊泳力の減少が認められる。
- ③ 皮膚のすれや潰瘍が認められる。
- ④ 生残魚の成長不良が認められることもある。

### (3) 剖検所見

- ① 摂餌不良魚で消化管に黄色い粘液状の内容物が認められる。
- ② 幽門垂の点状出血が認められる。
- ③ 脾臓の発赤が認められる。

### (4) 診断法

- ① 初動診断法：RT-PCR 検査

材料；心臓あるいは腎臓の抽出 RNA。

プライマー；

E2F：5'-CCG-TTG-CGG-CCA-CAC-TGG-ATG-3'

E2R：5'-CCT-CAT-AGG-TGA-TCG-ACG-GCA-G-3'

増幅産物サイズ；516 bp

PCR 反応；55℃で 30 分の逆転写反応後、95℃で 2 分変性。その後、94℃で 15 秒、60℃で 30 秒、72℃で 50 秒を 40 サイクル行い、最後に 72℃で 2 分間。

② 最終診断法：

(ア) RT-PCR 検査

① 初動診断法と同じ。

(イ) 遺伝子配列解析

材料；② (ア) の PCR 増幅産物。

判定；データベースに登録されている SAV の E2 タンパク質遺伝子の部分配列と高いレベルで相同性を示すことを確認する。

(5) 病理組織学的所見

- ① 膵臓分泌腺組織の激しい変性 (急性) が認められる。
- ② 膵臓分泌腺組織の消失および分泌腺周囲の組織の繊維化 (慢性) が認められる。
- ③ 心筋細胞の核濃縮と細胞質の強エオシン好性を示す感染細胞の萎縮による心筋壊死が認められる。
- ④ 心臓全体に広がる心室・心房筋肉のスポンジ化が認められる。
- ⑤ 体側筋の硝子変性、筋形質のエオシン好性の断片化が認められる。
- ⑥ 腎臓間質組織のエオジン好性が認められる。

(6) 類似疾病検査

情報なし。

(7) 消毒

市販の塩素系消毒剤 (ペルオキソー硫酸カリウム配合剤) において、0.5% 濃度、10℃、5 分間の処理で不活化されるという報告がある。

(8) その他

ウイルス分離には CHSE-214 細胞を用いるが、ウイルス株によっては CPE が確認できず、盲継代を続けることで CPE が出現する場合もある。



流行性造血器壊死症  
Epizootic haematopoietic necrosis(EHN)

担 当	検査チャート
都 道 府 県	
増 養 殖 研 究 所	
判 定	<p style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 40px;">-</span> <span style="margin-right: 40px;">-</span> <span style="margin-right: 40px;">+</span> <span style="margin-right: 40px;">-</span> <span style="margin-right: 40px;">-</span> </p>
その他	<p>検出感度の観点から、「(3)剖検」の次段階の検査として「(4)①(ア)培養細胞によるウイルス分離検査」の実施が望ましいが、臨床的に発症している魚を迅速に診断する必要がある場合は「(4)①(ウ)臓器からの PCR-REA 検査」を選択する。</p>

## 流行性造血器壊死症 Epizootic haematopoietic necrosis(EHN)

疾病名：流行性造血器壊死症

Epizootic haematopoietic necrosis(EHN)

病原体：Infectious hematopoietic necrosis virus (イリドウイルス科ラナウイルス属)

### (1) 疫学調査

- ① 宿主域：レッドフィンパーチ (*Perca fluviatilis*)、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) で自然発病が知られているが、実験的にはシルバーパーチ (*Bidyanus bidyanus*)、タイセイヨウサケ (*Salmo salar*) なども感受性を示す。
- ② 発生地域：オーストラリア
- ③ 当該種苗は上記の地域から輸入したものである。
- ④ 当該養殖場は過去に上記地域から種苗を導入したことがある。
- ⑤ レッドフィンパーチは幼魚から成魚まで重篤に感染するが、ニジマスは抵抗性が高いため若年魚のみ感染する。
- ⑥ 発病水温は 11 ~ 17℃であるが、レッドフィンパーチでは 12℃以下では発病しない。

### (2) 臨床検査

・レッドフィンパーチ

- ① 運動失調、呼吸回数の低下が認められる。
- ② 成魚では脳及び外鼻孔周囲の発赤が顕著である。
- ③ 稚魚では尾柄部筋肉の白化が認められる。
- ④ 鰭 (特に臀鰭) 基部に点状出血が認められる。
- ⑤ 鰓のうっ血が認められる。

・ニジマス

- ① 運動失調、体色の黒化、食欲低下が顕著に認められる。
- ② 躯幹後半部の皮膚に潰瘍が認められる。
- ③ 0+魚では軽度の腹部膨満や肛門突出が認められる。

### (3) 剖検所見

・レッドフィンパーチ

- ① 成魚では肝臓に直径 1 ~ 3 mm の白点が認められるが、稚魚では識別が困難である。
- ② 脾臓の褪色、腫大が認められ、稚魚ではゼラチン状化していることも多い。
- ③ 腹膜下域 (鰓、特に腎臓周囲) に広範囲の充血が認められる。

・ニジマス

- ① 腎臓の腫大や表面が凹凸状を呈する隆起性病変が認められる。
- ② 脾臓の腫大、褪色が認められる。

#### (4) 診断法

##### ① 初動診断法：

###### (ア) ウイルス分離

使用細胞；BF - 2 細胞

接種材料；腎臓等の組織磨砕液。

培養方法；22℃、14 日間

成績；散在する球形化細胞を特徴とする CPE を確認する。

###### (イ)、(ウ)PCR - REA 検査

###### ・PCR 反応

材料；肝臓、腎臓もしくは脾臓又は分離ウイルス培養上清からの抽出 DNA。

プライマー；MCP - 1 セット

M151：5'-AAC-CCG-GCT-TTC-GGG-CAG-CA-3'

M152：5'-CGG-GGC-GGG-GTT-GAT-GAG-AT-3'

増幅産物サイズ；321bp

反応；最初に 94℃で 3 分間、その後 94℃で 30 秒間、50℃で 3 秒間、72℃で 1 分間を 35 サイクル、最後に 72℃で 5 分間。

###### ・REA 反応

材料；上記 PCR 増幅産物

制限酵素；Pfl MI

反応；添付バッファーを用いて 37℃、2 時間。

判定；OIE 診断マニュアルにある切断パターンと一致することを確認する。

##### ② 最終診断法：

###### (ア) ウイルス分離

初動診断法と同じ

###### (イ)PCR - REA 検査

###### ・PCR 反応

材料；分離ウイルス培養上清からの抽出 DNA。

プライマー；MCP - 2 セット

M153：5'-ATG-AAC-GTC-GCC-CTC-ATC-AC-3'

M154：5'-CCA-TCG-AGC-CGT-TCA-TGA-TG-3'

増幅産物サイズ；625bp

反応；最初に 94℃で 3 分間、その後 94℃で 30 秒間、50℃で 30 秒間、72℃で 1 分間を 35 サイクル、最後に 72℃で 5 分間。

###### ・REA 反応

材料；上記 PCR 増幅産物

制限酵素；Hinc II、Acc I、Fnu 4H I

反応；添付バッファーを用いて 37℃、2 時間。

判定；OIE 診断マニュアルにある各制限酵素による切断パターンと一致することを確認する。

### (ウ)PCR－遺伝子配列解析

#### ・PCR 反応

材料；分離ウイルス培養上清からの抽出 DNA。

プライマー；

Forward primer：5'-CGC-AGT-CAA-GGC-CTT-GAT-GT-3'

Reverse primer：5'-AAA-GAC-CCG-TTT-TGC-AGC-AGC-AAA-C-3'

増幅産物サイズ：580bp

反応；95℃で1分間、55℃で1分間、72℃で1分を35サイクル、最後に72℃で15分間。

#### ・遺伝子配列解析

材料；上記 PCR 増幅産物

判定；データベースに登録されている EHNV の MCP 遺伝子塩基配列との相同性を確認する。

### (5) 病理組織学的所見

#### ・レッドフィンパーチ

- ① 腎臓の造血組織に壊死が認められ、特に前腎で顕著である。
- ② 肝臓の細動脈や静脈に沿って壊死巣が認められ、その周辺の肝細胞に空胞や好塩基性の封入体が認められる。
- ③ 脾臓の壊死病変の程度は様々である。
- ④ 白化した骨格筋には、軽い筋原繊維間浮腫が認められる。

#### ・ニジマス

- ① 腎臓造血組織に壊死が認められる。
- ② 肝臓の細動脈や静脈に沿って壊死巣が認められ、その周辺の肝細胞に好塩基性の球状の封入体が認められる。
- ③ 脾臓の壊死病変の程度は様々である。
- ④ 胃腸上皮に壊死巣が認められる。

### (6) 類似疾病検査

EHN はニジマスの伝染性造血器壊死症 (IHN) と体色の黒化や鰭基部の点状出血等の症状が類似するが、EHN では眼球突出、腹部膨満、腹水の貯留などの症状は認められない。類似疾病との判別が困難な場合もあることから、剖検の次段階の検査として培養細胞によるウイルス分離検査の実施が望ましいが、疾病の発生状況等によって迅速な診断が必要である場合には、臓器からの PCR 検査を選択する。

### (7) 消毒

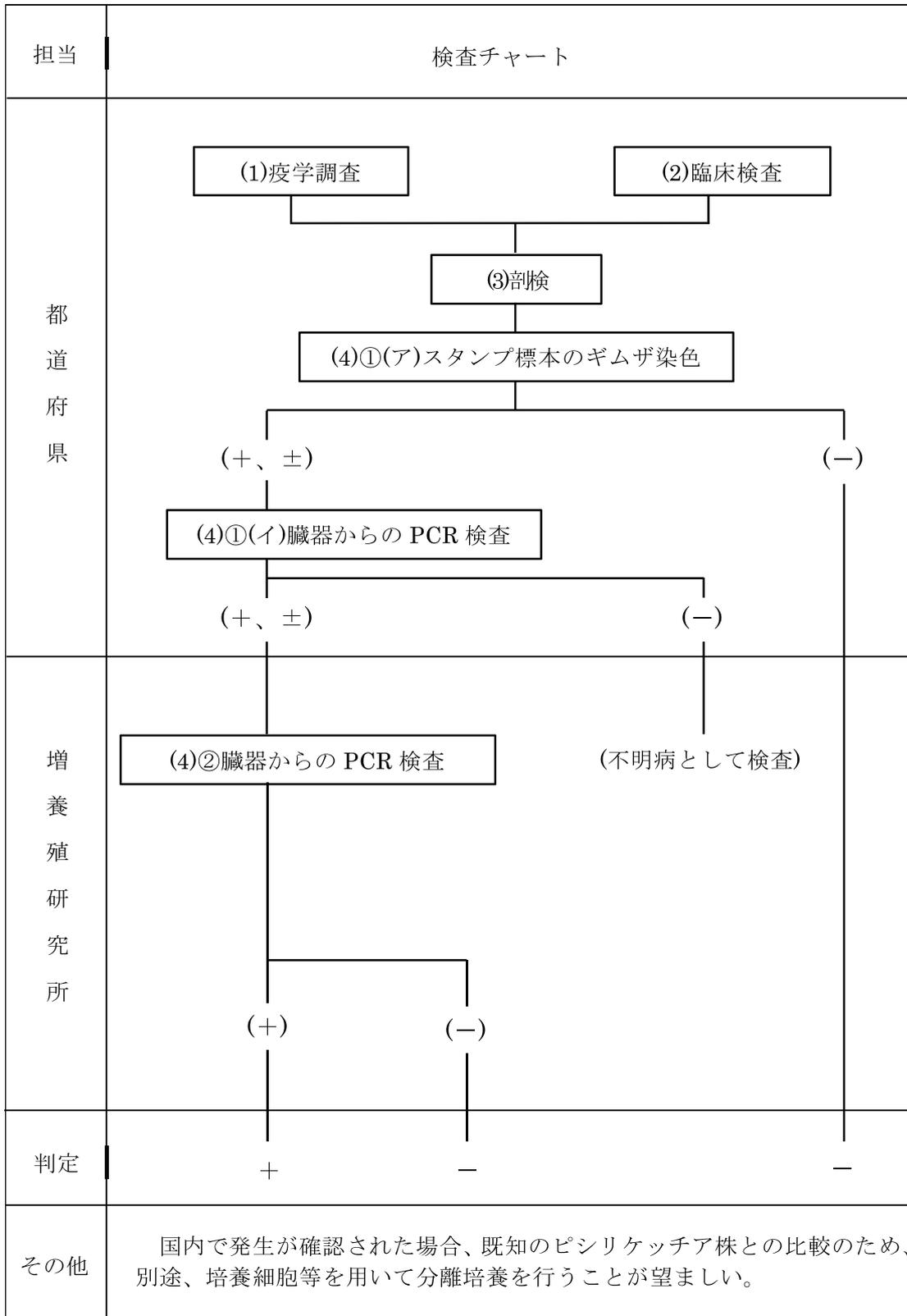
使用器具及び手指の消毒は、通常のウイルスを対象とした消毒法を用いる。

### (8) その他

- 
- ① 本疾病の検査において病原体量が少ない場合には PCR より培養細胞による分離のほうが、感度が高い。したがってサーベイランスのように症状が明らかでない魚の検査を行う場合には、培養細胞によるウイルス分離を行う必要がある。
  - ② 最終診断の(4)②(ア)培養細胞によるウイルス分離において明らかな CPE が観察されなくとも(4)②(イ)ないし(ウ)の検査を行う。



ピシリケッチア症  
Piscirickettsiosis



# ピシリケッチア症 Piscirickettsiosis

疾病名：ピシリケッチア症

Piscirickettsiosis

病原体：*Piscirickettsia salmoniis* (ピシリケッチア科ピシリケッチア属)

## (1) 疫学調査

- ① 宿主域：ギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*)、マスノスケ (*O. tshawytscha*)、タイセイヨウサケ (*Salmo salar*)、ニジマス (*O. mykiss*) などのサケ科魚類に感染するが、なかでもギンザケが最も感受性が高い。サケ科以外では、ヨーロッパシーバス (*Dicentrarchus labrax*) からの分離報告がある。
- ② 発生地域：チリ、ノルウェー、アイルランド、スコットランド、カナダ太平洋・大西洋沿岸、アメリカ太平洋側 (シーバス)
- ③ 当該種苗は上記の地域から輸入したものである。
- ④ 当該養殖場は過去に上記地域から種苗を導入したことがある。
- ⑤ 海面養殖中に発生するが、まれに淡水飼育中の発生例もある。

## (2) 臨床検査

- ① 体表に白色病巣あるいは浅い出血性潰瘍が認められる。
- ② 体表が黒化し、遊泳が緩慢になる。

## (3) 剖検所見

- ① 肝臓表面皮下の黄白色の病巣が特徴的症状であるが、瀕死魚であっても本症状がみられる個体は少ない (5 ~ 10%)。
- ② 鰓の褪色、腹膜炎、腹水の貯留が認められる。
- ③ 脾臓の軽度の腫脹、腎臓の褪色と腫脹が認められる。

## (4) 診断法

### ① 初動診断法：

#### (ア) ギムザ染色

肝臓および腎臓スタンプ標本のギムザ染色により宿主細胞内の菌を確認する。

#### (イ) PCR 検査

材料；(ア)において細菌が多く観察された組織の抽出 DNA。

プライマー；

PSAL-F：5'-AGA-CCT-GAG-GGT-TAA-AGA-GGG-C -3'

PSAL-R：5'-TCT-CAG-GTT-CGC-TCC-ACA-TC-3'

増幅産物サイズ；1108bp

反応；最初に 94℃で 3分、続いて 94℃で 30秒、65℃で 20秒、

72℃で1分30秒を38サイクル行い、最後に72℃で5分。

② 最終診断法：PCR 検査

初動診断法のPCR検査に加えて、次のPCRも実施

材料；(ア)において細菌が多く観察された組織の抽出DNA。

プライマー；

RTS1：5'-TGA-TTT-TAT-TGT-TTA-GTG-AGA-ATG-A -3'

RTS4：5'-ATG-CAC-TTA-TTC-ACT-TGA-TCA-TA-3'

増幅産物サイズ；283bp

反応；最初に94℃で2分間、続いて94℃で30秒間、50℃で30秒間、72℃で30秒間を39サイクル、最後に72℃で7分間。

(5) 病理組織学的所見

様々な臓器の細胞質内に原因菌が存在する。

(6) 類似疾病検査

細菌性腎臓病 (BKD) との混合感染がしばしばみられる。ギムザ染色による菌の形態の観察又はPCR検査でBKDとの識別が可能である。

(7) 消毒

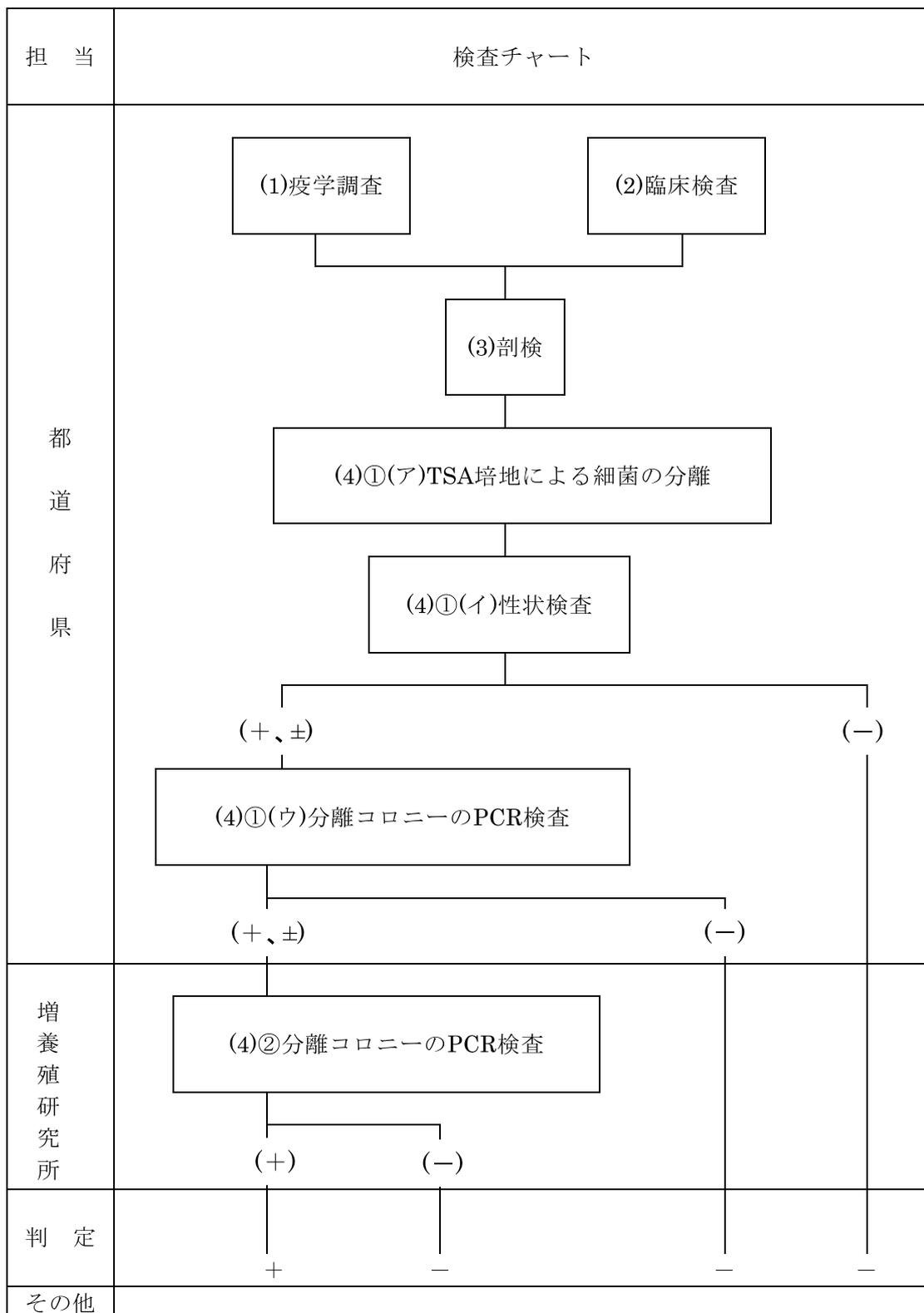
施設・器具及び手指の消毒は通常細菌を対象にした消毒法を用いる(例：ヨード剤、塩素製剤、アルコール、逆性石鹼等)。

(8) その他

国内で発生した株と既知のピシリケッチア株の比較のため、別途、培養細胞を用いて分離培養を行うことが望ましい。



レッドマウス病  
Enteric redmouth disease



(注：性状検査は、グラム染色とチトクロームオキシダーゼ試験を行う。)

# レッドマウス病

## Enteric redmouth disease

疾病名：レッドマウス病

Enteric redmouth disease

病原体：*Yersinia ruckeri* (腸内細菌科エルシニア属)

### (1) 疫学調査

- ① 宿主域：ほとんど全てのサケ科魚類が感染するが、なかでもニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) での発生、被害が多い。サケ科魚類以外では、ニホンウナギ (*Anguilla japonica*)、キンギョ (*Carassius auratus*)、コイ (*Cyprinus carpio*)、オオクチバス (*Micropterus salmoides*)、アムールチョウザメ (*Acipenser schrencki*)、シベリアチョウザメ (*Acipenser baerii*)、ナマズ (*Ictalurus punctatus*)、パーチ (*Perca fluviatilis*) などからも分離される。
- ② 発生地域：アメリカ合衆国、カナダ、チリ、ベネズエラ、ヨーロッパ諸国、イラン、南アフリカ、オーストラリア、ニュージーランド、トルコ、日本 (日本では、2015年に種苗生産施設で1度確認されたのみ。)
- ③ 当該種苗は上記の地域から輸入したものである。
- ④ 当該養殖場は過去に上記地域から種苗を導入したことがある。
- ⑤ 春から夏の水温上昇期に、稚魚に発生しやすい。

### (2) 臨床検査

- ① 緩慢な遊泳、体色の黒化が認められる。
- ② 口吻部、口腔内、下顎及び鰭基部が赤変(皮下出血)する。

### (3) 剖検所見

- ① 肝臓、脂肪組織、腸間膜、腸後部などに出血が認められる。
- ② 脾臓の腫大が認められる。
- ③ 腸管後部又は排泄物に黄色粘液物が認められる。

### (4) 診断法

- ① 初動診断法：
  - (ア) TSA培地により22-25℃好気培養で菌分離を行う。通常2-3日以内に円形・乳白色半透明・表面平滑・辺縁平滑・色素非産性のコロニーが形成される。
  - (イ) 性状試験によりグラム陰性、チトクロームオキシダーゼ陰性を確認する。
  - (ウ) 分離コロニーのPCR検査

材料；菌体の抽出DNA。

プライマー；

YER3：5'-CGA-GGA-GGA-AGG-GTT-AAG-T-3'

YER4 : 5'-AAG-GCA-CCA-AGG-CAT-CTC-T-3'

増幅産物サイズ ; 588bp

反応 ; 最初に 94℃ で 5 分間、続いて 94℃ で 40 秒間、60℃ で 40 秒間、72℃ で 1 分間を 30 サイクル、最後に 72℃ で 5 分間。

② 最終診断法 : 分離コロニーの PCR 検査

材料 ; 菌体の抽出 DNA。

プライマー ;

ruck1 : 5'-CAG-CGG-AAA-GTA-GCT-TG-3'

ruck2 : 5'-TGT-TCA-GTG-CTA-TTA-ACA-CTT-AA-3'

増幅産物サイズ ; 409bp

反応 ; 最初に 94℃ で 5 分間、続いて 94℃ で 30 秒間、55℃ で 30 秒間、72℃ で 1 分間を 35 サイクル、最後に 72℃ で 5 分間。

(5) 病理組織学的所見

腎臓、脾臓、肝臓に多数の単桿菌が認められる。

(6) 類似疾病検査

ビブリオ病及びせっそう病とは体色の黒化、鰭基部赤変、腸管の出血、脾臓腫大などの症状が類似するが、原因菌はチトクローム・オキシダーゼ試験あるいは PCR 検査により区別できる。

(7) 消毒

施設・器具及び手指の消毒は通常細菌を対象にした消毒法を用いる (例 : ヨード剤、塩素製剤、アルコール、逆性石鹼等)。

(8) その他

なし。



旋回病  
Whirling Disease

担当	検査チャート
都道府県	<pre> graph TD     A["(1)疫学調査"] --- B["(2)臨床検査"]     A --- C["(3)剖検"]     B --- C     C --- D["(4)①(ア)酵素消化軟骨の観察"]     C --- E["(4)①(イ)PCR"]     D --- F["(-)"]     D --- G["(+、±)"]     E --- H["(+、±)"]     E --- I["(-)"]     </pre>
増養殖研究所	<pre> graph TD     D --- J["(4)②(ア)病理組織検査"]     E --- K["(4)②(イ)Nested-PCR"]     J --- L["(-)"]     J --- M["(+)"]     K --- N["(+)"]     K --- O["(-)"]     </pre>
判定	<p style="text-align: center;">-      -                      +                      +                      -                      -</p>
その他	<p>初動診断法は酵素消化軟骨の観察あるいは PCR のいずれかを行う。 最終診断法は病理組織検査あるいは Nested-PCR のいずれかを行う。</p>

# 旋回病 Whirling Disease

疾病名：旋回病

Whirling Disease

病原体：*Mixobolus cerebralis* (刺胞動物門、粘液胞子虫綱、双殻目、ミクソボルス科、ミクソボルス属)

## (1) 疫学調査

- ① 宿主域：多くのサケ科魚類が宿主となるが、ブラントラウト (*Salmo trutta*) は比較的感受性が低い。
- ② 発生地域：ヨーロッパ諸国、ロシア、南北アメリカ (ただしカナダからは未報告)
- ③ 交互宿主であるイトミミズ (*Tubifex tubifex*) がいないと病原体は定着できない。

## (2) 臨床検査

- ① 骨曲がり、あるいは体躯幹部の湾曲が認められる。
- ② 尾柄部の黒化が認められる。
- ③ 旋回遊泳が認められる。

## (3) 剖検所見

特徴的な剖検所見は報告されていない。

## (4) 診断法

### ① 初動診断法：

#### (ア) 酵素消化軟骨の観察

使用部位；新鮮な頭部組織 (大型魚では一部のみを用いることも可) を組織が軟化するまで 45℃のウォーターバス中で処理してから軟骨を採取する。

ペプシン消化；0.5% ペプシン液で 37℃で pH4 以下に保ちつつ攪拌しながら骨組織が砂粒程度になるまで消化 (数時間～一晩) し、1200g で 10 分間遠心してペレットを得る。

トリプシン消化；上記ペレットを 0.5% トリプシン-PBS(pH8.5) で攪拌しつつ室温で 30 分間消化、ろ過後、液体を 1200g で 10 分間遠心してペレットを得る。凍結保存されていた魚から採取した組織の場合はトリプシン濃度を 0.05% とする。

デキストロース (D-グルコース) による遠心濃縮；旋回病の疑いが濃いのに胞子が検出されない場合や、組織残渣が多く検鏡が困難な場合に行う。凍結サンプルでは行わない。遠心管に 55% デキストロースを 5cm の深さに入れ、その上に 1mlPBS に懸濁したトリプシン消化ペレットを重層し、1200g で 30 分間遠心してペレットを得る。

胞子の観察;上記ペレットを 10 倍量の PBS に懸濁し、スライドグラス上でウェットマウントあるいは血球計算盤等を用いて胞子を観察する。クリスタルバイオレットなどで簡単に染色してから観察してもよい。

#### (イ)PCR

材料; PCR 用に採取した頭部軟骨組織あるいは (4) ① (ア) で作製した酵素消化軟骨サンプル。

プライマー;

Tr5-16: 5' -GCA-TTG-GTT-TAC-GCT-GAT-GTA-GCG-A-3'

Tr3-16: 5' -GAA-TCG-CCG-AAA-CAA-TCA-TCG-AGC-TA-3'

増幅産物サイズ; 1300bp

反応; 95℃で 5 分変性。その後、95℃で 1 分、65℃で 2 分 30 秒、72℃で 1 分 30 秒を 35 サイクル行い、最後に 72℃で 10 分間。

#### ② 最終診断法:

##### (ア) 病理組織検査

材料; 鰓及び頭蓋底部を含む頭部の Davidson 液固定標本。大型魚では部位別に固定する。

組織標本作製; 必要に応じて脱灰し、定法どおりパラフィンに包埋して切片を作製する。ヘマトキシリン・エオジンあるいはメイグリュンワルドーギムザ染色を施して検鏡し、(5)の所見を確認する。

##### (イ)Nested-PCR 法

i) 1st PCR; 初動診断法①(イ)と同じ。

ii) 2nd PCR

材料; (4) ②(イ)i) 1st PCR の増幅産物。

プライマー;

Tr5-17: 5' -GCC-CTA-TTA-ACT-AGT-TGG-TAG-TAT-AGA-AGC-3'

Tr3-17: 5' -GGC-ACA-CTA-CTC-CAA-CAC-TGA-ATT-TG-3'

増幅産物サイズ; 415bp

反応; (4) ②(ア)i) 1st PCR と同じ。

#### (5) 病理組織学的所見

形態的に *Myxobolus cerebralis* のものと考えて矛盾しない粘液胞子虫の胞子が軟骨組織内に観察される。

#### (6) 類似疾病検査

サケ科魚類に感染する *Myxobolus* 属の粘液胞子虫は *M. cerebralis* 以外にも複数存在し、胞子の形態のみでは同定が困難である。しかし、軟骨内で増殖するのは *M. cerebralis* 以外に報告されていない。

#### (7) 消毒

① 土や有機物の洗浄・除去。

- 
- ② 90℃以上の温度で 10 分間の処理。
  - ③ 24 時間以上の乾燥。天日干しが理想的。
  - ④ 500ppm 次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) で 10 分間の消毒。
  - ⑤ 第 4 級アンモニウム化合物 (1500ppm) で 10 ～ 15 分間の消毒。

( 8) その他

米国での天然水域のモニタリングやサーベイランスにおいては、生息するイトミミズの PCR 検査や、感受性魚種の稚魚を一定期間当該水域に暴露して感染の有無を調べる方法が行われている。

コイ春ウイルス血症  
Spring viraemia of carp(SVC)

担 当	検査チャート
都 道 府 県	<pre> graph TD     A["(1)疫学調査"] --- B["(2)臨床検査"]     A --- C["(3)剖検"]     B --- C     C --- D["(4)①(ア)RT-PCR 検査"]     C --- E["(4)①(イ)培養細胞によるウイルス分離"]     D --- F["(+, ±)"]     D --- G["(-)"]     F --- H["(4)②(ア)培養細胞によるウイルス分離"]     H --- I["(4)②(イ)RT-PCR 検査((4)①(ウ)に同じ)"]     I --- J["(+, ±)"]     I --- K["(-)"]     J --- L["(4)②(ウ)PCR 検査"]     L --- M["(+)", "(-)"]     E --- N["(+, ±)"]     E --- O["(-)"]     N --- P["(4)①(ウ)RT-PCR 検査(場合により nested)"]     P --- Q["(+, ±)"]     P --- R["(-)"]     Q --- M     R --- S["-"]     G --- S     O --- S     </pre>
増 養 殖 研 究 所	<pre> graph TD     A["(4)②(ア)培養細胞によるウイルス分離"] --- B["(4)②(イ)RT-PCR 検査((4)①(ウ)に同じ)"]     B --- C["(+, ±)"]     B --- D["(-)"]     C --- E["(4)②(ウ)PCR 検査"]     E --- F["(+)", "(-)"]     D --- G["-"]     </pre>
判 定	<p style="text-align: center;">+                      -                      -                      -                      -</p>
その他	<p>本疾病の診断は培養細胞によるウイルス分離を行う事が原則であるが、臨床的に発症している魚の場合は(4)①(ア)の RT-PCR を選択してもよい。ただしその場合は陰性であっても(4)①(イ)の細胞培養によるウイルス分離を試みる必要がある。</p>

# コイ春ウイルス血症 Spring viraemia of carp(SVC)

疾病名：コイ春ウイルス血症

Spring viraemia of carp(SVC)

病原体：Spring viremia of carp virus (ラブドウイルス科ベシキュロウイルス属)

## (1) 疫学調査

- ① 宿主域：コイ (*Cyprinus carpio*)、フナ (*Carassius spp.*)、キンギョ (*Carassius auratus*)、ソウギョ (*Ctenopharyngodon idella*)、ハクレン (*Hypophthalmichthys molitrix*)、コクレン (*H. nobilis*) およびヨーロッパオオナマズ (*Silurus glanis*) などが知られている。
- ② 発生地域：ヨーロッパ諸国、旧ソ連、ブラジル、米国、カナダ、中国、イラン及びエジプト
- ③ 当該種苗は上記の地域から輸入したものである。
- ④ 当該養殖場は過去に上記地域から種苗を導入したことがある。
- ⑤ 春季の水温上昇期 (15℃まで) によくみられる。水温 23℃を越えると死亡はみられなくなるが、ウイルスは魚体内に保持されていることがある。

## (2) 臨床検査

- ① 異常遊泳及び遊泳力の低下が認められる。
- ② 腹部膨満・眼球突出が認められる。
- ③ 鰓及び体表に点状出血が認められる。

## (3) 剖検所見

- ① 腹水 (透明又は出血性) の貯留が認められる。
- ② 肝臓、腎臓、心臓、腸管、腹膜、腹部脂肪組織などに点状出血が認められる。
- ③ 脾腫が認められる。

## (4) 診断法

### ① 初動診断法：

#### (ア) RT-PCR 検査 (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法)

材料；腎臓等の組織抽出 RNA。

プライマー；

exSVCV F：5'-GGA-TAA-TAT-CGG-CTT-GGA-AAG-C-3'

exSVCV R：5'-GCC-TAA-ATG-TGT-TGA-TGG-AAC-G-3'

増幅産物サイズ；470bp

逆転写反応；50℃で 30 分間反応後、94℃で 2 分間処理。

PCR 反応；94℃で 15 秒、50℃で 30 秒、68℃で 1 分を 34 サイクル、最後に

68℃で7分。

(イ) ウイルス分離

使用細胞；EPC 細胞

接種材料；腎臓等の組織磨砕液。

培養方法；20℃で7日間培養し、CPE が出現しない場合は継代してさらに7日間培養する。

成績；細胞の球形化及び剥離を特徴とする CPE を確認する。

(ウ) RT-PCR 検査 (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法)

i) 1st RT-PCR

材料；CPE を示した細胞の培養上清の抽出 RNA。

プライマー；

SVCVF1:5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR\*-R\*TC-3'

SVCVR2:5'-AGA-TGG-TAT-GGA-CCC-CAA-TAC-ATH\*-ACN\*-CAY\*-3'

R\*：A 又は G H\*：A 又は C 又は T

N\*：A 又は C 又は G 又は T Y\*：C 又は T

増幅産物サイズ；714bp

逆転写反応；50℃で30分間反応後、94℃で2分間処理。

PCR 反応；94℃で15秒、55℃で30秒、68℃で1分を35サイクル、最後に68℃で7分。

ii) 2nd PCR (1st PCR で陽性バンドが得られなかった場合のみ行う nested PCR)

材料；1st PCR で陽性バンドが得られなかった PCR 産物。

プライマー；

SVCVF1：5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR\*-R\*TC-3'

SVCVR4：5'-CTG-GGG-TTT-CCN\*-CCT-CAA-AGY\*-TGY\*-3'

R\*:A 又は G

N\*:A 又は C 又は G 又は T Y\*:C 又は T

増幅産物サイズ；606bp

PCR 反応；94℃で30秒、次いで94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で60秒を35サイクル、最後に72℃で7分間。

② 最終診断法：

(ア) ウイルス分離

接種材料；RT-PCR 検査で陽性を示した個体の腎臓等の組織磨砕液又は初動診断法で分離されたウイルス

使用細胞及び培養方法；①初動診断法の(イ)と同じ。

(イ) RT-PCR 検査 (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法)

①初動診断法の(ウ)と同じ。

(ウ) Nested-PCR 検査

材料；上記(4)②(イ)の最初の RT-PCR もしくは 2nd PCR の増幅産物。

プライマー；

SVCV nest F：5'-TGA-AGA-Y\*TG-TGT-CAA-TCA-AGT-C-3'

SVCV nest R : 5'-GCG-AR\*T-GCA-GAG-AAA-AAG-TG-3'

Y\*:C 又は T R\*:A 又は G

増幅産物サイズ ; 369bp

PCR 反応 ; 94℃で 30 秒、次いで 94℃で 30 秒、55℃で 30 秒、72℃で 30 秒を 25 サイクル、最後に 72℃で 7 分。

( 5) 病理組織学的所見

- ① 肝臓の血管に炎症、壊死が認められる。
- ② 脾臓に化膿性炎症、巣状壊死が認められる。
- ③ 腸管の血管周囲に炎症が認められる。

( 6) 類似疾病検査

(4) ② (ウ) の nested-PCR でパイクフライラブドウイルスとの鑑別を行う。

( 7) 消毒 ( 別紙早見表を参照のこと )

使用器具及び手指の消毒は、通常のウイルスを対象とした消毒法を用いる。

( 8) その他

- ① 本疾病に関しては、RT-PCR より培養細胞によるウイルス分離のほうが高感度であるため、サーベイランスのように症状が明らかでない魚を検査する場合には培養細胞によるウイルス分離を行う。
- ② (4) ① (ア) の RT-PCR で陽性になれば、初動診断での培養細胞によるウイルス分離を省略することができる。しかし、当該 RT-PCR では SVC の一部の遺伝子型を増幅することができないため、陰性の場合には培養細胞によるウイルス分離を行う必要がある。
- ③ (4) ① (ウ) の RT-PCR は、ほとんどの遺伝子型の SVC を増幅するように設計されているが、感度が低い。そのため、組織から RNA を抽出したサンプルでは増幅が確認できない可能性があり、細胞で培養してウイルスを増殖させたサンプルで行う必要がある。その際、i) の 1st RT-PCR でバンドが確認されなかった場合は、1st RT-PCR の増幅産物をテンプレートとしてさらに ii) に示す 2nd PCR を行い、それでもバンドが確認されなかった場合は陰性とする。i) の 1st RT-PCR で陽性バンドが確認できれば、2nd PCR を行う必要はない。
- ④ (4) ② (ウ) は、(4) ② (イ) の 1st RT-PCR もしくは 2nd PCR の増幅産物をテンプレートとして行う nested PCR である。ただし、(4) ② (イ)((4) ① (ウ) と同一) の 2nd PCR とはプライマーが異なり、近縁のパイクフライラブドウイルスを検出しないように設計されている。
- ⑤ 最終診断においては、(4) ② (ア) 培養細胞によるウイルス分離で明らかな CPE が観察されなくとも (4) ② (イ) RT-PCR 法の検査を行う

コイ春ウイルス血症対策のための消毒方法早見表

消毒するもの	有効成分	使用濃度	消毒液の更新	魚毒性	使用上の注意
手	アルキルトルエン	0.05% (30 秒)	2-3 日 汚れてきたら 早めに交換	有り ただし高濃度 の液が直接池 に入らない限 り問題ない。	液が汚れてきたら効果なし。 エタノール、グルコン酸クロ ルヘキシジンはスプレーで使 用すると効果的。
	グルコン酸クロルヘキシジン	0.0175% (30 秒)			
	クレゾール	0.25% (30 秒)			
	エタノール	50% (30 秒)			
長靴	アルキルトルエン	0.05% (30 秒)	2-3 日 汚れてきたら 早めに交換	有り	液が汚れてきたら効果無し。
	グルコン酸クロルヘキシジン	0.0175% (30 秒)			
	クレゾール	0.25% (30 秒)			
	有効塩素 (サラシ粉など)	540ppm (30 秒)			
池 (泥底)	有効塩素 (サラシ粉など)	540ppm (20 分)	室内では 2 日 屋外では毎日 使用の都度	極めて強い	※1
	有効塩素 (サラシ粉など)	540ppm (20 分)			
	有効塩素 (サラシ粉など)	540ppm (20 分)			
	有効塩素 (サラシ粉など)	540ppm (20 分)			
池水	塩化ベンザルコニウム	0.01% (20 分)	2-3 日。 汚れてきたら 早めに交換。網 類、衣類の消毒 剤は 1 回の使 用で捨てる。	有り	網類は消毒後、水洗いして使 用する。
	アルキルトルエン	0.05% (30 秒) もしくは 0.035% (20 分)			
	グルコン酸クロルヘキシジン	0.0175% (30 秒) もしくは 0.01% (20 分)			
	クレゾール	0.25% (30 秒) もしくは 0.02% (20 分)			
器具, 器材, 網類, 衣類	熱湯	56℃以上 (30 分)			
	アルキルトルエン	0.05% (30 秒) もしくは 0.035% (20 分)	使用の都度	有り	タイヤの裏側などの見えない 箇所も噴霧する。
	グルコン酸クロルヘキシジン	0.0175% (30 秒) もしくは 0.01% (20 分)			
	クレゾール	0.25% (30 秒) もしくは 0.02% (20 分)			
車					

OIE マニュアル (2015) および Kiryu *et al.* (2007) Fish Pathol., 42, 111-113.、ないしこれらに引用されている文献による。

- ※1：塩素臭がなければ効果無し。屋外では消毒槽にふたをして光が入らないようにする。漂白力が強いので、体や網に触れないようにする。OIE マニュアルでは 540ppm で 20 分の消毒を推奨しているが、長靴の消毒目的では実際的でない。7.6ppm20 分で 99-99.9% のウイルスが不活化されるといふデータ (Ahne, W. 1982, Zbl. Vet. Med. B, 29, 457-476) を考えると、表面に有機物の汚れのない長靴などを消毒するには 540ppm ならば 30 秒程度でほぼ完全にウイルスは不活化されると考えられる。
- ※2：有効塩素濃度が 540ppm となるようにサラシ粉を投入した水を底面の泥がかぶる程度に張る。数日で残留塩素はなくなるが、排水の前に市販の検査試薬で確認するかサラシ粉の 2 倍量のハイポ（チオ硫酸ナトリウム）で塩素を中和する。雨天には消毒しない。
- ※3：池を排水してジョーロなどでまんべんなく散布する。排水するときには残留塩素がないことを確認する。雨天には消毒しない。屋内の場合はサラシ粉の 2 倍量のハイポ（チオ硫酸ナトリウム）を水に溶かして散布し、塩素を中和する。
- ※4：サラシ粉を所定の濃度になるように池水に溶解した後、数日間放置し日光により残留塩素が無くなった後に排水する。屋内の場合にはサラシ粉の 2 倍量のハイポ（チオ硫酸ナトリウム）で中和した後排水する。サラシ粉は魚毒性が強く、残留塩素が無いことを検査試薬で確認してから排水する必要がある。

コイヘルペスウイルス病

Koi herpesvirus disease(KHVD)

担当	検査チャート
都道府県	<pre> graph TD     A["(1)疫学調査"] --- B     C["(2)臨床検査"] --- B     B --- D["(3)剖検"]     D --- E["(4)①(ア)PCR検査(又は) (4)①(イ)LAMP法"]     E --- F["(+、±)"]     E --- G["(-)"]         </pre>
増養殖研究所	<pre> graph TD     H["(4)②PCR検査"] --- I["(+)", "(-)"]         </pre>
判定	<p style="text-align: center;">+                      -                      -</p>
その他	<p>国立研究開発法人水産研究・教育機構増養殖研究所によって実施されたKHV病診断技術認定テストに合格した者を検査担当者としている魚病指導機関においては、(4)②の検査を増養殖研究所に代わって行うことができるものとする。</p>

# コイヘルペスウイルス病 Koi herpesvirus disease(KHVD)

疾病名：コイヘルペスウイルス病

Koi herpesvirus disease(KHVD)

病原体：Cyprinid herpesvirus 3 (アロヘルペスウイルス科シプリニウイルス属)

## (1) 疫学調査

- ① 宿主域：マゴイ (*Cyprinus carpio carpio*) 及びニシキゴイ (*Cyprinus carpio koi*)
- ② 発生地域：イスラエル、ヨーロッパ諸国、米国、インドネシア、タイ、フィリピン、台湾、日本
- ③ 水温 20～25℃程度で発生する。
- ④ 当該魚は本病の発生が確認された地域から輸入された魚、あるいはその輸入された魚と接触したことがある魚である。
- ⑤ 当該養魚場は過去に本病の発生が確認された地域からの魚、あるいはその魚と接触した魚を導入したことがある。
- ⑥ 当該養魚場の飼育用水に、上記④あるいは⑤に関連した養魚場排水が混入する可能性がある。

## (2) 臨床検査

- ① 行動観察：遊泳緩慢、平衡感覚失調などの異常遊泳が認められる。
- ② 外部病徴検査：最も特徴的な病変は、鰓の退色、びらん、巣状壊死、二次鰓弁の癒合である。その他、体表粘液過多、鰓基部のうっ血及び出血、眼球の落ち込みなどが認められる。
- ③ 体表組織の検鏡：鰓には、イクチオボドやトリコジナなどの外部寄生性原虫や、カラムナリス菌などの細菌の二次感染がしばしば認められる。

## (3) 剖検所見

特徴的な病変はないが、内臓の癒着がしばしば認められる。

## (4) 診断法

### ① 初動診断法：

#### (ア) PCR 検査

材料；鰓、腎臓又は脾臓の抽出 DNA。

プライマー；

KHV Sph I -5 F：5'-GAC-ACC-ACA-TCT-GCA-AGG-AG-3'

KHV Sph I -5 R：5'-GAC-ACA-TGT-TAC-AAT-GGT-CGC-3'

増幅産物サイズ；292bp

反応；94℃で30秒間、次いで94℃で30秒間、63℃で30秒間、

72℃で 30 秒間を 40 サイクル、最後に 72℃で 7 分間。

(イ) LAMP 法

材料；鰓、腎臓及び脾臓の抽出 DNA。

プライマー；

KHV-FIP：5'-CCC-AAA-CCC-AAG-AAG-CAG-AAA-CCC-GTT-GCC-TGT-AGC-ATA-GAA-GA-3'

KHV-BIP：5'-CAC-TCC-TCC-GAT-GGA-GTG-AAA-CTG-CCC-ATG-TGC-AAC-TTT-G-3'

KHV-F3：5'-CTG-TAT-GCC-CGA-GAG-TGC-3'

KHV-B3：5'-AAC-TCC-ATC-GCC-GTC-ATG-3'

KHV-LF：5'-CCC-GCC-GCC-GCA-3'

KHV-LB：5'-TGG-AAC-TGT-CTG-ATG-AGC-GT-3'

反応；65℃、60 分間。

判定；反応液の白濁の有無を、濁度測定装置又は目視にて確認する。

② 最終診断法：PCR 検査

初動診断法の PCR 検査に加えて、次の PCR も実施。

材料；鰓、腎臓及び脾臓の抽出 DNA。

プライマー；

KHV TK F：5' -GGG-TTA-CCT-GTA-CGA-G-3'

KHV TK R：5' -CAC-CCA-GTA-GAT-TAT-GC-3'

増幅産物サイズ；409bp

反応；94℃で 5 分間、次いで 95℃で 1 分間、55℃で 1 分間、72℃で 1 分間を 40 サイクル、最後に 72℃で 10 分間。

(5) 病理組織学的所見

最も特徴的な変化は、鰓上皮細胞の増生、肥大及び散在あるいは巣状の壊死である。鰓などの細胞中に核膜過染及び弱好酸性の核内封入体が見られることがあるが、これをもって本病を診断することはできない。

(6) 類似疾病検査

本病は、鰓のびらんや壊死を伴い、患部に細菌、真菌及び原虫の二次感染を認めることが多い。特にカラムナリス病と臨床検査で区別することが困難であり、しばしばカラムナリス菌との複合感染も認められる。成魚が高い斃死率を示し、病徴からも本病が疑われる場合には PCR による診断を行う。

(7) 消毒 (別紙早見表を参照のこと)

① 用水・排水の殺菌

(ア) 殺菌

紫外線  $4,000\mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$

(イ) 殺菌方法

- ・ 15 wの紫外線ランプ一灯で、毎秒 1 Lの用水が殺菌可能である。
- ・ 水路式の流水路を用い、上部に紫外線ランプを吊り下げる。
- ・ 水深は 5 cm 以下とし、紫外線ランプの中心から水路底までを 10cm とする。

(ウ) 注意

- ・ 紫外線ランプの寿命に注意し、早めに交換する。
- ・ 濁った水やゴミ等の懸濁物があると殺菌が十分に行われないため、沈殿槽等で取り除く。
- ・ 紫外線の透過をよくするため、水の表面を波立たせないように注意する。
- ・ 紫外線が作業者の目に直接入らないようにする。

② 養殖池の消毒

(ア) 消毒剤

有効塩素剤 200ppm (高度サラシ粉、次亜塩素酸ナトリウム溶液)

(イ) 消毒方法

- ・ 消毒時間は 30 分～ 1 時間。
- ・ 水深を 10cm ～ 20cm まで落とし、上記の濃度になるように塩素剤を散布する。
- ・ 固形の塩素剤の場合は、水に溶いて散布する。
- ・ 池壁は、有効塩素濃度 200ppm の消毒液をジョーロで満遍なく散布する。

(ウ) 注意

- ・ 塩素系消毒剤は、皮膚刺激性、腐食性が強いため、消毒に際しては必ずマスク、手袋、メガネ及び合羽を着用し、薬剤が身体に付着しないようにする。
- ・ 消毒の廃液を捨てる際には、必ずハイポで中和したのち、市販の塩素検出の水道水検査用キット等で残留塩素濃度を確認してから排水すること。
- ・ 池消毒後の飼育用水には、地下水を直接注水すること。ウイルス汚染の可能性のある河川水や、既に魚を飼育した(している)池の水は使わない。

③ 使用後の池水の消毒

(ア) 消毒剤

有効塩素 3 ppm(高度サラシ粉、次亜塩素酸ナトリウム液)

(イ) 消毒のやり方

- ・ 消毒時間は 30 分～ 1 時間。
- ・ 上記の濃度になるように塩素剤を散布し、よく攪拌する。池水に含まれる有機物により塩素が消費されることを考慮し、塩素濃度が 15ppm となるように塩素剤を散布するとよい。

(ウ) 注意

- ・ 塩素系消毒剤は、皮膚刺激性、腐食性が強いため、消毒に際しては必ずマスク、手袋、メガネ及び合羽を着用し、薬剤が身体に付着しないようにする。
- ・ 消毒の廃液を捨てる際には、必ずハイポで中和したのち、市販の塩素検出の水道水検査用キット等で残留塩素濃度を確認してから排水すること。

④ 飼育器具等の消毒

(ア) 消毒剤

塩化ベンザルコニウム 0.1% (逆性石けん)

有効塩素 200ppm(高度さらし粉、次亜塩素酸ナトリウム液)

(イ) 消毒のやり方

- ・器具等が十分に消毒剤に浸かるようにする。
- ・消毒後の器具等は水洗いし、乾燥させておく。

(ウ) 注意

- ・消毒剤は早めに交換する。
- ・塩化ベンザルコニウムは手あかなどで汚れてきたら効果なし。
- ・塩素系消毒剤は、臭いがなければ効果なし。

⑤ 手指及び小型の実験器具の消毒

(ア) 消毒剤

塩化ベンザルコニウム 0.1% (逆性石けん)

アルコール系消毒剤 70%

(イ) 消毒方法

- ・手指・器具を十分に消毒槽に浸ける。
- ・消毒後の器具等は水洗いし、乾燥させておく。

(ウ) 注意

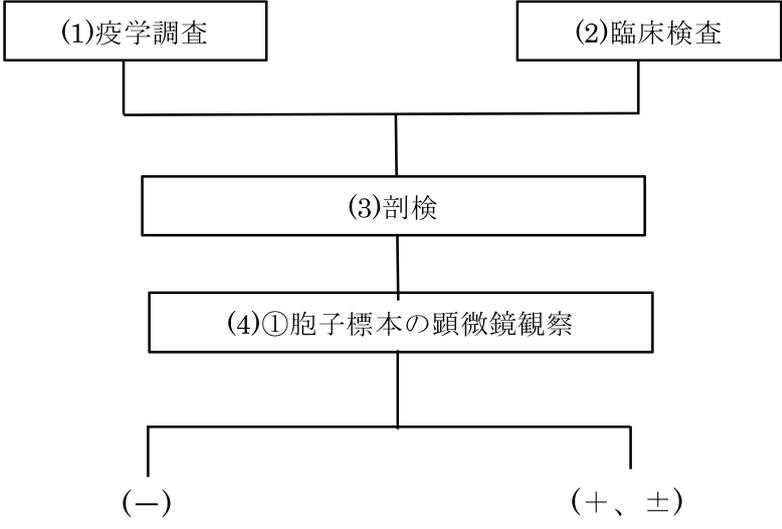
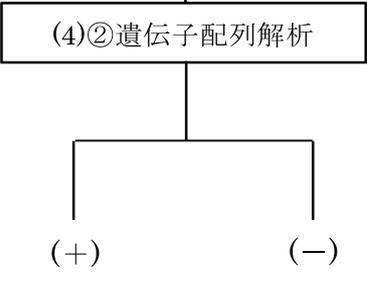
- ・消毒剤は早めに交換する。
- ・アルコールはスプレーで使用すると効果的である。
- ・塩化ベンザルコニウムは手あかなどで汚れてきたら効果がなくなるため、早めの交換が必要。

(8) その他

なし。



マダイのグルゲア症  
Glugeosis of red sea bream

担当	検査チャート
都道府県	
増養殖研究所	
判定	<p style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 100px;">-</span> <span style="margin-right: 100px;">+</span> <span>-</span> </p>
その他	<p>初動診断法の胞子標本の顕微鏡観察は生標本でも固定・染色標本でもよい。 最終診断法の遺伝子解析は SSU rDNA PCR 産物の塩基配列の解析を行う。</p>

## マダイのグルゲア症 Glugeosis of red sea bream

疾病名：マダイのグルゲア症

Glugeosis of red sea bream

病原体：Glugea pagri (微胞子虫門グルゲア科グルゲア属)

### (1) 疫学調査

- ① 宿主域：マダイ (*Pagrus major*)。微胞子虫は一般的に宿主特異性が高く、他魚種で同一病原体による疾病が存在する可能性は低い。
- ② 発生地域：中国広東省の大亜湾。

### (2) 臨床検査

特徴的な外観症状は報告されていないが、重度の感染を受けた魚は遊泳が緩慢となり、食欲を失い、やがて死亡する。

### (3) 剖検所見

内臓器官全般にわたり白色で球形の数 mm に達する大型のキセノマ (Xenoma: 胞子を含むシスト状の塊で、感染細胞が無数の胞子で巨大化したもの。) が腹腔内臓器に付着して多数見られる。

### (4) 診断法

- ① 初動診断法：キセノマの押しつぶし生標本あるいは胞子のスメア固定標本の顕微鏡観察

材料；摘出した新鮮な内臓のキセノマ。

標本作製法；スライドグラスに乗せ、生理食塩水中でカバースリップを用いて押しつぶし、胞子を放出させて、生標本を作製する。さらに放出させた胞子のスメア標本を作製した場合は、100%メタノールで固定する。

染色と観察法；生標本は明視野で油浸レンズを用いて×1000で顕微鏡観察する。固定した胞子のスメア標本はリン酸緩衝ギムザ液 (pH 6.8) 等で染色したのち観察する。長卵形 (平均長径 7.9 $\mu$ m × 平均短径 2.9 $\mu$ m) と卵形 (平均長径 4.4 $\mu$ m × 平均短径 2.5 $\mu$ m) の大小2種類の胞子の存在を確認する。なお大きな胞子の方が数は少なく、その比率は低い (8.4%)。

- ② 最終診断法：遺伝子配列解析

材料；胞子から DNA 抽出キットを用いて抽出した DNA。

プライマー；

s1 : 5' -ATG-AGA-CGT-GAG-AAA-GAG-TGC-TTG-GTA-AA-3'

a1 : 5' -CGC-CGA-CCG-CAA-CCT-TGT-TAC-GAC-TT-3'

増幅産物サイズ；964bp

PCR 反応；95℃で 5 分、その後 95℃で 30 秒、55℃で 35 秒、72℃で 2 分を 30 サイクル行い、最後に 72℃で 10 分間。

塩基配列の決定；DNA シークエンサーを用いて、PCR 産物のダイレクトシークエンスによるか、大腸菌にクローニングした PCR 産物について複数クローンの塩基配列を決定し、コンセンサス配列を決定するかのいずれかの方法により、PCR 産物の塩基配列の決定を行う。

判定；BLAST 解析により、*G. pagri* の small subunit ribosomal DNA(SSU rDNA) の登録塩基配列 (accession No. JX852026) との相同性を確認する。

#### (5) 病理組織学的所見

キセノマは腹腔内臓器の漿膜上の様々な場所に形成され、しばしば腸管壁の平滑筋層や上皮下の結合組織にまで侵入する。エオジン好性顆粒細胞 (EGC) の集積を特徴とする細胞反応が、特に腸管の粘膜下固有層に見られる。

#### (6) 類似疾病検査

本病原体、*G. pagri* は大小 2 種類の胞子が存在することが特徴であるが、オーストラリアの海産魚：サザンカーディナルフィッシュ (*Vincentia conspersa*) から報告された *G. vincentiae* などでも同様に大小 2 種類の胞子が報告されている。しかし、本病原体の方が小胞子の大きさが小さい他、胞子内部の極管等の構造及び大きさが異なる。また、形態的に最も似ている *G. hetwigi* とは、核が小さいこと、胞子に大小 2 種類あることで区別される。なお、内部形態の差異は電顕レベルでの観察が必要となる。マダイ属の魚の微胞子虫としては、他に *Pleistophora pagri* が知られているが、*G. pagri* は大胞子を持つことで容易に *P. pagri* と区別が可能である。

#### (7) 消毒

消毒法は報告されていない。

#### (8) その他

なし。



## 2. 甲殼類





## イエローヘッド病 Yellow head disease (YHD)

疾病名：イエローヘッド病

Yellow head disease (YHD)

病原体：Yellow head virus (YHV genotype 1)(ロニウイルス科 オカウイルス属)

### (1) 疫学調査

- ① 宿主域：自然感染は、主にウシエビ(ブラックタイガー)(*Penaeus monodon*)で、その他、クルマエビ(*Marsupenaeus japonicus*)、テンジクエビ(バナナエビ)(*Fenneropenaeus merguensis*)、ホワイトシュリンプ(*P. setiferus*)、ヨシエビ(*M. ensis*)等で報告されている。実験感染では、シロアシエビ(ホワイトレグシュリンプ、バナメイ)(*Litopenaeus vannamei*)、ブルーシュリンプ(*L. stylirostris*)、ブラウンシュリンプ(*Farfantepenaeus aztecus*)など多くのクルマエビ類等が感受性を示す。実験的に感染可能な宿主範囲は広いが、自然での発症はウシエビ(ブラックタイガー)(*P. monodon*)であるので、この種の移動には特に注意が必要である。
- ② 発生地域：中国、インド、インドネシア、マレーシア、フィリピン、スリランカ、台湾、タイ、ベトナム
- ③ 感染ステージ：YHVは、ポストラバ(PL)15以降のものが感染しやすい。

### (2) 臨床検査

- ① 全身の退色が認められる。
- ② 数日間過剰な摂餌行動を示した後、摂餌不良となる。
- ③ 養殖池隅の水面近くを緩慢に遊泳する。
- ④ 肝臓の黄色化により頭胸部が薄黄色化を示す個体も認められる。

### (3) 剖検所見

重症のエビは体部が黄色味を帯びた白色を呈し、しばしば頭胸部が膨れる。鰓は白色あるいは薄黄色を呈し、時として肝臓も薄黄色化が認められる。

### (4) 診断法

#### ① 初動診断法：RT-PCR 検査

材料；新鮮な鰓あるいはリンパ様器官。

プライマー；

GY1：5'-GAC-ATC-ACT-CCA-GAC-AAC-ATC-TG-3'

GY4：5'-GTG-AAG-TCC-ATG-TGT-GTG-AGA-CG-3'

増幅産物サイズ；794bp

PCR 反応；抽出した核酸および対照 RNA をテンプレートとして、上記のプライマーセット (GY1/GY4) を用いて 1 ステップの RT-PCR 反応を

行う (キット使用)。反応は、50℃で 30 分間逆転写反応後、94℃で 2 分間処理し、次いで PCR 反応として、95℃で 30 秒間、66℃で 30 秒間、68℃で 45 秒間を 35 サイクル、最後に 68℃で 7 分間。

② 最終診断法：Nested-PCR 検査

i) 1st PCR；初動診断法と同じ。

ii) 2nd PCR

材料；(4) ② i) 1st PCR の増幅産物

プライマー；

GY2：5'-CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3'

Y3：5'-ACG-CTC-TGT-GAC-AAG-CAT-GAA-GTT-3'

増幅産物サイズ；277bp

PCR 反応；反応は、95℃で 15 分の後、95℃で 30 秒間、66℃で 30 秒間、72℃で 45 秒間を 35 サイクル行い、最後に 72℃で 7 分間。

増幅産物の配列解析を行い、遺伝子型を確認する。

(5) 病理組織学的所見

本疾病に感染した場合、組織に強い壊死が散在し、核濃縮と核崩壊が認められる。特にリンパ様器官、造血組織、鰓、皮下組織、筋肉、腸、生殖腺等外胚葉由来および中胚葉由来組織において、均一に濃く塩基性に染まる球状の直径 2μm 以下の細胞質内封入体が多数認められる。

(6) 類似疾病検査

YHV はロニウイルス科 オカウイルス 属に分類される。イエローヘッド複合ウイルス群には、8 つの遺伝子型が知られ、YHV は遺伝子型 1 であり、イエローヘッド病の病原体である。遺伝子型 2 である Gill-associated virus (GAV) およびその他 4 つの遺伝子型 (3~6) は、東アジア、アジアおよびオーストラリアの健康なウシエビで一般的に検出されるが、イエローヘッド病とほとんど関連がない。遺伝子型 7 の病原性は不明である。遺伝子型 8 は病エビから検出されている。YHV と GAV は類似ウイルスであるが、RT-PCR により区別できる。

また、病理所見がタウラ症候群 (Taura syndrome (TS)) と類似しているが、RT-PCR によって区別できる。

(7) 消毒

① 60℃ 15 分の加熱処理で不活化される。

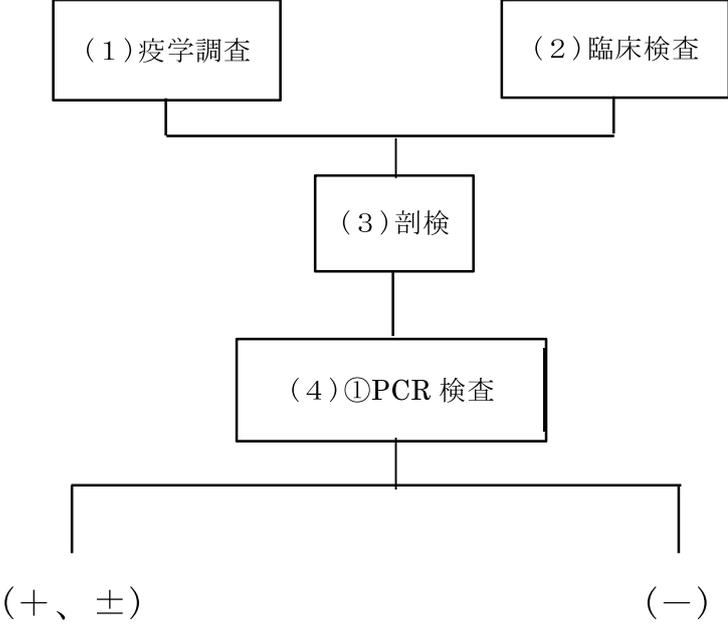
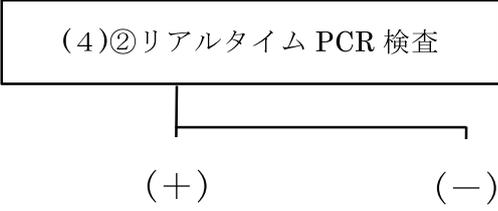
② 30ppt(0.03mg/ml) の塩素処理で不活化される。

(8) その他

有効な予防、治療法は知られていない。



壊死性肝膵炎  
Necrotising hepatopancreatitis (NHP)

担 当	検査チャート
都 道 府 県	 <pre> graph TD     A["(1) 疫学調査"] --- B["(2) 臨床検査"]     A --- B     B --- C["(3) 剖検"]     C --- D["(4) ①PCR 検査"]     D --- E["(+、±)"]     D --- F["(-)"]     </pre>
増 養 殖 研 究 所	 <pre> graph TD     E["(+、±)"] --- G["(4) ②リアルタイム PCR 検査"]     G --- H["(+)" ]     G --- I["(-)" ]     </pre>
判 定	<p style="text-align: center;">+                      -                      -</p>
その他	

## 壊死性肝膵炎 Necrotising hepatopancreatitis (NHP)

疾病名：壊死性肝膵炎

Necrotising hepatopancreatitis (NHP)

病原体：Necrotising hepatobacterium (NHPB) 又は Rickettsial-like organism (RLO)(プロテオバクテリア門アルフォプロテオバクテリア綱の未分化の細菌)

### (1) 疫学調査

- ① 本疾病は分離培養法が確立されていない細胞内寄生細菌である *Candidatus Hepatobacter penaei* に起因する。
- ② 宿主域：ほとんどの旧 *Penaeus* 属 (*Penaeus*、*Farfantepenaeus*、*Litopenaeus*、*Marsupenaeus*) のエビは宿主になると思われるが、当該細菌による疾病の発生が報告されているのは、シロアシエビ (ホワイトレグシュリンプ、バナメイエビ) (*Litopenaeus vannamei*)、ブルーシュリンプ (*L. stylirostris*)、ノースブラウンシュリンプ (*F. aztecus*) であり、*L. vannamei* への感染が最も重篤である。*L. setiferus* は *L. vannamei* より感受性が低いと言われる。
- ③ 発生地域：ベリーズ、ベネズエラ、ブラジル、コロンビア、コスタリカ、エクアドル、エルサルバドル、グアテマラ、ホンデュラス、メキシコ、パナマ、ペルー、アメリカ合衆国
- ④ *L. vannamei* では稚エビ、親エビの感染が報告されている。
- ⑤ 塩分濃度の変化や、30℃程度の高水温が持続すると発症しやすい。

### (2) 臨床検査

- ① 緩慢な動き、色素胞の発達による尾肢や腹肢の暗色化、付着生物による甲殻のひどい汚れが認められる。
- ② 食欲減退や成長不良、痩せ、甲殻の軟化が認められる。
- ③ 二次的な細菌の甲殻への感染が認められる。

### (3) 剖検所見

- ① 消化盲嚢 (肝膵臓) の萎縮が認められる。
- ② 鰓の色の暗色化が認められる。

### (4) 診断法

- ① 初動診断法：PCR 検査

材料；肝膵臓組織の抽出 DNA。

プライマー；

NHPF2: 5' -CGT-TGG-AGG-TTC-GTC-CTT-CAG-T-3'

NHPR2: 5' -GCC-ATG-AGG-ACC-TGA-CAT-CAT-C-3'

増幅産物サイズ；379 bp

PCR 反応；最初に 95℃で 5 分、次に 95℃で 30 秒、60℃で 30 秒、72℃で 30 秒を 35 サイクル、最後に 60℃で 1 分、72℃で 2 分間。

② 最終診断法：リアルタイム PCR 検査

材料；肝臓組織の抽出 DNA。

プライマー；

NHP1300F: 5' -CGTTCACGGGCCTTGTACAC-3'

NHP1366R: 5' -GCTCATCGCCTTAAAGAAAAGATAA-3'

TaqMan® プローブ

NHP: 5' -FAM-CCGCCCCGTCAAGCCATGGAA-TAMRA-3'

増幅産物サイズ；67 bp

リアルタイム PCR 反応；最初に 95℃で 3 分、次に 95℃で 15 秒、60℃で 1 分を 40 サイクル。

(5) 病理組織学的所見

感染初期を除いて通常のヘマトキシリン・エオジン染色で容易に診断可能である。疾病の進行段階に応じて消化盲嚢（肝臓）には以下のような病理組織学的特徴が認められる。

- ① 急性期では肝臓の萎縮、消化盲嚢上皮の軽度の萎縮、細菌巣の形成とそれに対する血球の浸潤や、消化盲嚢細管の被嚢化、盲嚢上皮細胞の壊死と剥離が認められる。
- ② 移行期では盲嚢上皮細胞の壊死・脱落に応じて血球の浸潤が見られる。盲嚢上皮の萎縮は顕著であり、水腫状の大きな空所が肝臓内に形成される。盲嚢上皮細胞は細胞高が低くなり細胞内の脂肪滴は大きく減少し、細菌塊が認められる。しばしば中央に細菌塊を含んだ結節の形成が認められる。
- ③ 慢性期では水腫状の空所や結節は減少し、浸潤してきた血球に置き換わる。細菌塊を含む肥大した細胞の数は顕著に減少し、壊死した盲嚢には線維化やメラニンの沈着が認められる。

(6) 類似疾病検査

情報なし。

(7) 消毒

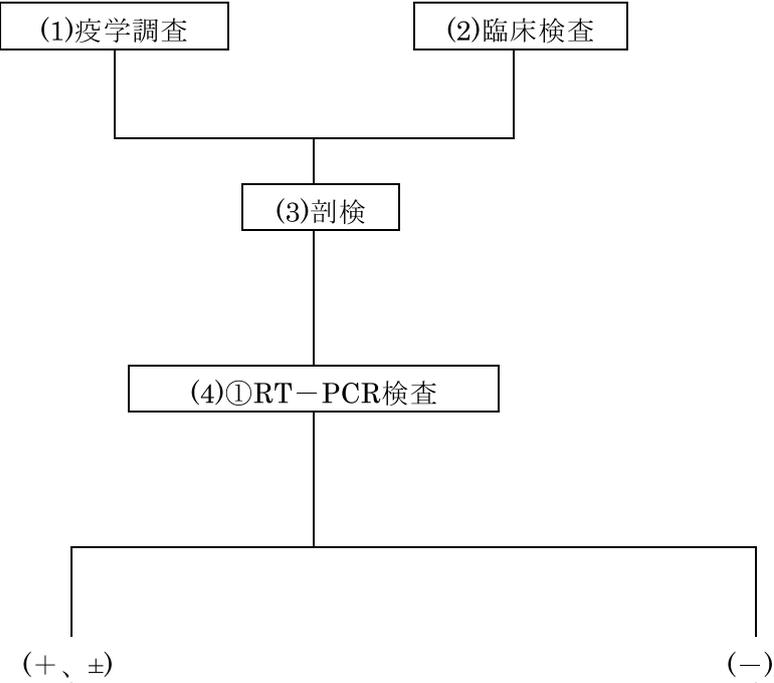
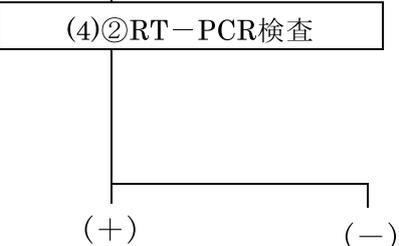
文献情報はないが、本細菌は塩素剤等通常の消毒剤により不活化されることが考えられる。

(8) その他

薬剤療法や免疫賦活剤の投与、選抜育種などの対策は報告されていない。



タウラ症候群  
Taura syndrome (TS)

担 当	検査チャート
都 道 府 県	 <pre> graph TD     A["(1)疫学調査"] --- B["(2)臨床検査"]     A --- B     B --- C["(3)剖検"]     C --- D["(4)①RT-PCR検査"]     D --- E["(+, ±)"]     D --- F["(-)"]     </pre>
増 養 殖 研 究 所	 <pre> graph TD     G["(4)②RT-PCR検査"] --- H["(+)", "(-)"]     </pre>
判 定	<p style="text-align: center;">+                      -                      -</p>
その他	<p>病気を発症している場合は組織学的検査もあわせて行うことが望ましい。</p>

## タウラ症候群 Taura syndrome (TS)

疾病名：タウラ症候群

Taura syndrome (TS)

病原体：Taura syndrome virus (TSV) (ジシストロウイルス科アパラウイルス属)

### (1) 疫学調査

- ① 宿主域：主な自然感染宿主は、シロアシエビ（ホワイトレグシュリンプ、バナメイエビ）(*Litopenaeus vannamei*)である。ブルーシュリンプ (*L. stylirostris*)でも自然感染は報告されているが、感受性は低い。実験感染では、ウシエビ（ブラックタイガー）(*Penaeus monodon*)、クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*)とコウライエビ (*Fenneropenaeus chinensis*)、ノーザンホワイトシュリンプ (*P. setiferus*)、サウザンホワイトシュリンプ (*P. schmitti*)、ノーザンブラウンシュリンプ (*P. aztecus*)とノーザンピンクシュリンプ (*P. duorarum*)で認められている。
- ② 発生地域：中南米諸国、アメリカ合衆国、インドネシア、タイ、マレーシア、中国、台湾
- ③ 当該種苗は上記の地域から輸入したものである。
- ④ 当該養殖場は過去に上記地域から種苗を導入したことがある。
- ⑤ ポストラバ、稚エビから成エビまで感染するが、特に稚エビから未成エビでの感染が顕著である。

### (2) 臨床検査

- ① シロアシエビでは、0.05 gから5 g以下の稚エビで明らかな症状を示し、急性感染して高い死亡率をもたらす。
- ② 症状は急性期、移行期、慢性期の3段階に分けられる。
- ③ 急性期及び移行期では、一般的に体全体が薄赤く変色し、特に尾鰭と腹脚が明らかに赤くなる。付属肢に部分的な上皮の壊死が認められる。
- ④ 明らかに急性期の病変を示しているエビでは、柔らかい殻と空胃が特徴である。
- ⑤ 急性期を生残した移行期のエビでは多くの不規則で点状のメラニン沈着した上皮の病変がみられ、このようなエビでは軟弱な上皮と赤色素胞の拡大を示すこともある。
- ⑥ 移行期を生残したエビは慢性期の感染状態になる。慢性期の特徴は、死亡の停止、正常行動の回復、肉眼で観察できるメラニン沈着した病変の消失などがあげられる。

### (3) 剖検所見

特徴的な所見に乏しい。

### (4) 診断法

- ① 初動診断法：RT-PCR 検査 (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法：キット使用)

材料：血リンパの抽出RNA。

プライマー；

TSV 9195：5'-TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC-3'

TSV 9992：5'-AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT-3'

増幅産物サイズ；213bp

逆転写反応；60℃で30分間反応後、94℃で2分間処理。

PCR反応；94℃で45秒、60℃で45秒を40サイクル、最終60℃で7分間。

② 最終診断法：RT-PCR検査

上記のRT-PCR法に加えて次の方法も実施。

材料：血リンパの抽出RNA。

プライマー；

TSV55P1：5'-GGC-GTA-GTG-AGT-AAT-GTA-GC-3'

TSV55P2：5'-CTT-CAG-TGA-CCA-CGG-TAT-AG-3'

増幅産物サイズ：1303 bp

逆転写反応；50℃で45分間反応後、95℃で5分間処理。

PCR反応；95℃で60秒、60℃で45秒、72℃で90秒を40サイクル、最終72℃で5分間。

(5) 病理組織学的所見

- ① 急性期では、全ての足肢、鰓、後腸、食道、胃、体表に巣状ないしは拡散したクチクラ上皮細胞の壊死が認められる。
- ② 壊死細胞には、しばしばエオジン好性から薄い塩基性好性の球状体（直径1-20μm）の細胞残査が認められる。
- ③ 移行期では、病巣に顕著な血球の浸潤及び蓄積が起こり、これらが黒点を形成するメラニン沈着を引き起こす。ただし、このような病変は他の原因によっても引き起こされる。
- ④ 慢性期では、急性期にみられる組織病変は消失し、顕著な病変はみられない。

(6) 類似疾病検査

情報なし。

(7) 消毒

文献情報はないが、本ウイルスは塩素剤等通常の消毒剤により不活化されると考えられる。

(8) その他

垂直感染をさけるため、卵は清浄な海水でよく洗浄し、卵や幼生が親エビの糞便等による汚染を受けないようにする。



伝染性皮下造血器壊死症  
Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis (IHHN)

担 当	検査チャート		
都 道 府 県	<pre> graph TD     A["(1)疫学調査"] --- B["(2)臨床検査"]     B --- C["(3)剖検"]     C --- D["(4)①PCR検査"]     D --- E["(+、±)"]     D --- F["(-)"] </pre>		
増 養 殖 研 究 所	<pre> graph TD     G["(4)②PCR検査"] --- H["(+)", "(-)"] </pre>		
判 定	+	-	-
その他	国内で発生が疑われる事例が確認された場合、別途、病理組織の観察を行うことが望ましい。		

## 伝染性皮下造血器壊死症 (IHHN) Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis: IHHN

疾病名：伝染性皮下造血器壊死症 (IHHN)

Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis: IHHN

病原体：Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)(パルボウイルス科  
ブレビデンソウウイルス属)

### (1) 疫学調査

- ① 宿主域：自然発病は主にブルーシュリンプ (*Litopenaeus stylirostris*)、シロアシエビ (ホワイトレッグシュリンプ、バナメイエビ) (*L. vannamei*) 及びウシエビ (ブラックタイガー) (*Penaeus monodon*)。実験感染では多くのえび類等が感受性を示す。
- ② 発生地域：アメリカ合衆国南東海岸、中南米諸国、ハワイ、グアム、タヒチ、ニューカレドニア、シンガポール、タイ、マレーシア、フィリピン、インドネシア、ミャンマー、イラン、オーストラリア
- ③ 当該種苗は上記の地域から輸入したものである。
- ④ 当該養殖場は過去に上記地域から種苗を導入したことがある。
- ⑤ 稚エビで発病しやすい。

### (2) 臨床検査

・ブルーシュリンプ

- ① 感染個体は死に至るまで、水面近くを緩慢に遊泳し、そこから底面にゆっくりと沈降する行動を繰り返す。
- ② 特徴的な外観症状は乏しいが、表皮 (特に腹部のつなぎ目) に白あるいは黄褐色の斑点がみられ、まだら模様のようにみえることもある。
- ③ 瀕死個体では薄青みがかかり、腹部筋肉の色がくすんでみえることもある。

・シロアシエビ (ホワイトレッグシュリンプ、バナメイエビ)

- ① この種には IHHN ウイルスは典型的な慢性疾病を引き起こす。
- ② RDS(Runt deformity syndrome) と呼ばれる、屈曲した額角、しわのよった触角、変形した外皮等の奇形症状がみられる。
- ③ RDS を示す集団では各個体の大きさがばらつき、特に矮小な個体が目立つ。

### (3) 剖検所見

特徴的な所見は乏しい。

### (4) 診断法

① 初動診断法：PCR 検査

材料；鰓等のクチクラ上皮を含む組織又は血リンパの抽出DNA。

プライマー；

389F：5'-CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA-3'

389R：5'-GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA-3'

増幅産物サイズ；389bp

反応；95℃で5分間、続いて95℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で1分間を35サイクル、最後に72℃で7分間。

② 最終診断法：PCR 検査

初動診断法のPCR検査に加えて、次の方法も実施。

材料；鰓等のクチクラ上皮を含む組織あるいは血リンパの抽出DNA。

プライマー；

392F：5'-GGG-CGA-ACC-AGA-ATC-ACT-TA-3'

392R：5'-ATC-CGG-AGG-AAT-CTG-ATG-TG-3'

増幅産物サイズ；392bp

PCR反応；95℃で5分間、続いて95℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で1分間を35サイクル、最後に72℃で7分間。

(5) 病理組織学的所見

- ① 外胚葉由来組織(クチクラ上皮、前腸及び後腸上皮、神経索、神経節)及び中胚葉由来組織(造血器官、触角腺細胞上皮、リンパ様器官等)の細胞に核の肥大が観察され、クロマチンは核周縁部に偏在している。
- ② 上記核内にエオシン好性のCowdry A型封入体が認められる。

(6) 類似疾病検査

情報なし。

(7) 消毒

池等の消毒には塩素剤及びヨード剤が有効である。

(8) その他

なし。



急性肝膵臓壊死病  
Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND)  
(Early Mortality Syndrome (EMS))

担当	検査チャート		
都道府県	<pre> graph TD     A["(1)疫学調査"] --- B["(2)臨床検査"]     B --- C["(3)剖検"]     C --- D["(4)①Nested-PCR検査"]     D --- E["(-)"]     D --- F["(+、±)"]           </pre>		
増養殖研究所	<pre> graph TD     G["(4)②Nested-PCR検査 および配列解析"] --- H["(+)", "(-)"]           </pre>		
判定	-	+	-
その他	<p>最終診断法は Nested-PCR と増幅産物の配列解析で行うが、国内で発生が疑われる事例が確認された場合は、別途、分離菌の性状試験および病理組織の観察を行うことが望ましい。</p>		

# 急性肝膵臓壊死病 Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) (Early Mortality Syndrome (EMS))

疾病名：急性肝膵臓壊死病

Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND)  
(Early Mortality Syndrome (EMS))

病原体：*Vibrio parahaemolyticus* (ビブリオ科ビブリオ属)

## (1) 疫学調査

- ① 本疾病の原因細菌である *Vibrio* 属細菌はグラム陰性の常在菌である。原因菌は、プラスミド DNA に由来する毒素を産生する株であり、当該プラスミドないし毒素遺伝子を保有していれば本疾病の原因となり得る。
- ② 宿主域：シロアシエビ (ホワイトレッグシュリンプ、バナメイエビ) (*Litopenaeus vannamei*)、ウシエビ (*Penaeus monodon*)、コウライエビ (*Fenneropenaeus chinensis*)。
- ③ 発生地域：中国、マレーシア、タイ王国、ベトナム、メキシコ
- ④ ステージ：稚エビの池収容後、10 日～30 日で発症する。

## (2) 臨床検査

- ① 肝膵臓の白色化が認められる。
- ② 外骨格の軟化、腸管内容物が摂餌不良のため部分的にしか見られないか、もしくは認められない。
- ③ 重篤感染個体は底に沈降する。

## (3) 剖検所見

- ① 肝膵臓が委縮し、硬化する。
- ② 肝膵臓に黒点や黒筋が認められることがある。

## (4) 診断法

- ① 初動診断法：Nested-PCR 検査

材料；肝膵臓より抽出した DNA。

(1st)

プライマー；

AP4-F1 : 5'- ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC -3'

AP4-R1 : 5'- ACGATTTTCGACGTTCCCCAA -3'

増幅産物サイズ；1269 bp

PCR 反応；94℃で2分の熱変性後、94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で90秒を30サイクル行い、最後に72℃で2分間。

(2nd)

プライマー；

AP4-F2 : 5'- TTGAGAATACGGGACGTGGG -3'

AP4-R2 : 5'- GTTAGTCATGTGAGCACCTTC -3'

増幅産物サイズ；230 bp

PCR 反応；94℃で2分の熱変性後、94℃で20秒、55℃で20秒、72℃で20秒を25サイクル行う。

② 最終診断法：Nested-PCR 検査

初動診断法と同じ。PCRの後、増幅産物の配列解析を行う。

(5) 病理組織学的所見

以下の病変が報告されているが必ずしも本疾病に特異的なものではない。

- ① 肝臓の R、B、F 細胞の減少に続く E 細胞の分裂活性の減少を伴う、急性的な進行性委縮が認められる。
- ② 病変は近位（口側）から遠位（肛門側）に進展し、R、B、F、E 細胞の機能障害、肝臓細管粘膜細胞の顕著な核肥大を示し、肝臓細管内腔で包囲化され崩壊する。
- ③ 崩壊した肝臓細胞より放出された基質は細菌増殖を助長し、重度の二次的細菌感染を引き起こす。末期には肝臓は完全に崩壊する。
- ④ 肝臓細管上皮細胞の初期の崩壊および二次的細菌感染への進展に付随し、顕著な細管内血球凝集、血球による壊死した肝臓細管の包囲化あるいは肝臓細管のより近位部におけるメラニン化が起きる。

(6) 類似疾病検査

情報なし。

(7) 消毒

- ① 数週間の冷凍あるいは 55℃で5分や 80℃で1分の加熱処理により増殖能は減少するが、冷蔵ではそれほど減少しない。
- ② 15分の酸性処理 (pH 5) により、原因菌は増殖能を失う。
- ③ 原因菌は汽水で9日間、海水で18日間生存可能。

(8) その他

なし。



(6) 伝染性筋壊死症  
Infectious myonecrosis (IMN)

担当	検査チャート		
都道府県	<pre> graph TD     A["(1)疫学調査"] --- B["(3)剖検"]     C["(2)臨床検査"] --- B     B --- D["(4)①RT-PCR検査"]     D --- E["(-)"]     D --- F["(+、±)"]     E --- G["-"]     F --- H["検査"]     H --- I["(4)② Nested-PCR検査"]     I --- J["(+)", "(-)"]     J --- K["+"]     J --- L["-"]     </pre>		
増養殖研究所	<p style="text-align: center;">検査</p>		
判定	-	+	-
その他	<p>最終診断法は Nested-PCR で行うが、国内で発生が疑われる事例が確認された場合は、別途、病理組織の観察を行うことが望ましい。</p>		

# 伝染性筋壊死症 (IMN) Infectious myonecrosis: IMN

疾病名：伝染性筋壊死症 (IMN)

Infectious myonecrosis: IMN

病原体：Infectious myonecrosis virus (IMNV) (トチウイルス科トチウイルス属)

## (1) 疫学調査

- ① 宿主域：シロアシエビ (ホワイトレッグシュリンプ、バナメイエビ) (*Litopenaeus vannamei*) (実験的にウシエビ (ブラックタイガー) (*Penaeus monodon*)、ブルーシュリンプ (*L. stylirostris*) で感染が確認されている)。
- ② 発生地域：ブラジル東北部、インドネシア、東南アジア
- ③ ステージ：ホワイトレッグシュリンプの稚エビ、未成エビで重篤。全ステージで感染。

## (2) 臨床検査

- ① 水温、塩分濃度などの環境変化や網入れなどのストレス負荷直後に発症し高率で死亡する。
- ② ストレス負荷直前までは盛んに摂餌し、消化管が餌で満たされていることもある。
- ③ 体側筋の点状あるいは広範囲な壊死による白濁 (特に末端節腹部および尾扇部)。
- ④ ストレス直後の高死亡率が数日間継続することもある。

## (3) 剖検所見

体側筋の点状あるいは広範な壊死による白濁 (特に腹部末端節および尾扇部)。リンパ様器官の肥大 (通常の3~4倍の大きさ) が認められる。

## (4) 診断法

### ① 初動診断法：RT-PCR 検査

材料；PCR用に採取した血球 (血リンパ)、筋肉組織、あるいはリンパ様器官。

プライマー；

4587F : 5'- CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA -3'

4914R : 5'- ACT-CGG-CTG-TTC-GAT-CAA-GT -3'

増幅産物サイズ；328bp

PCR反応；60℃で30分、95℃で2分の逆転写反応後、95℃で45秒、60℃で45秒を39サイクル行い、最後に60℃で7分間。

### ② 最終診断法：Nested-PCR 検査

i) 1st RT-PCR；初動診断法①と同じ。

ii) 2nd PCR

材料；(4) ② i) 1st PCR の増幅産物。

プライマー；

4725NF：5'-GGC-ACA-TGC-TCA-GAG-ACA-3'

4863NR：5'-AGC-GCT-GAG-TCC-AGT-CTT-G-3'

増幅産物サイズ；139bp

PCR 反応；95℃で2分の熱変性後、95℃で30秒、65℃で30秒、72℃で30秒を39サイクル行い、最後に72℃で2分間。

#### (5) 病理組織学的所見

以下の病変が報告されているが、必ずしも本疾病に特異的なものではない。

- ① 血球浸潤を伴う体側筋繊維の凝固壊死および進行した融解壊死が認められる。
- ② 体側筋組織は浮腫を起こし、やがて疎な結合組織に置換される。
- ③ 生体防御反応と考えられる、細胞の集まった球状組織(スフェロイド)の増生によるリンパ様器官の肥大が起こる。
- ④ 上記の球状組織はしばしば異所的に鰓、心臓、触角腺、腹部神経索などにも認められる。

#### (6) 類似病検査

腹節の筋肉は本疾病以外のさまざまな原因で白濁する。クルマエビ類やオニテナガエビ (*Macrobrachium rosenbergii*) のホワイトテイル病は本疾病と似た外観症状を呈するが、本疾病とは異なるそれぞれ別のノダウイルスにより起こる。また、急性に本疾病に罹患しても必ずしも肉眼的に明確に筋肉が白濁しない場合もあり、PCR によって判断する必要がある。

#### (7) 消毒

文献情報はないが、本ウイルスは塩素剤等通常の消毒剤により不活化されると考えられる。

#### (8) その他

不顕性感染しているエビから本ウイルスを検出するためには、活エビから採取した血リンパをサンプルに用い、かつ初動診断の RT-PCR のプロトコルを以下のように変更して行うとよい場合がある。

プライマー；初動診断の項(4)①に同じ

増幅産物サイズ；328bp

PCR 反応；55℃で30分、95℃で2分の逆転写反応後、95℃で15秒、60℃で30秒、68℃で45秒を39サイクル行い、最後に68℃で2分間。



バキュロウイルス・ペナエイ感染症  
Tetrahedral baculovirosis

担 当	検査チャート
都 道 府 県	<pre> graph TD     A["(1)疫学調査"] --- B["(2)臨床検査"]     B --- C["(3)剖検"]     C --- D["(4)①(ア)肝臓・中腸の検鏡"]     D -- "(+、±)" --&gt; E["(4)②PCR検査"]     D -- "(-)" --&gt; F["(4)①(イ)PCR検査"]     F -- "(+、±)" --&gt; E     F -- "(-)" --&gt; G["(-)"]     </pre>
増 養 殖 研 究 所	<pre> graph TD     H["(4)②PCR検査"] -- "(+)" --&gt; I["(+)"]     H -- "(-)" --&gt; J["(-)"]     </pre>
判 定	<p style="text-align: center;">+                      -                      -</p>
その他	<p>国内で発生が疑われる事例が確認された場合、別途、病理組織の観察を行うことが望ましい。</p>

# バキュロウイルス・ペナエイ感染症 Tetrahedral baculovirosis

疾病名：バキュロウイルス・ペナエイ感染症

Tetrahedral baculovirosis

病原体：*Baculovirus penaei* (BP) (バキュロウイルス科ヌクレオポリヘドロウイルス属)

## (1) 疫学調査

- ①本疾病は *Baculovirus penaei* (BP) に起因する。
- ②宿主域：クルマエビ類が感受性を有する可能性がある。
- ③発生地域：ハワイ及び南北アメリカ諸国。
- ④当該種苗は上記の地域から輸入したものである。
- ⑤当該養殖場は過去に上記地域から種苗を導入したことがある。

## (2) 臨床検査

摂餌量が減少し、成長が悪くなる。

## (3) 剖検所見

重篤な感染個体は中腸に白濁が認められることが多い。

## (4) 診断法

### ① 初動診断法：

(ア) 肝臓及び中腸を押しつぶして検鏡し、四面体型の包埋体を確認する。

### (イ) PCR 検査

材料；肝臓及び中腸の抽出 DNA。

プライマー；

BPA：5'-GAT-CTG-CAA-GAG-GAC-AAA-CC-3'

BPF：5'-TAC-CCT-GCA-TTC-CTT-GTC-GC-3'

増幅産物サイズ；196bp

反応；95℃で3分間、続いて94℃で30秒間、60℃で30秒間、72℃で1分間を30サイクル、最後に72℃で5分間。

### ② 最終診断法：PCR 検査

初動診断法のPCR検査に加えて、次の方法も実施する。

材料；肝臓及び中腸の抽出 DNA。

プライマー；

6581：5'-TGT-AGC-AGC-AGA-GAA-GAG-3'

6582：5'-CAC-TAA-GCC-TAT-CTC-CAG-3'

増幅産物サイズ；644bp

PCR 反応；95℃で5分間、続いて95℃で30秒間、65℃で30秒間、72℃で1分間を35サイクル、最後に72℃で7分間。

(5) 病理組織学的所見

肝臓又は中腸の上皮細胞の核が顕著に肥大し、クロマチンの減少及び周縁への移動がみられ、その核内に四面体型の包埋体が認められる。

(6) 類似疾病検査

バキュロウイルス性中腸腺壊死症 (BMN: Baculovirus Midgut Gland Necrosis) と比較すると顕微鏡による感染細胞の病理組織像は類似しているが、BMN は包埋体を形成しない。

(7) 消毒

文献情報はないが、本ウイルスは塩素剤等通常の消毒剤により不活化されると考えられる。また、低 pH (pH3 で30分)、熱 (60-90℃で10分)、紫外線照射 (累積線量  $7.08 \times 10^6 \mu\text{Wsec/cm}^2$ ) により不活化されるという報告がある。

(8) その他

なし





## エビの潜伏死病 (CMD) Covert mortality disease of shrimp: CMD

疾病名：エビの潜伏死病 (CMD)

Covert mortality disease of shrimp: CMD

病原体：Covert mortality nodavirus (CMNV)(ノダウイルス科 (Nodaviridae) の未分類ウイルス)

### (1) 疫学調査

- ① 宿主域：シロアシエビ (ホワイトレッグシュリンプ、バナメイエビ) (*Litopenaeus vannamei*)、クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*)、コウライエビ (*Fenneropenaeus chinensis*)。
- ② 発生地域：中国 (中国以外は未確認)。

### (2) 臨床検査

- ① 肝臓の変色や萎縮、横紋筋の白色化と壊死が認められる。
- ② 感染個体は池の底に深く隠れて、浅瀬、表層に現れない。

### (3) 剖検所見

- ① 肝臓が変色 (白色、赤色、灰色) し、萎縮、壊死が認められる。
- ② 胃、腸の空洞化や殻の軟化が認められる。
- ③ 横紋筋の白色化と壊死が認められる。

### (4) 診断法

#### ① 初動診断法：

##### (ア) 病理組織の観察

使用部位；横紋筋、肝臓およびリンパ様器官を採取する。

固定；Davidson 液で固定しヘマトキシリン・エオジン染色を行う。

病変の観察；横紋筋の凝固壊死、肝臓およびリンパ様器官の細管上皮の好酸性封入体、筋肉およびリンパ様器官の核濃縮を観察する。

##### (イ) RT - PCR 検査

材料；RT - PCR 用に採取した肝臓、横紋筋あるいはリンパ様器官から RNA を抽出する。

プライマー；

CMNV-7F1: 5' -AAA-TAC-GGC-GAT-GAC-G- 3'

CMNV-7R1: 5' -ACG-AAG-TGC-CCA-CAG-AC -3'

増幅産物サイズ；619bp

RNA 熱変性；65℃で 5 分変性後急冷。

RT-PCR 反応；50℃で 1 時間反応後、70℃ 15 分。その後、94℃で 4 分変性。その後、94℃で 30 秒、45℃で 30 秒、72℃で 40 秒を 35

サイクル行い、72℃で7分反応。

② 最終診断法：Nested-PCR 検査

i) 1st PCR；初動診断法①（イ）と同じ。

ii) 2nd PCR

材料；(4) ② i) 1st PCR の増幅産物。

プライマー；

CMNV-7F2: 5' -CAC-AAC-CGA-GTC-AAA-CC -3'

CMNV-7R2: 5' -GCG-TAA-ACA-GCG-AAG-G-3'

増幅産物サイズ；165bp

PCR 反応；94℃で4分変性。その後、94℃で20秒、40℃で20秒、72℃で20秒を30サイクル行い、72℃で7分反応。

(5) 病理組織学的所見

横紋筋の凝固壊死、肝臓およびリンパ様器官の細管上皮の好酸性封入体、筋肉およびリンパ様器官の核濃縮が認められる。

(6) 類似疾病検査

情報なし。

(7) 消毒

文献情報はないが、本ウイルスは塩素剤等通常の消毒剤により不活化されると考えられる。

(8) その他

電子顕微鏡観察で肝臓にエンベロープを持たない直径25nmのウイルス様粒子が認められる。

CMNV-7Probe-F：5' -GGC-GAT-GAC-GGC-TTG-A-3' と CMNV-7Probe-R：5' -GGC-GGT-GAG-ATG-GAT-TTT-3' を用いた蛍光インサイチュアハイブリダイゼーションによる診断法がある。

CMNV の RNA 依存 RNA ポリメラーゼ遺伝子の登録塩基配列は accession No. KM112247 である。





## 鰓随伴ウイルス病： Gill-associated virus disease (GAV)

疾病名：鰓随伴ウイルス病：

Gill-associated virus disease (GAV)

病原体：Gill-associated virus (genotype 2)(ロニウイルス科 オカウイルス属)

### (1) 疫学調査

- ① 宿主域：自然感染はウシエビ (*Penaeus monodon*) のみであるが、実験感染はブラウンタイガープローン (*P. esculentus*)、バナナエビ (*Fenneropenaeus merguensis*)、クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) でも起こり、死亡を引き起こす。
- ② 発生地域：オーストラリア、タイ、ベトナム  
オーストラリアでは本病によるウシエビの死亡が報告されている。タイ、ベトナムでは発症は報告されていないが、健康なウシエビから本ウイルスが検出されている。
- ③ 感染ステージ：クルマエビにおいて本ウイルスは、20 g以上の大きな個体は、6～13 gの小さな個体よりも感受性が低い。
- ④ キャリヤー：自然下では、本ウイルスに感染したウシエビ (*P. monodon*)。実験下では、ブラウンタイガープローン (*P. esculentus*)、バナナエビ (*F. merguensis*)、クルマエビ (*M. japonicus*) が宿主となることが明らかになっているため、これらのエビ類もキャリヤーになる可能性がある。

### (2) 臨床検査

- ① 胴体及び脚が赤くなる。
- ② 水面近くや池の端を遊泳する。摂餌しなくなる。

### (3) 剖検所見

鰓のピンク色から黄色への退色が認められる。

### (4) 診断法

- ① 初動診断法：RT-PCR 検査

材料；新鮮な鰓あるいはリンパ様器官

プライマー；

GY1：5'-GAC-ATC-ACT-CCA-GAC-AAC-ATC-TG-3'

GY4：5'-GTG-AAG-TCC-ATG-TGT-GTG-AGA-CG-3'

(YHV および GAV 共通。増幅産物サイズ；794bp)

PCR 反応；抽出した核酸および対照 RNA をテンプレートとして、上記のプライマーセット (GY1/GY4) を用いて 1 ステップの RT-PCR 反応を行う (キット使用)。反応は、50℃で 30 分間逆転写反応後、94℃で 2 分間処理し、次いで PCR 反応として、95℃で 30 秒間、66℃で

30 秒間、68℃で 45 秒間を 35 サイクル、最後に 68℃で 7 分間。

② 最終診断法：Nested-PCR 検査

i) 1st PCR；初動診断法①と同じ。

ii) 2nd PCR

材料；(4) ② i) 1st PCR の増幅産物

プライマー；

GY2：5'-CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3'

G6：5'-GTA-GTA-GAG-ACG-AGT-GAC-ACC-TAT-3'

増幅産物サイズ；406bp

注：GY2 の 7 番目の塩基は T であるが、この位置の塩基は GAV の配列に完全に一致させるためには C にする必要がある。ただし、これまで T のままだでも GAV の増幅に支障があるという報告はない。

PCR 反応；反応は、95℃で 15 分の後、95℃で 30 秒間、66℃で 30 秒間、72℃で 45 秒間を 35 サイクル行い、最後に 72℃で 7 分間。

増幅産物の配列解析を行い、遺伝子型を確認する。

(5) 病理組織学的所見

詳しい病理学的所見は無い。

(6) 類似疾病検査

イエローヘッド複合ウイルス群 (ロニウイルス科 オカウイルス属) には、7 つの遺伝子型が知られ、gill-associated virus (GAV) はそのうちの遺伝子型 2 である。YHV は遺伝子型 1 であり、イエローヘッド病の病原体である。ウシエビにおいて YHV (遺伝子型 1) は、ポストラバ (PL) 15 以降のものが感染しやすい。その他 4 つの遺伝子型 (3~6) は、東アジア、アジアおよびオーストラリアの健康なウシエビで一般的に検出されるが、イエローヘッド病とほとんど関連がない。遺伝子型 7 の病原性は不明である。YHV と GAV は類似ウイルスであるが、RT-PCR により区別できる。

(7) 消毒

文献情報はないが、本ウイルスは塩素剤等通常の消毒剤により不活化されると考えられる。

(8) その他

有効な予防、治療法は知られていない。





# モノドン型バキュロウイルス感染症 Spherical Baculovirosis

疾病名：モノドン型バキュロウイルス感染症

Spherical Baculovirosis

病原体：Penaeus monodon-type baculovirus (MBV)(バキュロウイルス科、ヌクレオポリヘドロウイルス属)

## (1) 疫学調査

- ① 本疾病は *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV 又は PemoNPV N P V) に起因する。
- ② 宿主域：ウシエビ (ブラックタイガー)(*Penaeus monodon*)、テンジクエビ (*P. merguensis*) など。
- ③ 発生地域：中国・台湾を始めとする太平洋・インド洋、中近東、地中海、アフリカ、ハワイ、タヒチ、南北アメリカ諸国
- ④ 当該種苗は上記の地域から輸入したものである。
- ⑤ 当該養殖場は過去に上記地域から種苗を導入したことがある。

## (2) 臨床検査

摂餌量が減少し、成長が悪くなる。

## (3) 剖検所見

重篤な感染個体は中腸に白濁が認められることが多い。

## (4) 診断法

### ① 初動診断法：

(ア) 肝臓及び中腸を押しつぶして検鏡し、球状の包埋体を確認する。

### (イ) PCR 検査

材料；肝臓及び中腸の抽出 DNA。

プライマー；

261F：5'-AAT-CCT-AGG-CGA-TCT-TAC-CA-3'

261R：5'-CGT-TCG-TTG-ATG-AAC-ATC-TC-3'

増幅産物サイズ；261bp

PCR 反応；95℃で5分間、続いて94℃で30秒間、60℃で30秒間、72℃で30秒間を35サイクル、最後に72℃で7分間。

### ② 最終診断法：PCR 検査

初動診断法の PCR 検査に加えて、次の方法も実施する。

材料；肝臓及び中腸の抽出 DNA。

プライマー；

MBV1.4F：5'-CGA-TTC-CAT-ATC-GGC-CGA-ATA-3'

MBV1.4r：5'-TTG-GCA-TGC-ACT-CCC-TGA-GAT-3'

増幅産物サイズ；533bp

反応；96℃で5分間、続いて94℃で30秒間、65℃で30秒間、72℃で1分間を40サイクル、最後に72℃で7分間。

(5) 病理組織学的所見

肝臓又は中腸腺の上皮細胞の核が顕著に肥大し、クロマチンの減少及び周縁への移動が認められ、その核内に球状の包埋体が認められる。

(6) 類似疾病検査

バキュロウイルス性中腸腺壊死症 (BMN:Baculovirus Midgut Gland Necrosis) と比較すると顕微鏡による感染細胞の病理組織像は類似しているが、BMNは包埋体を形成しない。

(7) 消毒

文献情報はないが、本ウイルスは塩素剤等通常の消毒剤により不活化されると考えられる。

(8) その他

垂直感染をさけるため、卵は清浄な海水でよく洗浄し、卵や幼生が親エビの糞便等による汚染を受けないようにする。



### 3. 貝類等





# アワビヘルペスウイルス感染症 Infection with abalone herpesvirus

疾病名：アワビヘルペスウイルス感染症

Infection with abalone herpesvirus

病原体：Abalone herpesvirus (AbHV)( マラコヘルペスウイルス科ハリオチスウイルス属)

## ( 1 ) 疫学調査

### ① 宿主域

- ・台湾産のトコブシ (*Haliotis diversicolor*)
- ・豪州産の下記アワビ類 2 種とこれらのハイブリッド  
ブラックリップ・アバロニ (*Haliotis rubra* Leach)  
グリーンリップ・アバロニ (*Haliotis laevigata* Donovan)
- ・汚染海域の他の無脊椎動物に症状は見られない。
- ・日本産のクロアワビ (*Haliotis discus*) とトコブシ病貝との同居感染試験では発病が確認されていない。

② 発生地域：台湾 ( 東北部 )、オーストラリア ( ビクトリア州およびタスマニア島 )

③ 当該種苗は上記の地域から輸入したものである。

④ 当該養殖場は過去に上記地域から種苗を導入したことがある。

### ⑤ 発生状況：

- ・オーストラリアではアワビの年齢に関係なく発生し、90 % 以上の死亡率であった。
- ・台湾においても親貝と稚貝の両方で発生が確認され、70-80 % の死亡率であった ( 水温 16 - 19℃ )。
- ・養殖池では臨床的な症状が確認されてから 3 日以内に死亡が起きることが報告されており、実験感染度も同様に死亡することが確認されている。
- ・実験感染 ( 病貝ホモジネート濾液筋肉注射 ) では攻撃後 2 - 5 日以内に 100% が死亡した例も報告されている。

## ( 2 ) 臨床検査

- ① 光からの逃避行動がない。
- ② 基板への付着力が低下する。
- ③ 特に症状が出ない場合もある。

## ( 3 ) 剖検所見

- ① 外套膜が萎縮する。
- ② 腹足が萎縮し、不規則に縁辺が巻き上がり、硬直化する。
- ③ 腹足がほとんど動かなくなる。
- ④ 口球が膨張し突出する。

- ⑤ 歯舌が反転してめくり上がる。
- ⑥ 粘液が過度に分泌される。

#### (4) 診断法

##### ① 初動診断法：PCR 検査

材料；神経組織やそれを含む筋肉の抽出 DNA。組織は固定液 (80% エタノール；19.75% グリセロール；0.25%  $\beta$  -メルカプトエタノール)、または、95% エタノール中で保存する。20 mg 程度の組織から、市販のキット等を用いて DNA を抽出し、 $\sim 100$  ng/ $\mu$ l の濃度で DNA を溶出したのち、下記のプライマーセットで PCR 反応を行う。

プライマー；

AbHV-16：5'-GGC-TCG-TTC-GGT-CGT-AGA-ATG-3'

AbHV-17：5'-TCA-GCG-TGT-ACA-GAT-CCA-TGT-C-3'

増幅産物サイズ；522 - 558 bp\*

増幅領域；40900 - 41457 (GenBank accession No. HM631981)

PCR 反応；95℃で 15 分間、次いで 94℃で 30 秒間、52℃で 30 秒間、74℃で 45 秒間を 40 サイクル、最後に 72℃で 7 分間。その後 4℃で保持する。

\* 本ウイルスには変異株が存在し、それによって 522bp から 588bp までの異なるサイズの増幅産物が得られる。

##### ② 最終診断法：(ア)PCR 検査

材料；神経組織やそれを含む筋肉の抽出 DNA。

PCR 条件は初動診断法と同じ。

##### (イ) 遺伝子配列解析

材料；②(ア)の PCR 増幅産物。

方法；遺伝子配列解析

判定；データベースに登録されている AbHV ゲノムの塩基配列 (GenBank accession No. HM631981) と高いレベルで相同性を示すことを確認する。

#### (5) 病理組織学的所見

- ① 頭部神経節、足側部神経節、口球神経節等の神経組織に炎症が認められる。
- ② 神経組織以外の器官ではこれまでに病変が観察されていない。
- ③ 電子顕微鏡観察では、エンベロップを持ち、電子密度の高い核を持つ六角形のウイルス (直径 100 - 110 nm) が観察される。

#### (6) 類似疾病検査

情報なし。

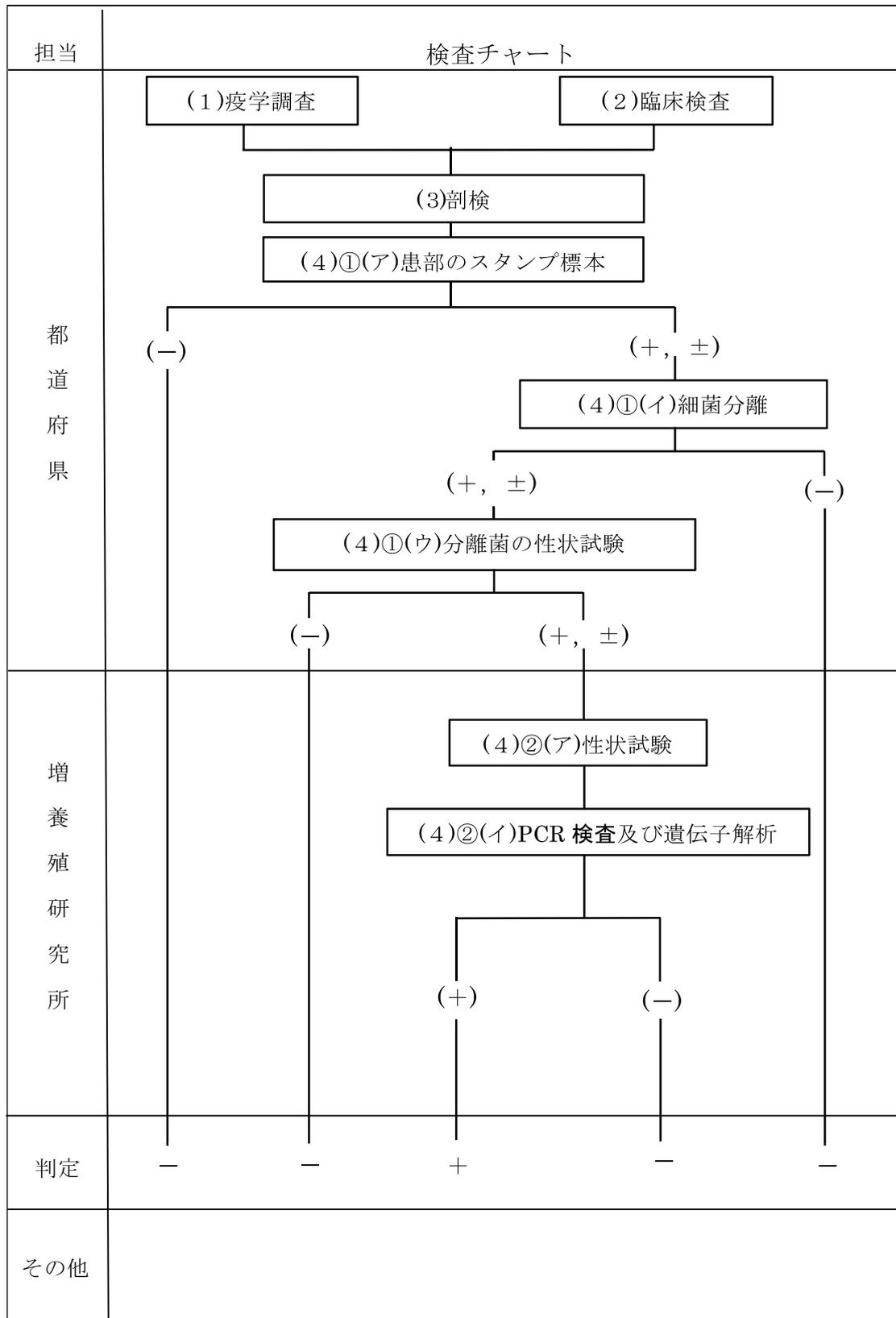
#### (7) 消毒

情報は無いが、本ウイルスは通常の塩素剤等の消毒剤で不活化されることが考えられる。

(8) その他

- ① AbHV は極めて病原性が強く、病害を低減させる方法はない。
- ② 飼育水を介した水平感染が成立する。
- ③ OIE では、移動制限やしかりとした管理が可能な養殖場での飼育を推奨している。  
また、発病があれば、飼育貝の廃棄、飼育水・施設の消毒、養殖再開前の無病のアワビの試験的飼育を推奨する。

アワビの細菌性膿疱症  
Pustule disease of abalone/Blister disease of abalone  
(caused by *Vibrio furnissii* (= *V. fluvialis* biotype II))



アワビの細菌性膿疱症  
Pustule disease of abalone/Blister disease of abalone  
(caused by *Vibrio furnissii* (= *V. fluvialis* biotype II))

疾病名：アワビの細菌性膿疱症

Pustule disease of abalone/Blister disease of abalone

(caused by *Vibrio furnissii* (= *V. fluvialis* biotype II))

病原体：*Vibrio furnissii* (= *V. fluvialis* II) (プロテオバクテリア門ビブリオ目ビブリオ科ビブリオ属)

(1) 疫学調査

- ① 宿主域：エゾアワビ (*Haliotis discus hannai*) が宿主として知られている。他種のアワビの感受性は調べられていない。
- ② 発生地域：中国の大連の養殖場で確認された。本疾病の発生はこの地域に限定的であるが、原因細菌である *Vibrio furnissii* (= *V. fluvialis* biotype II) は世界中の河口等で確認される常在菌である。

(2) 臨床検査

- ① 足部に白色の膿を含む膿疱ないし水疱状の病変を形成する。
- ② 細菌が外套膜、消化管、消化盲嚢、生殖巣、体液等で増殖し、ほとんどの器官で細菌が見られるようになると摂食を停止し、やがて死亡する。

(3) 剖検所見

足部に白色の膿を含む膿疱ないし水泡状の病変を呈する。

(4) 診断法

① 初動診断法：

(ア) 患部のスタンプ標本 (スメア) の観察

材料；新鮮な膿疱病変部。

標本作製法；膿疱を切開し、スタンプまたはスメア標本を作製する。

染色と観察法；ギムザ染色で細菌を染色し、顕微鏡で、短桿菌を探索する。

(イ) 細菌分離

材料；新鮮な個体から、膿疱状病変の内容物を無菌的に採取し、使用する培地の液体培地で 10 倍に希釈して材料とする。

菌の分離法；TSA(Tryptic Soy Agar)(NaCl 濃度 2-3%) または BHI Agar(Brain Heart Infusion Agar)(NaCl 濃度 2-3%) または Marine Agar または TCBS Agar(Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar)(NaCl 濃度 2-3%) を用いて、組織 (材料) から細菌を分離する。24-37℃で 2～4 日培養する。

(ウ) 分離菌の性状試験

材料；① (イ) のプレート培地にみられた優勢種と思われる 1 コロニーから新し

い培地に継代培養した細菌。

試験法；スメア標本を作製し、ギムザ染色を施し、短桿菌を確認する。グラム鑑別でグラム陰性菌を示す。ウェットマウントで顕微鏡観察し、活発な運動を確認する。O/129 ディスクに感受性がある。オキシダーゼとカタラーゼが陽性である。

② 最終診断法：

(ア) 性状試験。

(4) ①のウと同じ。

(イ) PCR 検査および配列解析

材料；(4) ①のウと同じ。

プライマー；

F-primer: 5'-ACT-CTT-ATT-TAC-GTC-AAA-GGA-CAG-3'

R-primer: 5'-TCT-TGC-AGC-GCT-TCA-AGA-ATT-TC-3'

増幅 DNA 断片サイズ；722 bp

反応；95℃で4分間，続いて95℃で1分，55℃で30秒，72℃で1分を30サイクル行い，最後に72℃で7分。

判定；増幅産物の配列解析を行い，データベースに登録されている *V. furnissii* の mreB 遺伝子の塩基配列 (GenBank accession No. DQ907418.1) と高いレベルで相同性を示すことを確認する。

(5) 病理組織学的所見

病巣の顕著な炎症により、結合組織と筋組織は融解壊死する。病巣は初め足部にみられるが、病気の進行と共に全身組織にみられる。病気の末期では、病巣の中心には血球と *V. furnissii* だけが残る。

(6) 類似疾病検査

*Vibrio campbellii*、*Vibrio harveyi*、*Vibrio carchariae* が同様の疾病を起こすという報告がある。膿疱や水疱は生じないが、足部からは、これらの菌以外の細菌が検出されることがある。また、細菌ではないが、*Perkinsus* sp. による感染が足部に黄色い膿疱ないし膿瘍を形成することが知られている。

(7) 消毒

使用器具及び手指の消毒は、通常の細菌を対象とした消毒法を用いる。

(8) その他

なし。





カキヘルペスウイルス 1 型変異株感染症 (μvar に限る。)  
Infection with Ostreid herpesvirus 1 microvariants (limited to OsHV-1 μvar)

疾病名：カキヘルペスウイルス 1 型変異株感染症 (μvar に限る。)

Infection with Ostreid herpesvirus 1 microvariants (limited to OsHV-1 μvar)

病原体：Ostreid herpesvirus 1 microvariants (limited to OsHV-1 μvar) (Malacoherpesviridae 科 *Ostreavirus* 属)

( 1 ) 疫学調査

- ① 宿主域：マガキ、ポルトガルガキ
- ② 発生地域：ヨーロッパ諸国
- ③ 夏の高水温期によく見られる

( 2 ) 臨床検査

- ① 短期間で大量死が観察される
- ② 口を開ける、殻を閉じる動きが緩慢になる

( 3 ) 解剖所見

特徴的な所見はない。

( 4 ) 診断法

- ① 初動診断法：PCR － REA 検査

・ PCR 反応

材料；外套膜、鰓、神経節等の組織抽出 DNA

プライマー；

C2：5' - CTC-TTT-ACC-ATG-AAG-ATA-CCC-ACC-3'

C6：5' - GTG-CAC-GGC-TTA-CCA-TTT-TT-3'

増幅産物サイズ；700bp

PCR 反応；94℃で 10 分間反応後、94℃で 30 秒、63℃で 30 秒、72℃で 30 秒を 40 サイクル、後に 72℃で 7 分。

・ REA 反応

材料；上記 PCR 増幅産物

制限酵素；Mfe I

反応条件；37℃、15 分～一晩

判定；増幅産物が約 500bp と約 200bp に切断されていることを確認する。

- ② 最終診断法：

(ア) PCR 法

初動診断法①(ア)と同じ

(イ) PCR 法

材料；外套膜、鰓、神経節等の組織抽出 DNA

プライマー；

IA2: 5' - AAT-CCC-CAT-GTT-TCT-TGC-TG-3'

IA1: 5' - CGC-GGT-TCA-TAT-CCA-AAG-TT-3'

増幅産物サイズ；約 600bp

PCR 反応；(ア)と同じ

(ウ) 遺伝子配列解析

材料；(4)②(ア)および(イ)の増幅産物

方法；遺伝子配列解析

判定；Segarra *et al.* (Virus research 153, pp92-99, 2010)に記載されている OsHV-1  $\mu$ Var の塩基配列との相同性を確認する。なお C2C6 セットによる配列はデータベース GenBank accession no. HQ842610 に登録されている。

(5) 病理組織学所見

核の肥大、偏在を伴う病変が結合組織で観察される。

(6) 類似疾病検査

情報なし。

(7) 消毒

情報は無いが、本ウイルスは塩素剤等通常の消毒剤で不活化され则认为られる。

(8) その他

なし。





## パーキンサス・クグワディ感染症 Infection with *Perkinsus qugwadi*

疾病名：パーキンサス・クグワディ感染症

Infection with *Perkinsus qugwadi*

病原体：*Perkinsus qugwadi* (アピコンプレックス門パーキンサス綱パーキンサス属)

### (1) 疫学調査

- ① 宿主域：宿主はホタテガイ (*Mizuhopecten yessoensis*) である。
- ② 発生地域：カナダのブリティッシュコロンビア州。
- ③ ブリティッシュコロンビア州では、日本から移入したホタテガイで発生した。
- ④ ホタテガイには発育段階を問わず感染する。

### (2) 臨床検査

- ① 大量死が認められる。
- ② 特徴的な臨床症状は報告されていない。

### (3) 剖検所見

- ① 消化腺に白い膿疱が形成される。
- ② 生殖腺の濁りと肥大が認められる。

### (4) 診断法

#### ① 初動診断法：

##### (ア) スタンプ標本の顕微鏡観察

使用部位：生殖腺の病変部。

遊走子の観察：スライドグラスにスタンプ標本を作製し、定法どおりライトーギムザ染色もしくはそれと同等の染色法で遊走子を観察する。

##### (イ) PCR 検査

材料：PCR 用に採取した生殖腺、消化腺、外套膜、鰓組織。

プライマー；

PqguF7TC: 5' -CCA CTC TGG TAG TCT TGT CTT C -3'

PQ3R: 5' -AGA ATG GCG ACG CTG ATG AA -3'

増幅産物サイズ：281bp

PCR 反応；94℃で3分変性。その後、94℃で30秒、54℃で30秒、72℃で30秒を40サイクル行う。最終伸長反応を、72℃で10分行う。

#### ② 最終診断法：

##### (ア) PCR 検査

初動診断法①(イ)と同じ。

##### (イ) 遺伝子配列解析 (SSU rRNA 遺伝子)

材料；最終診断法② (ア) PCR用に抽出したDNA。

プライマー；

Pm18S-1098F: 5' -AGG AAT TGA CGG AAG GGC A -3'

PqITS-22R: 5' -CGC AGT TTA AAT GAA TCG GT -3'

増幅産物サイズ：1,796 bp

PCR反応；94℃で5分変性。その後、94℃で30秒、54℃で30秒、72℃で45秒を30サイクル行う。最終伸長反応を、72℃で7分行う。

解析；増幅産物について塩基配列を決定し、*Perkinsus qugwadi*(GenBank accession no.AB716689)との相同性を確認する。

#### (5) 病理組織学的所見

生殖腺、消化腺、外套膜、鰓組織などの組織内に形態的に *Perkinsus qugwadi* のものと考えて矛盾しない栄養体、トモント、遊走子嚢や遊走子などが観察される。

#### (6) 類似疾病検査

他の貝類で *Perkinsus* 属の感染症が報告されている。*Perkinsus qugwadi* は、他の *Perkinsus* 属原虫と異なり、液状チオグリコレート培地で遊走子嚢が発達せず、ルゴール液で紺色に染色されない特徴を有している。また、他の *Perkinsus* 属の原虫とは SSU rRNA 遺伝子の塩基配列により区別できる。

#### (7) 消毒

他の *Perkinsus* 属原虫では、N-ハラミン消毒剤、淡水処理、紫外線処理が原虫細胞の不活化に有効であったとの報告がある。

#### (8) その他

本原虫に感染耐化した耐性を有する親貝を選別し、本病抵抗性を有する家系を作出する方法が本病の対策として有効であることが報告されている。



マボヤの被囊軟化症  
Soft tunic syndrome

担当	検査チャート
都道府県	<pre> graph TD     A["(1)疫学調査"] --- B["(2)臨床検査"]     A --- C["(3)剖検"]     B --- C     C --- D["(4)①(ア)PCR検査"]     C --- E["(4)①(イ)組織検査"]     D --- F["(-)"]     D --- G["(+, ±)"]     E --- H["(+, ±)"]     E --- I["(-)"]     </pre>
増養殖研究所	<pre> graph TD     G --- J["(4)②(ア)PCR検査"]     H --- K["(4)②(イ)組織検査"]     J --- L["(+)", "-"]     K --- M["(+)", "-"]     </pre>
判定	<p>-            +            -            +            -            -</p>
その他	<p>初動診断では(ア)または(イ)のいずれかを行う。 最終診断では(ア)または(イ)のいずれかを行う。</p>

## マボヤの被囊軟化症 Soft tunic syndrome

疾病名：マボヤの被囊軟化症

Soft tunic syndrome

病原体：*Azmiobodo hoyamushi*(ユーグレノゾア門キネトプラスト綱ネオボド目アズミオボド属)

### (1) 疫学調査

- ① 宿主域：マボヤ (*Halocynthia roretzi*) およびエボヤ (*Styela clava*)
- ② 発生地域：韓国および日本 (国内では宮城県牡鹿半島以北から岩手県)
- ③ 感染ステージ：1年以上の個体で発病。
- ④ キャリヤー：感染マボヤがキャリヤーとなる。

### (2) 臨床検査

- ① 初期には水管周辺から被囊が軟化。
- ② 重篤になると被囊全体が非常に柔らかく薄くなる。

### (3) 剖検所見

軟体部に著変は認められない。

### (4) 診断法

#### ① 初動診断法：

##### (ア) PCR 検査

材料；活個体被囊から海水中に遊出させた鞭毛虫または新鮮被囊。

プライマー；

ProtoHoya 18S-145：5'-AAG GGG TGC TTC CGA TCC GTG G-3'

ProtoHoya 18S-679r：5'-AAG GAT GGG ACG GAA CCG ACT GC-3'

増幅産物サイズ；535bp

反応；98℃で30秒間、次いで98℃で10秒間、72℃で30秒間を40サイクル、最後に72℃で5分間。

#### (イ) 組織検査

材料；ダビットソン固定を施した水管周辺の被囊

標本；パラフィン薄切切片にヘマトキシリン・エオジン染色を施す。

観察；ヘマトキシリンに染まり、一方の端が細長く伸長する鞭毛虫 (10-14 x 2-3μm) を観察。

#### ② 最終診断法：

##### (ア) PCR 検査

初動診断法の PCR 検査に加えて、次の方法も実施

材料；初動診断の項に同じ

プライマー；

AhF：5'-GCC TCT GTG GTT TGC TCC TTC GTG T -3'

AhR：5'-TAC TGG GCG GCT TGG ATC TCG T-3'

増幅産物サイズ；642bp

PCR 反応；95℃で3分間、次いで95℃で1分間、64℃で34秒間、72℃で1分間を40サイクル、最後に72℃で5分間。

(イ) 組織検査 (① (イ) と同様)

(5) 病理組織学的所見

- ① 被囊繊維は走行が乱れ、頻りに粗な部分が認められる。
- ② ヘマトキシリン・エオジン染色で、被囊中にヘマトキシリンに染まる鞭毛虫が見られる。

(6) 類似疾病検査

情報なし。

(7) 消毒

ホルマリン、過酸化水素、ピチオノール、二酸化塩素、およびブロナポールのそれぞれに原因体を24時間浸漬した場合の各薬剤の50%効果濃度 (EC50) は10mg/L以下。

(8) その他

なし。



# 病性鑑定資料



# 1. 魚類

ウイルス性出血性敗血症 (IV a 型を除く。)(VHS)

サケ科魚類のアルファウイルス感染症 (SAV)

流行性造血器壊死症 (EHN)

ピシリケッチア症

レッドマウス病 (ERM)

旋回病

コイ春ウイルス血症 (SVC)

コイヘルペスウイルス病 (KHV)

マダイのグルゲア症



# ウイルス性出血性敗血症 Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS)

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：ウイルス性出血性敗血症

英名：Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS)

本病は古くからいろいろな名前と呼ばれており、初発地域にちなみエグトベド (Egtved) 病や、その症状から伝染性腎臓腫脹・肝臓変性病 (INuL) と称されることもあった。現在では、ウイルス性出血性敗血症と称される。

- ② 病原体：Viral haemorrhagic septicaemia virus (以下 VHSV)

ラブドウイルス科ノビラブドウイルス属に属する。形態は写真1のように弾丸型を呈する (写真1)。これまでに VHSV は大きく I, II, III 及び IV 型の4つの遺伝子型に分けられることが報告されており、一部の遺伝子型についてはさらに亜型にも細分される。各遺伝子型の主な分離地域は以下の通りである。

**I、Ia、Ib、Ic、Id、Ie 型**；ヨーロッパ大陸及びその周辺海域

(I、Ic 型による疾病は近年確認されていない。)

**II 型**；バルト海

**III 型**；ヨーロッパ周辺海域及びフレミッシュ・キャップ (北大西洋カナダ沖)

**IVa 型\***；日本及び韓国周辺海域及び北米太平洋沿岸域

\*遺伝子型 IVa については我が国に既存の VHSV であるため、特定疾病の対象外となる。

**IVb 型**；北米五大湖

**IVc 型**；カナダ大西洋側の河口 (汽水) 域

### (2) 地理的分布

- ① 初発国 (初確認国)：デンマーク

- ② 分布域：

VHS はヨーロッパ大陸の多くの国において、サケ科魚類、主に淡水養殖ニジマスを中心に発生している (写真2)。また、発生事例は少ないがノルウェー、スウェーデン及びフィンランドでは海中養殖ニジマスでも報告されている。VHSV は、米国ワシントン州のマスノスケやギンザケ、アラスカ湾及びカナダ太平洋側のタイヘイヨウニシンやタイヘイヨウタラからも分離されている。2003年には五大湖で新たな遺伝子型 (IVb 型) の VHSV が分離され、2005年以降天然魚における大量死を引き起こした。日本においても1996年に養殖ヒラメにおいて初めて VHS が発生し、それ以降養殖ヒラメを中心にほぼ毎年発生している。なお、これまで本ウイルスが南半球から検出された報告はない。

## (3) 宿主域

### ① 自然発病：

ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) (写真3)、ブラントラウト (*Salmo trutta*)、グレイリング (*Thymallus thymallus*)、ノーザンパイク (*Esox lucius*)、ターボット (*Scophthalmus maximus*)、タイセイヨウタラ (*Gadus morhua*)、グリーンランドハリバット (*Reinhardtius hippoglossoides*)、マスノスケ (*Oncorhynchus tshawytscha*)、ギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*)、タイヘイヨウニシン (*Clupea pallasii*) (写真4)、タイヘイヨウタラ (*Gadus macrocephalus*) (写真5)、マスキーパイク (*Esox masquinongy*)、ブルーギル (*Lepomis macrochirus*) (写真6)、コクチバス (*Micropterus dolomieu*) など30魚種以上から分離されている。

日本においてはヒラメ (*Paralichthys olivaceus*)、マアジ (*Trachurus japonicus*)、イカナゴ (*Ammodytes personatus*)、メバル (*Sebastes inermis*)、タケノコメバル (*Sebastes oblongus*)、マダイ (*Pagrus major*)、カンパチ (*Seriola dumerili*) から分離されている。

### ② 実験感染：感染実験においても多くの魚種に対する病原性が報告されている (OIE VHS マニュアル参照)。

近年、日本在来淡水魚種に対する遺伝子型 IVb VHSV (五大湖分離株) の病原性が調べられており、カジカ (*Cottus pollux*) やメダカ (*Oryzias latipes*) (写真7) 及びヨシノボリ (*Rhinogobius* sp.) が感受性を示し、特にカジカとメダカの感受性は非常に高いことが報告されている (Ito and Olesen, 2013)。

## (4) 発生の特徴

VHSV は、あらゆる年齢の魚にも容易に伝染し、感染後の生残魚は長期間ウイルスキャリアになる。本ウイルスは、鰓を通して魚に侵入すると思われる。VHSV の感染源は、養殖魚や野生魚中の顕性感染魚ならびに不顕性キャリアである。VHSV は糞、尿、生殖液中からも検出されるが、ウイルスが最も大量に存在するのは腎臓、脾臓、脳、消化管である。一旦、VHSV がある養殖魚群ないしは水系に定着すると、キャリアのために本病は地方病的流行をするようになる。

VHSV に対する感受性は、同一魚種においても異なり、若齢魚ほど顕性感染を受けやすい。本病の発生には水温が大きく関与し、一般に低水温 (1 ~ 5℃) では日間死亡率は低いですが累積死亡率は高く、高水温 (15 ~ 18℃) では、急激な死亡を示すが累積死亡率は高くない。VHS は年間を通して発生するが、特に水温の上昇時や、不規則に変化する春に多く発生する。

## (5) 外観症状

病魚には遊泳不活発や異常遊泳がみられる。外観症状としては、眼球突出、腹部膨満、貧血、および眼球・皮膚・鰓・鰭基部の出血がみられる (写真3、4、5、6、7)。

## (6) 剖検所見

剖検すると腹膜・腸管膜・内臓脂肪組織の広範囲の出血、腎臓と肝臓の充血・腫脹・褪色、骨格筋の点状出血（写真4）などがみられる。病理組織学的変化は、一般に肝臓、腎臓、脾臓および骨格筋に限定してみられ、肝、腎、脾臓においては壊死的変化、すなわち空胞化、核濃縮、核融解、リンパ球浸潤、時には封入体形成が局部的ないしは広範に起こる。腎臓および脾臓の造血組織に初期感染病巣が形成される。骨格筋においては、血液細胞（主として赤血球）が筋束および筋線維中にうっ滞するが、傷害はほとんど起こらない。

## (7) 消毒（栗田ら、2002）

- ① 30% プロパノールで 30 秒間の消毒 (PBS(-))、20% プロパノールで 2 分間の消毒 (人工海水)
- ② 2.5% フェノールで 5 分間の消毒 (PBS(-), 人工海水)
- ③ 0.1% クレゾールで 5 分間の消毒 (PBS(-))、0.25% クレゾールで 15 分間の消毒 (人工海水)

## (8) 防除法

現在のところ、行政的防除手段を含む公的な健康監視計画の実施と遺伝的手法による選抜・属間雑種作出などによるほかはない。ワクチンは実験段階であり、実用には至っていない。

## 2. 検体採取

### (1) 検体の収集

- ① できるだけ瀕死魚または当該疾病の外観症状を示す生存魚を採取する。
- ② 被検魚の収集から採材まではできるだけ速やかに行なうことが望ましく、できれば発生現場で臓器試料を摘出する。
- ③ 被検魚を検査機関まで輸送する場合は、生きたままビニール袋などに入れて酸素パッキングし、水温変動に注意して搬送するか、検査対象魚を発生現場で即殺後、氷冷または冷蔵状態で 48 時間以内に搬送する。搬送の際、被検魚が凍結することのないよう注意する。
- ④ 被検魚として死魚しか入手できない場合は、なるべく新鮮なものを採取し、個体ごとにビニール袋などで密閉包装して氷冷または冷蔵状態で搬送する。

### (2) 検査のための試料の採材

- ① FA100（D S ファーマアニマルヘルス）などの麻酔剤で麻酔するか、または大型魚では撲殺する。
- ② 外観症状を記載する。
- ③ 魚体表面を 70% アルコール綿またはアルコール噴霧器で消毒し、滅菌したハサミ、ピンセットなどで解剖する（被検魚採取から遅くとも 48 時間以内に行なう）。
- ④ 内臓の異常を調べ、剖検所見を記載の上、検査に必要な部位を採取する。

### (3) ウイルス検査のための臓器試料の採材

- ① 明らかに病徴を呈している魚
  - (a) 全長 4 cm 以下の仔魚  
魚全体を試料とする。体表を消毒後、卵黄嚢がある場合は除去する。
  - (b) 全長 4 cm ~ 6 cm の魚  
腎臓を含む内臓全体を試料とする。
  - (c) 全長 6 cm 以上の魚  
腎臓、脾臓、心臓及び脳を試料とする。
- ② 病徴の見られない魚（不顕性感染が疑われる魚）
  - (a) 未成熟魚  
腎臓、脾臓、心臓及び脳を試料とする。
  - (b) 成熟親魚  
上記臓器の他に卵巣漿液<sup>\*1</sup>を試料とする。  
<sup>\*1</sup> 卵巣漿液は、必ず開腹前に滅菌したピペットなどで泌尿生殖孔より採取し、他の組織試料とは別の容器に入れる。サンプル量は 5 尾を 1 検体とし、合計で約 1 mL 以内とする。

### (4) ウイルス検査のための臓器試料 / 液体試料の一般的調製法

- ① 試料の輸送と抗生物質処理  
プールした臓器または卵巣漿液は、ウイルス分離を行うまで滅菌したガラス容器等に入れ、4℃に保存する。採取した臓器の搬送に時間が掛かる場合、混入した雑菌の繁殖を抑えるため、臓器を抗生物質を添加した輸送液<sup>\*2</sup>（少なくとも試料の 5 倍容量）に入れ研究室に送ることもある。  
<sup>\*2</sup> 輸送液：イーグル最少必須培地（以下 MEM 培地）にペニシリン 200IU/ mL、ストレプトマイシン 200 µg/ mL 及びカナマイシン 200 µg/ mL の併用が適当である。輸送時間が 12 時間を超えるようであれば、ウイルスを安定化するために血清を 5 ~ 10% 加える。
- ② 臓器試料のホモジネートの調製
  - (a) 操作は氷冷下（0 ~ 4℃）で行うことが望ましい。
  - (b) 臓器試料と抗生物質（ペニシリン 100IU/ mL とストレプトマイシン 100 µg/ mL）を含む MEM 培地とを 1 : 10 になるよう混合し、乳鉢またはガラスホモジナイザー等で磨砕しホモジネート液を作製する。
  - (c) ホモジネート液を 2,000 x g で 15 分間遠心分離し、上清を回収する。
  - (d) 回収した上清を孔径 0.45µm のシリンジフィルターを用い、ろ過滅菌し、培養細胞への接種原とする。またはペニシリン 1,000IU/ mL、ストレプトマイシン 1,000 µg/ mL 及び牛胎児血清（以下 FBS）10% を含む MEM 培地を用いてホモジネート液を作製し、遠心分離後、回収した上清を 4℃で一晩放置したものを接種原としても良い。
  - (g) 卵巣漿液は、臓器試料と同様の方法で遠心し、その上清を上記 (d) を参考にシリンジフィルターもしくは抗生物質により滅菌し接種原とする。
- ③ 試料等の処理

検査試料および解剖器具などは病原体による汚染・伝播を防ぐために以下の処置を施す必要がある。被検魚、臓器試料の残りは焼却処分、輸送用コンテナおよび水は次亜塩素酸ソーダなどで消毒する。解剖器具、微生物培養器具（以下同様）は再使用、廃棄の前にオートクレーブによる滅菌を行う。

### 3. 診断手順

#### (1) 培養細胞による VHSV の分離

##### ① 培養細胞への接種

使用する株化細胞：FHM 細胞（写真 8）または BF-2 細胞。

注；従前の病性鑑定資料に VHSV のウイルス分離用として記載されている EPC 細胞は、一般的に遺伝子型 Ib、II 及び III に対する感受性が低いので推奨しない。

細胞培養液：FBS10% を含む MEM 培地に抗生物質（ペニシリン 100IU/ mL とストレプトマイシン 100 µg/ mL）を添加したものを使用する。

- (a) 予め 24 ウェルの細胞培養用プレートに FHM 細胞または BF-2 細胞を 25℃ で培養しておく。（培養面積が 25cm<sup>2</sup> の細胞培養用フラスコを用いている場合、通常 1 本のフラスコで 24 ウェルの細胞培養用プレートを 1 枚作製することが出来る。）接種する細胞は、分散後 24 時間程度経過し、底面積の 8 割程度が細胞で覆われている状態ものが好ましい。また試料中のウイルスの不活化を防ぐため、少なくとも試料接種前の 30 分間は 15℃ のインキュベーターに入れておく。
- (b) ホモジネート上清の 10 倍希釈液を抗生物質（ペニシリン 100IU/ mL とストレプトマイシン 100 µg/ mL）を含む MEM 培地にて作製する。
- (c) 各ウェルの細胞培養液を除去し、ホモジネート上清の原液及び上記 (b) で調整した 10 倍希釈液を FHM 細胞または BF-2 細胞単層に 100 µL ずつ接種する。
- (d) 15℃ で 0.5 ～ 1 時間吸着させた後、接種液はそのままにして、FBS を 2% 添加した MEM 培地を各ウェルに 1 mL 加え、15℃ で培養する。このとき、細胞培養液に対する臓器試料の終濃度として、ホモジネート上清及び 10 倍希釈液接種ウェルでそれぞれ 100 倍及び 1000 倍希釈となる。

##### ② 培養及び観察

- (a) 40 ～ 100 倍の倍率で 7 ～ 10 日間毎日顕微鏡観察し、接種細胞における感染経過を追う。試料中のウイルス力価が低い場合には一旦出現した CPE が消出することがあるので注意が必要である。
- (b) ホモジネート上清および希釈液を接種した培養細胞に細胞変性効果（CPE）（写真 9）が現れたら、直ちにウイルス同定手順に着手する（下記参照）。
- (c) 培養 7 ～ 10 日後に接種細胞に CPE が生じなければ、継代培養を行う。

##### ③ 継代培養

- (a) 上清希釈液を接種したすべての細胞単層から、細胞培養液を集める。
- (b) 細胞培養液を孔径 0.45µm のシリンジフィルターのろ過した液、もしくは 4℃ で 15 分間、2,000 x g で遠心分離後の上清を回収する。
- (c) フィルターのろ液、もしくは回収した上清を FHM 細胞または BF-2 細胞単層に接

- 種し、7日間観察する。  
(d) CPEが生じなければ、試験結果は陰性である。

## (2) ウイルスの同定；間接蛍光抗体法：キット使用

コスモ・バイオ社が販売している Bio-X 社製のキット BIO-FLUO VHS (BIO K 006) を用い説明書に従い診断を行う。(抗 VHSV モノクローナル抗体の IP5B11 のみ必要な場合はコスモ・バイオ社から Bio-X 社製の Anti VHS (IP5B11) N protein (BIO 282) のみの販売も行われている。)

### ①検査薬類

- (a) 100 mL 洗浄液 1本 (キット付属)

蒸留水を 900 mL 加え、10 倍に希釈して使用する。(以後、希釈洗浄液と記載)  
(キット付属の試薬を使い切った場合は PBS (-) でも可。)

- (b) 25 mL 固定液 1本 (キット付属)

キット付属の固定液を使い切った場合はアセトン 30% とエタノール 70% (容量 / 容量、-20℃保存) でも可。注；アセトンのみだとプレートが変形します。)

- (c) 抗 VHS モノクローナル抗体 (IP5B11) (キット付属) 1本

使用直前に希釈洗浄液で抗体を 20 倍に希釈する。

- 遺伝子型 IVa VHS ウイルス特異抗体 (VHS-10；Ito *et al.*, 2010, 2012) 1本

(注；キットには含まれていません。本抗体は水産研究・教育機構 増養殖研究所より配布します。配布希望の際は増養殖研究所 魚病診断・研修センターへ問い合わせください。) 配布する抗体液には防腐剤は含まれていないので一度に使用しない場合は、分注し -20℃以下に凍結保存する。使用直前に希釈洗浄液で抗体液を 50 倍に希釈する。

- (d) FITC 標識 2 次抗体 (キット付属)

使用直前に 2 次抗体液を希釈洗浄液もしくはキット付属の希釈液 (エバンスブルー含有) で 20 倍に希釈する。

- ② 細胞培養用プラスチックプレート (24 ウエルプレート) に 24 ウエル用のカバーガラス (キットには含まれていません。)(FHM 細胞を用いる場合はコラーゲンタイプ I コートの製品の使用を推奨する。製品例；IWAKI コラーゲン I コートカバーガラス φ 12mm、メーカーコード 4912-010) を入れ、25℃で 24 時間以内に約 8 割繁殖となるように FHM 細胞または BF-2 細胞の細胞単層 (一つのウイルス分離株につき IP5B11 抗体用に 4 ウエル (原液接種用 2 ウエル、10 倍希釈用 2 ウエル)、VHS-10 抗体用に 4 ウエル (原液接種用 2 ウエル、10 倍希釈用 2 ウエル)、陰性対照用に 2 ウエル) を (3. (1) ① (a)) の手法を用いて準備する。
- ③ 同定すべきウイルス液とその液を MEM で 10 倍に希釈した液を培養細胞の入ったウエルにウイルス分離の同様の手法 (3. (1) ① (e)) を用いて接種する。(同定すべきウイルス液中のウイルス力価が高い場合、CPE の出現に気付いた際には感染細胞がカバーガラス底面から剥がれており、診断できない場合があることから、2 段階濃度のウイルス液を 2 ウエルずつ準備する。)
- ④ 15℃で、CPE が出現するまで培養する。( (1) でウイルスが分離されている場合、

原液接種ウエルで、通常 2 – 3 日程度)

- ⑤ 各ウエルの細胞培養液を除去した後、希釈洗浄液を各ウエルに 1 mL ずつ静かに加え、数分間放置後洗浄液を除く。
- ⑥ 各ウエルに固定液を 1 mL 加えて室温で 15 分間固定する。
- ⑦ 固定液を除去した後、カバーガラスを風乾させる。
- ⑧ 希釈した 1 次抗体液を各ウエルに 200  $\mu$ L 加え、37°C で 30 分間反応させる。抗体反応中はプレートを湿箱に入れるなどして、カバーガラス上の細胞が乾燥しないよう注意する。
- ⑨ 希釈洗浄液を各ウエルに 1 mL ずつ加え、数分間放置後洗浄液を除く。再度、同様の操作を繰り返す。
- ⑩ 希釈した 2 次抗体液を各ウエルに 200  $\mu$ L 加え、37°C で 30 分間反応させる。抗体反応中はプレートを湿箱に入れるなどして、カバーガラス上の細胞が乾燥しないよう注意する。
- ⑪ 洗浄液を各ウエルに 1 mL ずつ加え、数分間放置後洗浄液を除く。再度、同様の操作を繰り返す。
- ⑫ ピンセット等を用いてカバーガラスをウエルより取り出し、無蛍光スライドグラスにグリセリン PBS 溶液 (グリセリン : PBS = 9:1) を滴下し、細胞面を傷つけないように注意して細胞面を下にして封入し、蛍光顕微鏡で観察する。
- ⑬ VHSV が存在する場合は、IP5B11 と反応させた感染細胞において蛍光緑色を呈した感染細胞が観察される (写真 10)。その場合、IP5B11 および VHS-10 抗体の反応性の組み合わせにより、遺伝子型 IVa がそれ以外の遺伝子型であるか判定する。すなわち、同定すべき試料が IP5B11 および VHS-10 抗体に対し陽性である場合、遺伝子 IVa 型の VHS ウイルス (日本既存の VHS ウイルス) と判定され陰性となる。一方、IP5B11 抗体に対し陽性で、VHS-10 抗体に対し陰性である場合、その試料は遺伝子 IVa 型以外の VHS ウイルス (特定疾病対象 VHS ウイルス) と判定され、陽性となる。

### (3) RT-PCR 法 (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法 : キット使用)

#### ① 準備

- (a) 採取した病魚試料 (腎臓、脾臓、心臓、脳髄磨砕液または卵巣漿液) あるいは分離ウイルス培養上清から抽出した RNA。
- (b) RT-PCR 法使用機器および試薬 (サーマルサイクラー、マイクロピペット、エッペンドルフチューブ、酵素・試薬類、電気泳動装置および試薬類など)
- (c) プライマー \*

Forward primer 5' – GGG GAC CCC AGA CTG T – 3'

Reverse primer 5' – TCT CTG TCA CCT TGA TCC – 3'

増幅産物サイズ 811bp

\* このプライマーセットは従前の病性鑑定指針に記載されているもので、2016 年版の OIE VHS マニュアルに記載されているものとは異なっています。(2016 年版の OIE VHS マニュアルのプライマーは日本既存の遺伝子 IVa 型の VHS ウイルスに対する反応性が悪いため。)

② 手技

- (a) 採取した病魚試料あるいは分離ウイルス培養上清から適当な RNA 抽出キットにより RNA を抽出する。抽出法などは、使用するキットのマニュアルに従う。
- (b) 抽出した RNA および陽性対照 RNA をテンプレートとして、上記のプライマーを用いて RT-PCR 反応を行う。反応は、最初に 50℃で 30 分間、続いて 94℃で 2 分間、その後 94℃で 30 秒間、52℃で 30 秒間、68℃で 1 分間を 35 サイクル、最後に 68℃で 7 分間行う。
- (c) RT-PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 1-1.5% 程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。
- (d) 臭化エチジウム存在下、トランスイルミネーターにより分子量 811bp のバンドの有無を観察する。

③ 判定

目的のバンドが検出された個体を陽性、検出されなかった個体を陰性と判定する。

反応液組成 (1 検体分) ; SuperScript® One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) の場合

SuperScript III RT/ Platinum <i>Taq</i> Mix	2 μL
× 2 Buffer	25 μL
DNase/RNase-Free distilled water	20 μL
Fwd. プライマー名 (10μM)	1 μL
Rev. プライマー名 (10μM)	1 μL
検体	1 μL
合 計	50 μL

RT-PCR 反応条件

逆転写	50℃	30min.
初期の変成	94℃	2min.
以下、変成～伸長を	35 サイクル	
変成	94℃	30sec.
アニーリング	52℃	30sec.
伸長	68℃	1min.
最後の伸長	68℃	7min.
保持	4℃	∞

(4) 最終診断法 (G 遺伝子塩基配列の解析による VHSV 遺伝子型判別) 1

①準備

- (a) 分離ウイルスの培養上清
- (b) RT-PCR 法使用機器および試薬 (サーマルサイクラー、マイクロピペット、エツ

ペンドルフチューブ、酵素・試薬類、電気泳動装置、シーケンス試薬類および  
遺伝子解析用ソフトなど)

(c) 各種プライマー (表1 および表2)

表1 VHSV G 遺伝子増幅用プライマー (Einer-Jensen *et al.*, 2004)

プライマー名	遺伝子及び位置 (nt)*	シーケンス (5' → 3')	増副産物 (bp)
GA+	M 遺伝子 585	CTCCTCTGTCCGACCTT	-
GA-	Nv 遺伝子 9	GGTCGCCATGTTTCTTTATC	1717
GB+	M 遺伝子 532	GTCGAAGAAGAGATAGGC	-
GB-	Nv 遺伝子 8	GTTGGGTCGCCATGTTTCT	1757
GC+	M 遺伝子 381	CATTAGACATGGGAGTGTG	-
GC-	Nv 遺伝子 216	CTAGGAGACTTATCCTCATG	2121
GD+	M 遺伝子 511	GAAGGACTACTACAATCGT	-
GD-	Nv 遺伝子 48	GGAGGACGAGTGGAGAAA	1827
GSeq1+	G 遺伝子 235	CCAACCAAGATCATCCAT	-
GSeq2+	G 遺伝子 637	GCCATTGCCCCACG	-
GSeq3+	G 遺伝子 954	CCATAGTGATATCACCGC	-
GSeq4+	G 遺伝子 1272	CCTTGTGGAAGTCCCTC	-
GSeq5+	G 遺伝子 1300	GTGTTTGTCTCCAACACATC	-
GSeq6-	G 遺伝子 303	GCACAGAGTGACTTATCG	-
GSeq7-	G 遺伝子 424	CACGAGTACCCGTTCTT	-
GSeq8-	G 遺伝子 441	CCCTGAACCCCTCCTGC	-
GSeq9-	G 遺伝子 954	CCATAGTGACATCACTGC	-
GSeq10-	G 遺伝子 1020	CCCTGGACCCGGCAA	-

\* 各プライマーの 5' 末端の位置を記載

表1のプライマーは GenBank accession No. AF143863, AF143862, Z93414, Z93412, Y18263, AJ233396 及び X66134 を参考に設計された。

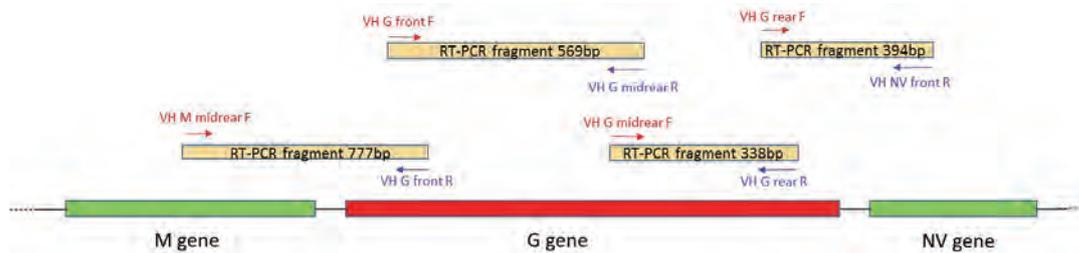
表2 VHSV G 遺伝子増幅用プライマー (Ito *et al.*, 2016)

プライマー名	遺伝子及び位置 (nt)*	シーケンス (5' → 3')	増副産物 (bp)
VH M midrear F	M 遺伝子 385	AGACATGGGAGTGTGACTTA	-
VH G front F	G 遺伝子 445	GAACCYTCCTGCATYTGATGAA	-
VH G front R	G 遺伝子 467	TTCATCCARATGCAGGARGGTTC	-
VH G midrear F	G 遺伝子 901	TTTCTCCTMTCAAAGTTTCGTCC	-
VH G midrear R	G 遺伝子 1013	GGACGAACTTTGAKAGGAGAAA	-
VH G rear F	G 遺伝子 1307	TCTCCAACACATCYGATCTYTC	-
VH G rear R	G 遺伝子 1328	GARAGATCRGATGTGTTGGAGA	-
VH NV front R	Nv 遺伝子 102	GTTGAGGTAGTTRCTTGGGTC	-

\* 各プライマーの 5' 末端の位置を記載

表 2 のプライマーは GenBank accession No. AB672614 を参考に設計された。

参考として表 2 のプライマーの概略位置とその増副産物を下記に示す。



## ②手技

(a) 表 1 のプライマーを用いる場合；5 mL の分離ウイルスの培養上清を 4℃で 15 分間、4,000 x g で遠心分離後、上清を回収する。その上清を 60 分間、86,000 x g で超遠心する。得られたウイルスペレットから RNA 抽出キットにより核酸抽出する。抽出法などは、使用するキットのマニュアルに従う。

表 2 のプライマーを用いる場合；分離ウイルスの培養上清から RNA 抽出キット（液体サンプル抽出用）により核酸抽出する。抽出法などは、使用するキットのマニュアルに従う。

(b) 抽出した RNA をテンプレートとして、上記のプライマーを用いて RT-PCR 反応を行う。超遠心後のウイルスペレットから高純度のウイルス RNA を抽出する場合、表 1 のプライマーを用いて、M 遺伝子と Nv 遺伝子に設計された GA、GB、GC または GD のプライマーセットで G 遺伝子を挟むように増幅させる。ウイルス株によってプライマーの位置に変異があり、目的の遺伝子断片が増幅されない場合は GSeq1+ 以下に記載されている G 遺伝子に設計されたプライマーを補足的に用いる。

培養上清から抽出 RNA を用いる場合、表 2 のプライマーを用いて、G 遺伝子を含む遺伝子領域をいくつかに分割して G 遺伝子全長の塩基配列を決定する。

注；VHSV は RNA ウイルスであることから変異が大きく、同じ遺伝子型であってもウイルス株により塩基配列が異なる可能性があるため、いずれの表のプライマーセットでも組み合わせは柔軟的に使用する。

(c) RT-PCR により VHSV の G 遺伝子を増幅後、G 遺伝子全長の塩基配列を決定し、データベースに登録されている VHS ウイルスの G 遺伝子の塩基配列を参考に、遺伝子型を判定する。近隣結合法（neighbor-joining method；NJ 法）等による系統解析により遺伝子型を判定する。

## ③判定

同定すべき試料が遺伝子 IVa 型の VHS ウイルス（日本既存の VHS ウイルス）と判定された場合陰性となり、遺伝子 IVa 型以外の VHS ウイルス（特定疾病対象 VHS ウイルス）と判定された場合、陽性となる。

## 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

### (1) 生鮮個体（組織）を送付する場合

#### ①全長4 cm 以下の仔魚

魚全体を試料とする。体表を消毒後、卵黄嚢がある場合は除去する。

#### ②全長4 cm ～ 6 cm の魚

腎臓を含む内臓全体を試料とする。

#### ③全長6 cm 以上の魚

腎臓、脾臓、心臓および脳（これらの全てまたはいずれかをプールしても良い）。

上記の試料を2. 検体採取の項を参考に滅菌された50 mL、15 mL 遠心チューブやエッペンドルフチューブ等に入れ、できるだけ速やかに冷蔵状態で送付する。

### (2) 培養ウイルス液を送付する場合

CPE が出たウイルス培養液を4℃で15分間、2,000 x g で遠心分離後、上清を回収し、15 mL 遠心チューブやエッペンドルフチューブ等に入れ、速やかに冷蔵状態で送付するか、凍結後冷凍状態で送付する。

## 5. 参考文献

Einer-Jensen, K., P. Ahrens, R. Forsberg and N. Lorenzen (2004) Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Gen. Virol.*, 85, 1167-1179.

Ito, T., J. Kurita, K. Mori and N. J. Olesen (2016) Virulence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotype III in rainbow trout. *Vet. Res.*, 47, 4.

Ito, T. and N. J. Olesen (2013) Susceptibility of various fresh water fish species in Japan to an isolate of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotype IVb. *Dis. Aquat. Org.*, 107, 1-8.

Ito, T., J. Kurita, M. Sano, H. F. Skall, N. Lorenzen, K. Einer-Jensen and N. J. Olesen (2012) Typing of viral hemorrhagic septicemia virus by monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, 93, 2546-2557.

Ito, T., N. J. Olesen, H. F. Skall, M. Sano, J. Kurita, K. Nakajima, T. Iida (2010) Development of a monoclonal antibody against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotype IVa. *Dis. Aquat. Org.*, 89, 17-27.

栗田 潤・飯田悦左・中島員洋・井上 潔 (2002) ヒラメ VHS ウイルスに対する各種市販消毒剤の殺ウイルス効果. 魚病研究, 37, 175-181.

World Organisation for Animal Health (OIE) (2016) Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2016, Chapter 2.3.10, Viral haemorrhagic septicaemia, ([http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=chapitre\\_vhs.htm](http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=chapitre_vhs.htm)).

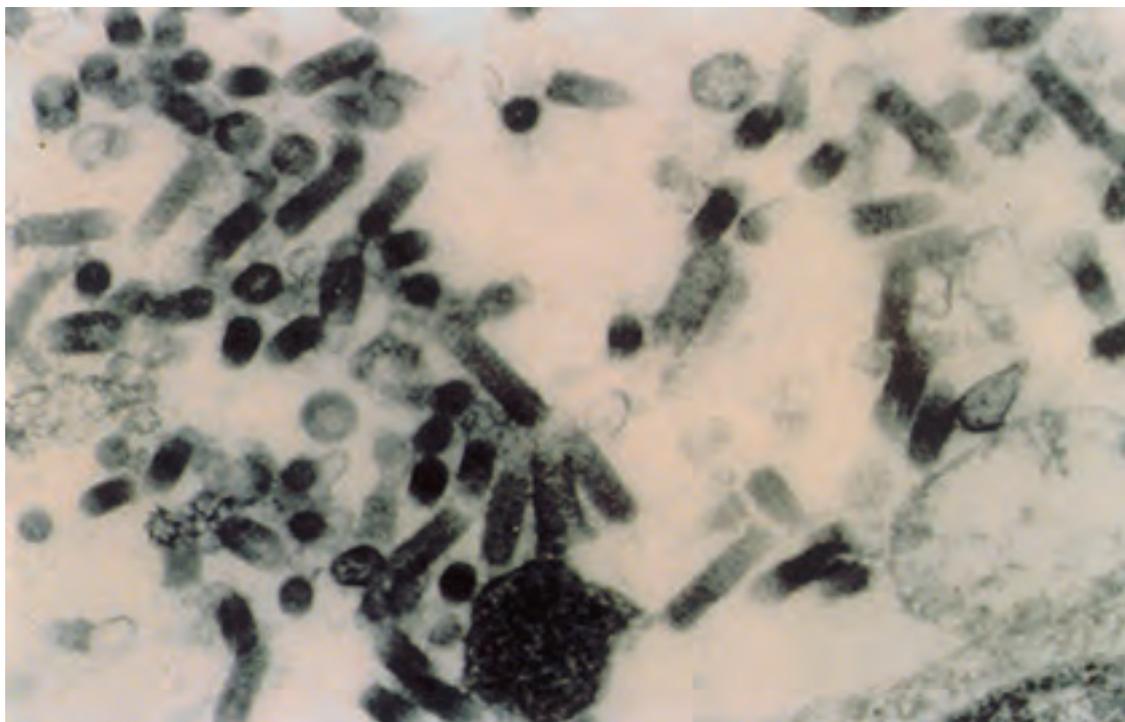


写真1 VHS ウイルス粒子の電子顕微鏡像。本ウイルスはラブドウイルス科に属し、弾丸型を呈する。(J. R. Winton 博士提供)



写真2 デンマークのニジマス養殖場で発生したVHSによる大量死。(木村喬久 博士提供)

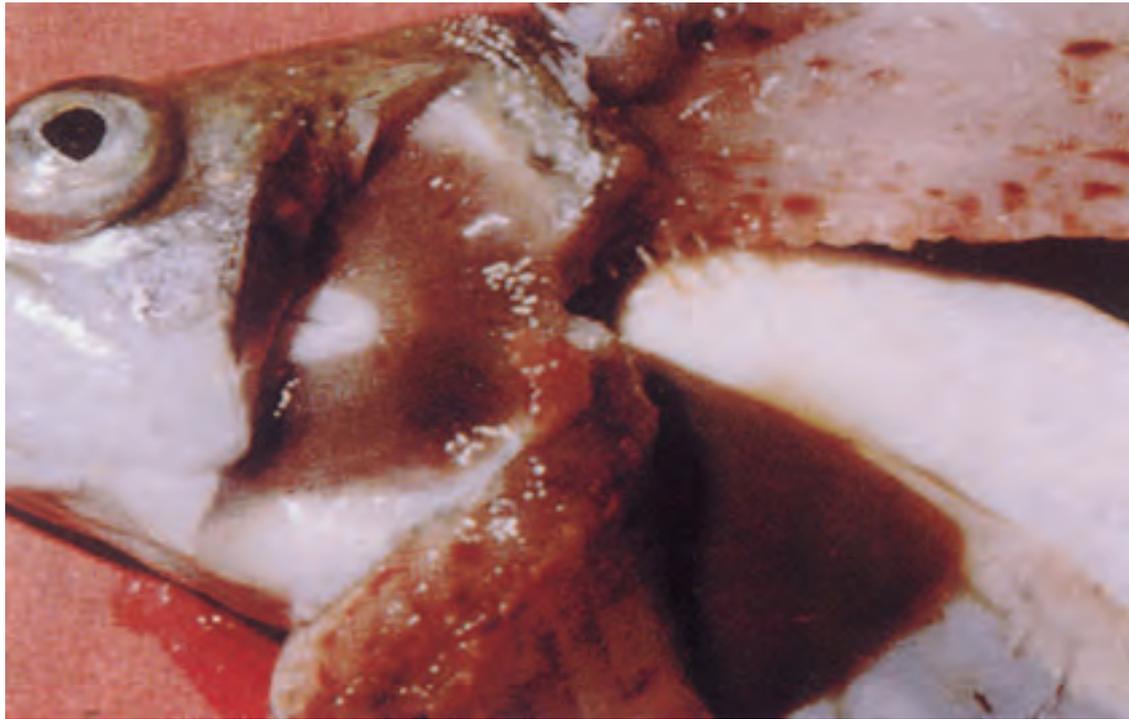


写真3 VHSに冒されたニジマス。鰓と肝臓は褪色し、軀幹筋肉には出血点が観察される。眼球突出もみられる。(P. Ghittino 博士提供)



写真4 VHSに罹病したタイヘイヨウニシン。体表に出血が観察される。(J.R. Winton 博士提供)



写真5 アラスカ沿岸で捕獲されたVHSに罹病したタイヘイヨウタラ。体表に顕著な出血が観察される。(T. R. Meyers 博士提供)



写真6 実験感染（浸漬法）によりVHSウイルス（遺伝子型IVb）に罹病したブルーギル。体表の出血や眼球突出が観察される。(伊東尚史 博士提供)



写真7 実験感染（浸漬法）によりVHSウイルス（遺伝子型IVb）に罹病したメダカ。軀幹筋肉の出血、眼球突出及び腹水の貯留が観察される。（伊東尚史 博士提供）

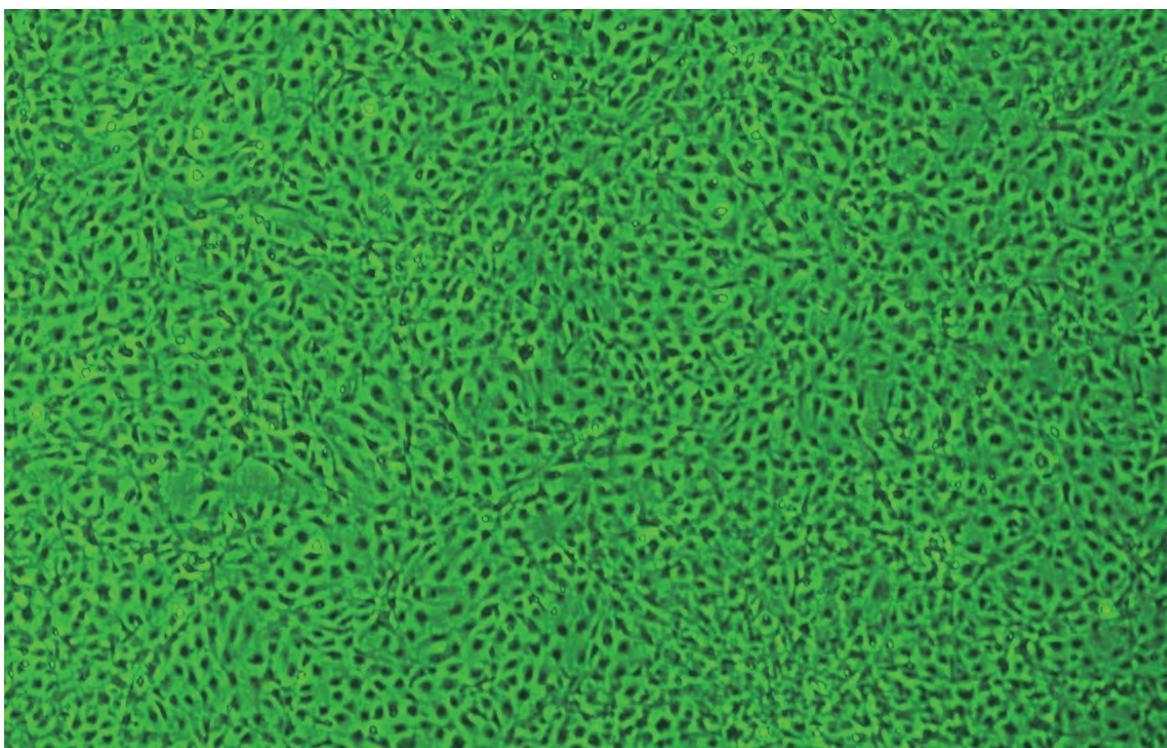


写真8 VHSウイルスの分離に使用されるFHM細胞（非感染）。（伊東尚史 博士提供）

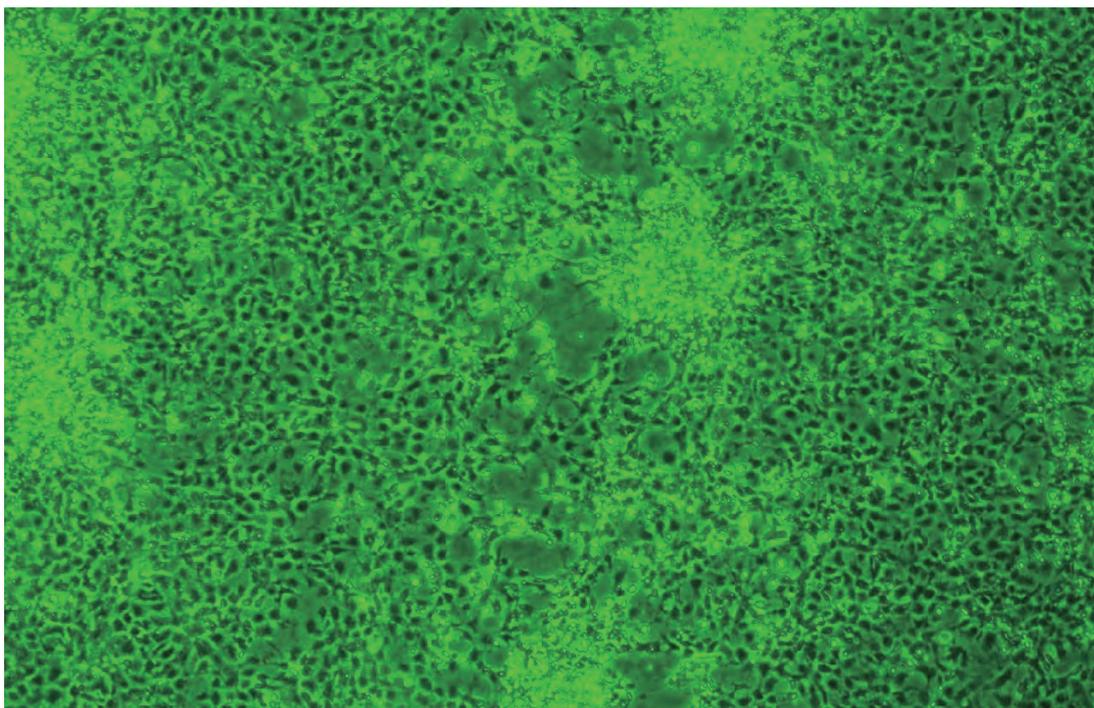


写真9 VHS ウイルス感染 FHM 細胞。細胞が委縮し、一部はフラスコ底面からはがれている。(伊東尚史 博士提供)

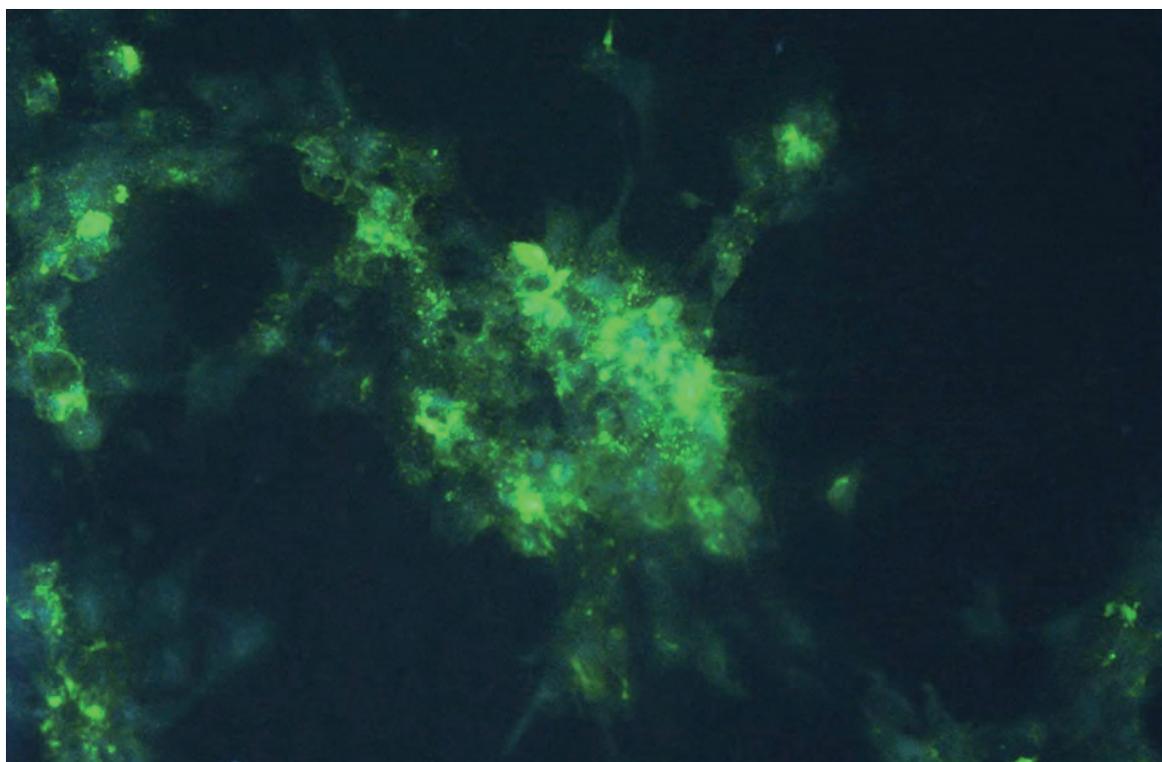


写真10 VHS ウイルスに感染した FHM 細胞の間接蛍光抗体陽性像 (伊東尚史 博士提供)

# サケ科魚類のアルファウイルス感染症 Infection with salmonid alphavirus

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

① 病名：サケ科魚類のアルファウイルス感染症

英名：Infection with salmonid alphavirus

もともとタイセイヨウサケやニジマスの腓臓病（PD）及びニジマスの眠り病（SD）として報告されていた。いずれもサブタイプの異なる同種の病原体が原因であることから、現在ではサケ科魚類のアルファウイルス感染症としてまとめられている。

② 病原体：salmonid alphavirus (SAV)

トガウイルス科アルファウイルス属に属する。球形でエンベロープを有し、1本鎖RNAをゲノムとして持つ。SAVはSAV1～SAV6の6種類のサブタイプに分類される。腓臓病は全てのサブタイプで、眠り病はSAV2のみで報告されている。また、サブタイプごとに地理的分布が異なる。

### (2) 地理的分布

① 初発国：アイルランド及びスコットランド

② 分布域：アイルランド、英国（北アイルランド、イングランド、スコットランド）、クロアチア、フランス、ドイツ、イタリア、スペイン、スイス、ポーランド、ノルウェーで報告されている。

### (3) 宿主域

① 自然発病：タイセイヨウサケ (*Salmo salar*)、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*)

② 実験感染：ブラウントラウト (*S. trutta*)

③ キャリア：天然海域のニシマカレイ (*Limanda limanda*)、グリーンランドアカガレイ (*Hippoglossoides platessoides*)、及びプレイス (*Pleuronectes platessa*) といった異体類から SAV の RNA が検出されている。

④ ベクター：疾病発生中のタイセイヨウサケに寄生していたサケジラミ (*Lepeophtheirus salmonis*) から SAV が検出されている。

### (4) 発生の特徴

海水および淡水飼育を問わず、幼魚から成魚まですべての発育段階で発生し、8～15℃では急性的、8℃以下では慢性的な経過をたどる。水温上昇が本症発生の引き金になるという報告もある。累積死亡率は無視できるレベルから50%を越える場合もあり、発生期間も1～32週間まで様々である。生残魚の最大15%が成長不良となり、細長く痩せた魚になる1)。

## (5) 外観症状

斃死が増加する 1～2 週間前から突然食欲が落ちはじめる。発症魚は水面を緩慢に泳ぎ、場合によっては眠っているように水槽や網生け簀の底に横たわる 1)。水中の糞が増加する。眼球突出、腹部膨満、皮膚に潰瘍がみられることもある 1)。

## (6) 剖検所見

摂餌不良の結果として、消化管に黄色い粘液状の物が見られる。循環障害による点状出血、少量の腹水貯留、幽門垂の間にある膵臓組織の赤色化が観察される。また、心臓の退色や心臓破裂が見られることもある。

## (7) 消毒

オートクレーブによる滅菌、塩素消毒等、一般的なウイルスの消毒法に準ずる。

## (8) 防除法

有効な化学療法剤はない。SAV1（タイセイヨウサケの膵臓病）に対する不活化ワクチンが市販されており、ノルウェー、アイルランドおよびスコットランドでは広く使用されている。他のサブタイプ（ニジマスの眠り病等）に対するワクチンは開発中である。魚の健康状態に留意し、死亡魚の早期取り上げ、水槽・生け簀の清掃といった一般的な疾病対策が重要となる。

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

- ① 瀕死魚または当該疾病の外観症状を示す生存魚を採取することが望ましい。すなわち、水槽や生け簀の底に横たわっているような衰弱魚を採取する。そのような魚が認められない場合は細長く痩せた魚を選ぶ。
- ② 被検魚の収集から採材まではできるだけ速やかに行うことが望ましく、できれば発生現場で臓器試料を摘出する。
- ③ 被検魚を検査機関まで輸送する場合は、生きたままビニール袋などに入れて酸素パッキングし、水温変動に注意して搬送するか、検査対象魚を発生現場で即殺後、個体ごとに無菌の密閉可能な容器に収容し、氷冷または冷蔵状態で 48 時間以内に搬送する。搬送の際、被検魚が凍結することのないよう注意する。
- ④ 被検魚として死魚しか入手できない場合は、なるべく新鮮なものを採取し、個体ごとにビニール袋などで密閉包装して氷冷または冷蔵状態で搬送する。

### (2) 検査のための試料の採材

- ① FA100（DS ファーマアニマルヘルス）などの麻酔剤で麻酔するか、大型魚は撲殺する。
- ② 外観症状を記載する。

- ③ 魚体表面を 70% アルコール綿またはアルコール噴霧器で消毒し、滅菌したハサミ、ピンセットなどで解剖する（被検魚採取から遅くとも 48 時間以内に行なう）。
- ④ 内臓の異常を調べ、剖検所見を記載の上、検査に必要な部位を採取する。

### (3) ウイルス検査のための臓器試料の採材

- ① 臓器採材が困難な仔稚魚は、できる限り筋肉部位を取り除き、魚全体を試料とする。
- ② 臓器採材が可能な魚は、心臓あるいは腎臓を試料とする（心臓のウイルス量が多いと言われている）。
- ③ 臓器採材後は直ちに RNA 抽出をして検査を実施することが望ましいが、難しい場合は臓器を -80℃ で保存する。

## 3. 診断手順

### (1) RT-PCR 法（逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法）

- ① RNA 抽出（市販の RNA 抽出キットを使用、以下 TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>, Thermo Fisher Scientific 社) を使用した場合）
  - (a) 組織 50-100 mg に 1 mL の TRIzol<sup>®</sup> 試薬を加え、ホモジナイザーやボルテックスにより組織を分解する。
  - (b) 室温で 5 分間放置する。
  - (c) これにクロロフォルム 200 μL を加え 15 秒間激しく攪拌した後、室温で 5 分間放置し、4℃ で 12,000g・10 分間、遠心分離する。
  - (d) 透明上清（水相）を別のチューブに移し、500 μL の 2-プロパノールを入れて軽く混合し、10 分間放置後 4℃ で 12,000g・10 分間、遠心分離する。
  - (e) 上清を吸い取り除去した後、75% エタノール 1,000 μL を入れて軽く攪拌し、4℃ で 7,500g・5 分間、遠心後、上清を除去して乾燥させる。
  - (f) 乾燥後 dDW (DNase・RNase free) 100 μL を加えてよく溶かす。
    - \* RNA は分解されやすいので溶解後は速やかに氷冷する。保存する場合は、-80℃で行う。
    - \*\* ウイルスに汚染した器具等は滅菌缶に入れオートクレーブ処理する。
- ② RT-PCR (SuperScript<sup>®</sup> III One-Step RT-PCR System with Platinum<sup>®</sup> Taq (Invitrogen<sup>™</sup>, Thermo Fisher Scientific 社) を使用した場合）
  - (a) プライマー
    - E2F : 5'-CCG TTG CGG CCA CAC TGG ATG-3'
    - E2R : 5'-CCT CAT AGG TGA TCG ACG GCA G-3'
    - 増幅産物サイズ ; 516 bp

#### (b) 反応液組成（1 検体分）

（試薬）	（容量）	（終濃度）
2X Reaction Mix（キット）	12.5 μL	1x
テンプレート RNA	2.0 μL	-

E2F プライマー (10 μM)	1.0 μL	0.4 μM
E2R プライマー (10 μM)	1.0 μL	0.4 μM
SuperScript™III RT/Platinum™Taq Mix	1.0 μL	0.4units/ μL
蒸留水	7.5 μL	-
合計	25.0 μL	

\*テンプレート RNA は最後に加える。

(c) RT-PCR 反応条件

逆転写	55°C	30min.
初期の変成	95°C	2min.
以下、変成～伸長を	40 サイクル	
変成	94°C	15sec.
アニーリング	60°C	30sec.
伸長	72°C	50sec.
最後の伸長	72°C	2min.

③ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 2.0% アガロースゲルで電気泳動を行う。

④ 核酸染色試薬（臭化エチジウム等）でゲルを染色し、トランスイルミネータにより塩基数 516 bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。

\*核酸染色試薬は予めアガロースゲルに添加しておいても構わない。

#### 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

① RT-PCR 検査で陽性または擬陽性と診断された個体の試料・記録を増養殖研へ送付する。

② 送付するもの：臨床検査・剖検記録、PCR の泳動像写真、PCR 検査用組織試料（凍結、冷蔵あるいは 70% エタノール固定）。

#### 5. 参考文献

1) McLoughlin, M. F. and Graham, D. A. (2007): Alphavirus infections in salmonids-a review. *J. Fish Dis.*, 30(9),511-31. \*病魚の写真あり

その他の記載はすべて OIE マニュアル（2015）による。

# 流行性造血器壊死症 Epizootic haematopoietic necrosis (EHN)

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：流行性造血器壊死症  
英名：Epizootic haematopoietic necrosis (EHN)
- ② 病原体：イリドウイルス科、ラナウイルス属に属する EHNV。遺伝学的、血清学的に EHNV と類似するラナウイルス属のウイルスは世界各地の魚類・両生類・爬虫類に多数存在する。

### (2) 地理的分布

- ① 初発国：オーストラリア
- ② 分布域：オーストラリア本土

### (3) 宿主域

- ① 自然発病：レッドフィンパーチ (*Perca fluviatilis*)、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*)
- ② 実験感染：浸漬感染により発病するもの：レッドフィンパーチ、ニジマスのほか、マコウリーパーチ (*Macquaria australasia*)、シルバーパーチ (*Bidyanus bidyanus*)、カダヤシ (*Gambusia affinis*)、マウンテンギャラキシアス (*Galaxias olidus*) 腹腔内注射により発病するもの：実験が行われていないカダヤシを除く上記の魚種のほか、ミューレーコッド (*Maccullochella peeli*)、ゴールデンパーチ (*Macquaria ambigua*)、タイセイヨウサケ (*Salmo salar*)

### (4) 発生の特徴

レッドフィンパーチでは成魚稚魚ともに重篤に感染し、しばしば致命的であるが、幼魚の方がより重篤である。ニジマス（写真1）では、症状はレッドフィンパーチに比べ軽症であり、集団の一部しか感染しない。自然発病は 11～17℃であるが、レッドフィンパーチでは 12℃以下での発病はみられない。EHN はオーストラリア本土に限定されているので、発病した場合その種苗の生産施設がオーストラリア本土であるか、またはそこを経由して入った可能性が高い。オーストラリア経由ではない輸入種苗の場合であっても、過去にオーストラリア経由の別の種苗との接触があった可能性も考えられる。

### (5) 外観症状

本疾病に特徴的な外観症状は乏しく、死亡して初めて発見される。瀕死魚は平衡感覚を失い、鰓蓋を開けて体色は黒化することが多い。過密や水質悪化など悪い養殖環境で飼育されたと見られる形跡が、体表、鱗、鰓などに認められることが多い。

## レッドフィンパーチ

運動失調は成魚・稚魚ともに認められる。病魚は呼吸が緩慢となり、しばしば水面で無気力に浮遊し、時には旋回上昇や稚魚では頭を底につけて倒立遊泳を行うこともある。成魚では脳および外鼻孔周囲の発赤が顕著であるが、稚魚では必ずしもその症状は認められない。稚魚ではしばしば尾柄部筋肉に点状もしくは尾柄部全体にわたる白化が認められる。鰭、特に臀鰭基底部の点状出血や鰓の鬱血も認められる。成魚では肛門の発赤やカビの感染による皮膚の潰瘍が認められることもある。

## ニジマス

0+ 魚、1+ 魚ともに運動失調、体色の黒化、食欲低下が認められ、躯幹後半部の皮膚に、境界の明瞭な深い潰瘍が認められることもある。0+ 魚では軽度の腹部膨満や肛門突出がみられる。

## (6) 剖検所見

### レッドフィンパーチ

成魚では肝臓に直径 1~3mm の白点または黄点が多くみられる（写真 2）が、稚魚の白化した肝臓では認めにくい。脾臓は明赤色化して腫大し、稚魚ではゼラチン状化している。腎臓および鰓周囲の腹膜下の充血が顕著である。腹水の貯留もみられる。

### ニジマス

腎臓の腫大と臓器表面の隆起性病変、脾臓の腫大と褪色が認められる。

## (7) 消毒

オートクレーブによる滅菌、塩素消毒等、一般的なウイルスの消毒法に準ずる

## (8) 防除法

一般的なウイルスの防除法に準ずる。

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

- ① 少なくとも 10 尾の瀕死魚または当該疾病の外観症状を示す生魚を採取する。被検魚の収集から採材まではできるだけ速やかに行うことが望ましいので、現場で臓器試料を採取する。
- ② 被検魚を検査機関に搬入する場合は、生きたままビニール袋などに入れて酸素パッキングし、水温変動に注意して搬送するか、被検魚を発生現場で即殺後、個体ごとに無菌の密閉可能な容器に包装し、氷冷または冷蔵状態で 48 時間以内に搬送する。搬

送の際に、被験魚が凍結することのないように注意する。

- ③ 被験魚として死魚しか入手できない場合は、なるべく新鮮なものを採取し、個体ごとにビニール袋などで密閉包装し、氷冷または冷蔵状態で搬送する。臓器試料または被験魚には採取場所および日時を明記したラベルを添付する。
- ④ 0.5% MS222 (Tricaine ; 3-aminobenzoic acid ethyl ester methanesulfonate) などの麻酔剤で麻酔、または大型魚では撲殺する。
- ⑤ 外観症状を記載する (外観症状の項参照)。
- ⑥ 魚体表面を 70% アルコール綿またはアルコール噴霧器で消毒し、滅菌したハサミ、ピンセットなどで解剖する。
- ⑦ 内臓の異常を調べ、剖検所見を記載の上、検査に必要な部位を採取する (剖検所見の項参照)。

## (2) 検査のための試料の採材

- ① 明らかに病徴を呈している魚
  - (a) 全長 4cm 以下の仔魚  
魚全体を試料とする。体表を消毒後、卵黄嚢がある場合は除去する。
  - (b) 全長 4cm~6cm の魚  
腎臓を含む内臓全体を試料とする。
  - (c) 全長 6cm 以上の魚  
腎臓、脾臓および脳を試料とする。
- ② 病徴の見られない魚 (不顕性感染が疑われる魚)
  - (a) 未成熟魚  
腎臓、脾臓および脳を試料とする。
  - (b) 成熟親魚  
上記臓器の他に卵巣腔液<sup>\*1</sup>を試料とする。

\* 1 卵巣腔液は、必ず開腹前に滅菌したピペットなどで泌尿生殖孔より採取し、他の組織試料とは別の容器に入れる。サンプル量は 5 尾を 1 検体とし、合計で約 1 mL 以内とする。

- ③ 試料の採取
  - (a) 検査魚から滅菌したハサミ、ピンセットなどを用いて臓器試料を採取する (卵巣腔液は \* 1 参照)。
  - (b) 腎臓、脾臓および肝臓は混合して各最大 5 尾分を 1 検体としてプールする。採材量は 1 検体分で約 1g 以下とする。
  - (c) 試料は計量の後、予め輸送液<sup>\*2</sup> (試料の 5 ~ 10 倍量) を入れた滅菌チューブに入れる。

\* 2 輸送液 : 抗生物質添加イーグル最少必須培地 (MEM)。抗生物質はゲンタマイシン 1000 µg/ mL またはペニシリン 800IU/ mL とジヒドロストレプトマイシン 800 µg/ mL の併用が適当。合成抗真菌剤のマイコスタチンまたはファン

ギゾン 400IU/ mL を加えてもよい。輸送時間が 12 時間を越えるようなら、ウイルスを安定化するために血清か卵白を 5 ~ 10% 加えてもよい。

## ④ 試料の輸送

- (a) 臓器試料の入った容器は互いに接触しないように個々にビニール袋で装し、検査機関まで 0 ~ 4℃ に保ちながら搬送する。その際に試料が凍結しないよう注意する。
- (b) 臓器試料のウイルス検査は、採取後できるだけ速やかに行う。やむを得ず遅くなる場合でも 48 時間以内に行う。
- (c) 魚体ごと検査機関まで搬送された場合は、到着後直ちに③からの作業を行う。

## ⑤ 試料等の処理

検査試料および解剖器具などは病原体による汚染・伝播を防ぐために以下の処置を施す必要がある。被検魚、臓器試料の残りは焼却処分、輸送用コンテナおよび水は次亜塩素酸ソーダなどで消毒する。解剖器具、微生物培養器具（以下同様）は再使用、廃棄の前にオートクレーブによる滅菌を行う。

## 3. 診断手順

### (1) ウイルス検査のためのサンプル調製

#### ① 臓器試料のホモジナイズ

- (a) 操作は氷冷下 (0 ~ 4℃) で行うことが望ましい。
- (b) 臓器試料が予め抗生物質処理されていない場合は、試料を抗生物質を添加した培地に再懸濁し、15℃、2~4 時間、または 4℃ で一晩放置する。
- (c) 試料容器を傾けて抗生物質添加培地を捨てる。
- (d) プールされた臓器を乳鉢または電気ミキサーでホモジナイズして、ペースト状にし、これを輸送液に再懸濁して最終的には 1 : 10 のホモジネート液とする。

#### ② 接種試料の調製

- (a) 希釈ホモジネート液を冷却遠心機で 4℃、2,000g、15 分間遠心分離し、上清を回収する。
- (b) 抗生物質処理されていない臓器試料は、上清を 15℃ で 2 ~ 4 時間、または 4℃ で 1 晩放置して、抗生物質を作用させる。
- (c) 試料の採取から 48 時間以内に細胞に接種できない場合は、臓器試料はそのまま -80℃ に凍結保存し、後日ウイルス検査を行う。

### (2) ウイルス検査

#### ① 培養細胞への接種

- (a) 予め BF-2 細胞\*<sup>3</sup>を細胞培養液\*<sup>4</sup>で 20℃ で 24 ウェル細胞培養プレート（ファルコン、ヌンク、コースター社製のいずれでも可）に培養しておく（希釈ホモジネート液を接種する細胞は、分散後 24 時間程度経過したものをを用いる）。

\* 3 BF-2 細胞：ブルーギル稚魚尾柄由来繊維芽細胞

\* 4 細胞培養液：10%の牛胎児血清（FCS）を添加したイーグル最少必須培地（MEM）に抗生物質（ペニシリン 100IU/ mL、ジヒドロストレプトマイシン 100 µg/ mL）を添加したもの。真菌の汚染を防ぐため抗真菌剤（マイコスタチン 50IU/ mL）を加えてもよい。培養液は重炭酸ナトリウムや 0.16M tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris) HCl で緩衝する。0.2M N-2-hydroxyethylpiperazine N-2-ethanesulfonic acid（HEPES）はさらによい。密閉した培養フラスコで培養する場合は重炭酸ナトリウムを単独で用いてもよいが、細胞培養用プレートにはトリスまたはヘPes緩衝液を用いる。pH は細胞培養用には 7.3～7.4、ウイルス検査用には 7.6 に合わせる。

- (b) ホモジネート上清（1：10）の 10 倍希釈系列を 3 列作り、上清（1：10）、各段階希釈液（1：100、1：1000、1：10000）および陰性対照培養液の適量を予め培養液を除去した細胞単層に接種する。少なくとも 2cm<sup>2</sup> の細胞単層に 100 µL 接種する（図1）。
- (c) 10～15℃で 0.5～1 時間吸着させた後、接種液はそのままにして FCS を 2% 添加したウイルス検査用の細胞培養液（pH7.6）を 24 ウェル細胞培養プレートに 1 mL/ ウェルずつ加える。

## ② 培養および観察

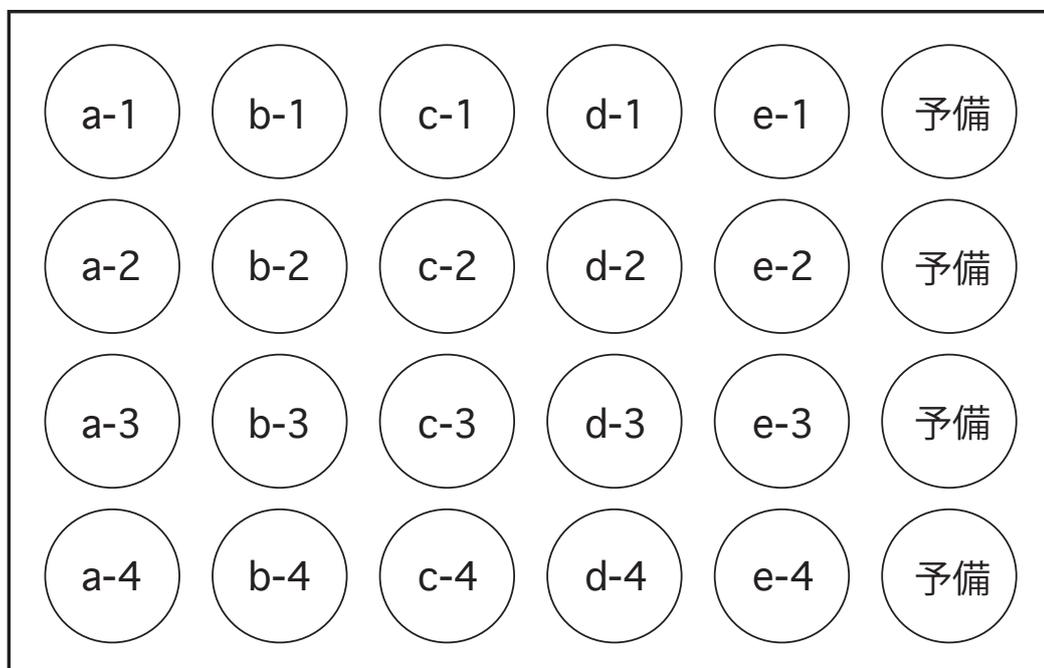


図1 ウイルス検査試料の細胞培養プレートへの接種

20 尾のサンプルの場合（1 ウェル当たり 5 尾分）a-1～a-4: 陰性対象（接種陰性対象 100 µL+ 細胞培養液 1 mL）b-1～b-4: 10 倍希釈液（接種試料 100 µL+ 細胞培養液 1 mL）c-1～c-4: 100 倍希釈液（接種試料 100 µL+ 細胞培養液 1 mL）d-1～d-4: 1000 倍希釈液（接種試料 100 µL+ 細胞培養液 1 mL）e-1～e-4: 10000 倍希釈液（接種試料 100 µL+ 細胞培養液 1 mL）

- (a) ウイルス検査試料を接種した培養細胞は、22℃のインキュベーターで 14 日間培養し、毎日顕微鏡観察する。顕微鏡は位相差顕微鏡を推奨する。
- (b) 培養期間中は培養液の pH を 7.3~7.6 に維持する。
- (c) 接種した培養細胞に細胞変性効果 (CPE) (写真 3) が現れたら、直ちに下記の手順に従ってウイルスの同定に着手する。
- (d) 14 日後においても CPE が発現しなければ、以下のようにさらに新たな培養細胞に試料を継代して培養を行う。

### ③ 継代培養

- (a) ホモジネート上清希釈液を接種したすべてのウェルから細胞培養液を集める
- (b) 4℃で 15 分間、2000g で遠心分離後、上清を回収する。
- (c) 前述したように BF-2 細胞単層に接種して培養し、7 日間観察する。
- (d) CPE が現れなければ、ウイルス検査は陰性とする。

## (3) ウイルスの同定

### ① PCR と PCR 産物の制限酵素断片長解析 (REA) を組み合わせた方法 (一次診断用)

- (a) 分離ウイルスの培養上清をテンプレートする方法が望ましいが、分離に時間がかかることから、病魚臓器から抽出した DNA をテンプレートとして直接 PCR を行ってもよい。ただし、この結果が陰性の場合には必ずウイルス分離を行わなくてはならないので、ウイルス分離の際に同時に臓器からの PCR 用の DNA 調製を行うことを推奨する。
- (b) 培養上清から行う場合は、ウイルス分離に用いたプレートから CPE の発現しているウェルを選び、培養液を集め、低速遠心分離を行って上清を回収する。
- (c) PCR 試料とするウイルス培養上清は、50 倍の水に希釈して 5 分間煮沸し、よく攪拌した後、氷水中に保存してテンプレートとする (市販の DNA 抽出キットを用いるとなおよい)。
- (d) 陰性対照として、健康魚の臓器 DNA (臓器から直接行う場合) またはウイルス接種していない BF-2 細胞培養上清からのテンプレートを調製する。陽性対照には、不活化ウイルスもしくは断片の挿入されたプラスミドやこれら陽性対照から一度増幅した DNA を用いる。比較対象として ESV、FV3 等のラナウイルスのテンプレートがあるとなおよいが、なくても使用する制限酵素断片の認識サイトを含む DNA 断片があればよい (制限酵素が失活していないことの確認のため)。
- (e) フォワードプライマーとして M151: 5'-AAC CCG GCT TTC GGG CAG CA- 3'、リバープライマーとして M152: 5'-CGG GGC GGG GTT GAT GAG AT- 3' を用いる (これらは業者から購入する)。
- (f) 調製したテンプレート試料およびその 10-100 倍希釈系列 5 µL を、PCR 用チューブ中で、0.1 µM 各プライマー、2 units *Taq* ポリメラーゼ、2.5mM MgCl<sub>2</sub> を含む *Taq* ポリメラーゼバッファーに溶かす。反応系は 50 µL とする (OIE では終濃度で BSA fraction V 1.65mg/ mL, 硫酸アンモニウム 16.6mg/ mL, Tris 66.6 m M, β -メルカプトエタノール 10mM を含むバッファー組成を推奨しているが、

この過程は使用する耐熱性 DNA ポリメラーゼの試薬メーカーの指示に従えばよい。

- (g) チューブは最初に 94℃・30 秒間、続いて 94℃・30 秒間、50℃・30 秒間、72℃・60 秒間を 35 サイクル、最後に 72℃・15 分間 (+ 4℃保存) をプログラムしたサーマルサイクラーにかけ、PCR 反応を行う。

M151 5'-AAC CCG GCT TTC GGG CAG CA -3'  
 M152 5'-CGG GGC GGG GTT GAT GAG AT-3'  
 増幅産物サイズ 321bp

反応液組成 (1 検体分 TaKaRa EX *Taq* Hot Start Version を使う場合の一例)

Ex <i>Taq</i> HS (5 units/ $\mu$ L)	0.4 $\mu$ L
dNTP Mixture (2.5mM each)	4.0 $\mu$ L
× 10 Buffer	5.0 $\mu$ L
dDW (滅菌超純水)	38.6 $\mu$ L
Fwd.M151 (10pmol/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
Rev.M152 (10pmol/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
検体	1.0 $\mu$ L
合 計	50.0 $\mu$ L

#### PCR 反応条件

通常の PCR の場合

初期の変成	94℃	30min.
以下、変成～伸長を		35 サイクル
変成	94℃	30sec.
アニーリング	50℃	30sec.
伸長	72℃	1min.
最後の伸長	72℃	15min.
保持	4℃	$\infty$

- (h) 反応を終了したチューブから試料を数  $\mu$ L とり、1/5 量のゲルローディングバッファー (50% グリセロール、0.25% ブロモフェノールブルー、0.25% キシレンシアノール、1mM EDTA、pH8.0) と混合した後、100bp ラダーなど適当な分子量マーカーとともに、1.5 ~ 2% のアガロースゲル (泳動バッファーで溶かす) にアプライし、TAE バッファー (0.4M Tris、0.4M 氷酢酸、0.01M EDTA、pH8.0)、または TBE バッファー (0.89M Tris、0.89M ホウ酸、0.01M EDTA、pH8.0) を用いて 50 ~ 100 V 程度の電圧で電気泳動する。TBE バッファーの場合 2 倍に希釈したものを用いてもよい。なお TBE バッファーを使用する場合はホウ素の排水に法的規制があるため注意が必要。

- (i) 色素が十分泳動されたら、ゲルをエチジウムブロマイド染色（バッファー 1 mL あたり 10mg/ mL のエチジウムブロマイド溶液を 100  $\mu$ L 加える）し、トランスイルミネーターの紫外線下で観察する。ゲル作製時に予め同濃度のエチジウムブロマイドを加えておくと染色の手間が省ける。エチジウムブロマイドは発癌性物質であるため、染色したゲルの取り扱いには手袋を着用する。また紫外線は目を痛めるので観察には保護眼鏡を着用する。
- (j) 陰性対照にはバンドが認められず、陽性対照および比較対照には 321bp の増幅された MCP-1 領域の DNA のバンドが認められることを確認し、試料にこれらの対照と同様のバンドが認められれば、次の制限酵素消化のステップに移る。
- (k) PCR 産物を制限酵素 *Pvu* I (NEB 社など) で消化する。方法は制限酵素のメーカーの指示に従う。1 ~ 4  $\mu$ L の PCR 産物に、2U の酵素、1.6  $\mu$ L のバッファー、1.6  $\mu$ L の濃度 100  $\mu$ g/ mL のウシ血清アルブミン、最終容量 16  $\mu$ L になるように滅菌精製水を加えて、推奨温度で 2 ~ 4 時間反応させる。
- (l) 制限酵素消化した PCR 産物を 3%ゲルで泳動し、比較対照が切断され、陽性対照および試料が切断されないことを確認し、一次診断陽性とする。なお、EHNV のほかに同じオーストラリアのラナウイルス BIV もこの酵素では切断されないため、EHNV であるか否かは確定診断の結果を待つことになる。制限酵素切断断片長については表 1 を参照。
- ② PCR と PCR 産物の制限酵素断片長解析 (REA) を組み合わせた方法（確定診断用）
- (a) フォワードプライマーとして M153 : 5'-ATG ACC GTC GCC CTC ATC AC- 3'、リバープライマーとして M154 : 5'-CCA TCG AGC CGT TCA TGA TG- 3' を用いる他は一次診断用と同じである。
- M153 5'-ATG ACC GTC GCC CTC ATC AC -3'  
M154 5'-CCA TCG AGC CGT TCA TGA TG-3'  
増幅産物サイズ ; 625bp
- (b) 陰性対照にはバンドが認められず、陽性対照および比較対照には 625bp の増幅された MCP-2 領域の DNA のバンドが認められることを確認し、試料にこれらの対照と同様のバンドが認められれば、次の制限酵素消化のステップに移る。
- (c) PCR 産物を制限酵素 *Hinc* II, *Acc* I, *Fnu*4H I (NEB 社など) でそれぞれ消化する。方法は制限酵素のメーカーの指示に従う。
- (d) 制限酵素消化した PCR 産物を 3%ゲルで泳動し、比較対照、陽性対照の切断パターンを表 1 と比較し、試料の切断パターンが陽性対照と一致することを確認する。制限酵素切断断片長については表 1 を参照。
- ③ PCR と PCR 産物の塩基配列の決定による方法（確定診断用）
- (a) フォワードプライマーとして、Forward 5'-CGC AGT CAA GGC CTT GAT GT- 3'、リバープライマーとして、Reverse 5'-AAA GAC CCG TTT GCA GCA GCA AAC-

3'を用いる。

- (b) 調製したテンプレート試料 1  $\mu\text{L}$  を、PCR 用チューブ中で、0.1 $\mu\text{M}$  各プライマー、2.5 units *Taq* ポリメラーゼ、2.5mM  $\text{MgCl}_2$  を含む *Taq* ポリメラーゼバッファーに溶かす（この過程は耐熱性 DNA ポリメラーゼの試薬メーカーの指示に従う）。
- (c) チューブは（最初 94 $^{\circ}\text{C}$ ・30 秒間、続いて）95 $^{\circ}\text{C}$ ・60 秒間、55 $^{\circ}\text{C}$ ・60 秒間、72 $^{\circ}\text{C}$ ・60 秒間を 35 サイクル、最後に 72 $^{\circ}\text{C}$ ・15 分間（+ 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存）をプログラムしたサーマルサイクラー にか、PCR 反応を行う。

Forward 5'-CGC AGT CAA GGC CTT GAT GT -3'

Reverse 5'-AAA GAC CCG TTT GCA GCA AAC-3'

増幅産物サイズ；580bp

反応液組成 (1 検体分 TaKaRa EX *Taq* Hot Start Version を使う場合の一例)

Ex <i>Taq</i> HS (5 units/ $\mu\text{L}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
dNTP Mixture (2.5mM each)	4.0 $\mu\text{L}$
× 10 Buffer	5.0 $\mu\text{L}$
dDW (滅菌超純水)	38.5 $\mu\text{L}$
Fwd.M151 (10pmol/ $\mu\text{L}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
Rev.M152 (10pmol/ $\mu\text{L}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
検体	1.0 $\mu\text{L}$
合 計	50.0 $\mu\text{L}$

#### PCR 反応条件

##### 通常の PCR の場合

初期の変成	94 $^{\circ}\text{C}$	30min.
以下、変成～伸長を		35 サイクル
変成	95 $^{\circ}\text{C}$	1min.
アニーリング	55 $^{\circ}\text{C}$	1min.
伸長	72 $^{\circ}\text{C}$	1min.
最後の伸長	72 $^{\circ}\text{C}$	15min.
保持	4 $^{\circ}\text{C}$	$\infty$

- (d) 同様に 1 ~ 1.5%ゲルで PCR 産物を泳動し、陰性対照にはバンドが認められず、陽性対照には 580bp の増幅された DNA のバンドが認められることを確認し、試料に陽性対照と同様のバンドが認められれば、次の塩基配列の決定・比較のステップに移る。
- (e) 塩基配列の決定は、PCR 産物のダイレクトシーケンスまたは複数クローン（最低 3）以上の PCR 産物をクローニングした大腸菌プラスミドのシーケンスにより得られたコンセンサス配列を得ることによる。この配列を Genbank に登録されて

いる EHNV MCP 遺伝子 (GenBank accession No. AY187045) と比較し、該当領域の配列が EHNV と一致していることを確認する (インターネットのホモロジー解析サイトを用いて、得られた配列を BLASTN 解析にかけて比較する)。

表 1 各種ラナウイルスの PCR 産物の制限酵素切断断片パターン

PCR 産物	制限酵素	予想断片長 (bp)	切断パターン的一致するウイルス
MCP-1(321bp)	<i>Pfl</i> MI	321,	EHNV, BIV
		131, 190	FV3, ESV, ECV, WV, GV
MCP-2(625bp)	<i>Hinc</i> II	100, 138, 387	EHNV
		100, 525	BIV, FV3, ESV, ECV, GV
		100, 240, 285	WV
	<i>Acc</i> I	238, 387	EHNV
		625,	BIV, ESV, ECV, WV
		164, 461	FV3, GV
	<i>Fnu</i> 4HI	33, 38, 44, 239, 271	EHNV
		3, 33, 38, 44, 108, 399	BIV
3, 38, 44, 108, 432		FV3, GV	
3, 9, 44, 108, 151, 272		ESV, ECV	
3, 44, 71, 108, 399		WV	

BIV: Bole iridovirus, ESV: European sheatfish iridovirus, ECV: European catfish iridovirus, FV3: Frog viru3, WV: Wamena virus, GV: Gutapo virus

#### 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

生鮮個体を送付する場合は冷蔵で可能な限り短期間で到着するよう送付する。  
すでに凍結されていたサンプルの場合は解凍せずそのまま凍結状態で送付する。

#### 5. 参考文献

OIE マニュアル EHN



真1 EHNに感染したニジマス稚魚

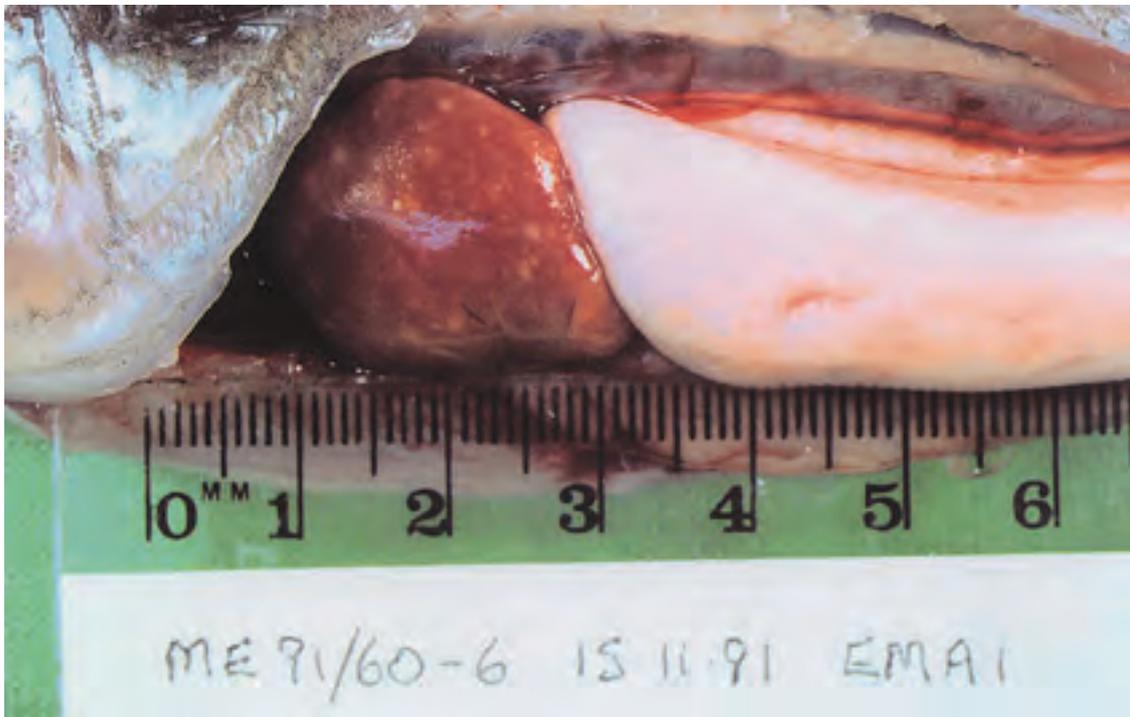


写真2 感染実験によりEHNに罹患したレッドフィンパーチ。肝臓に1～3mmの白点が多数見られる。

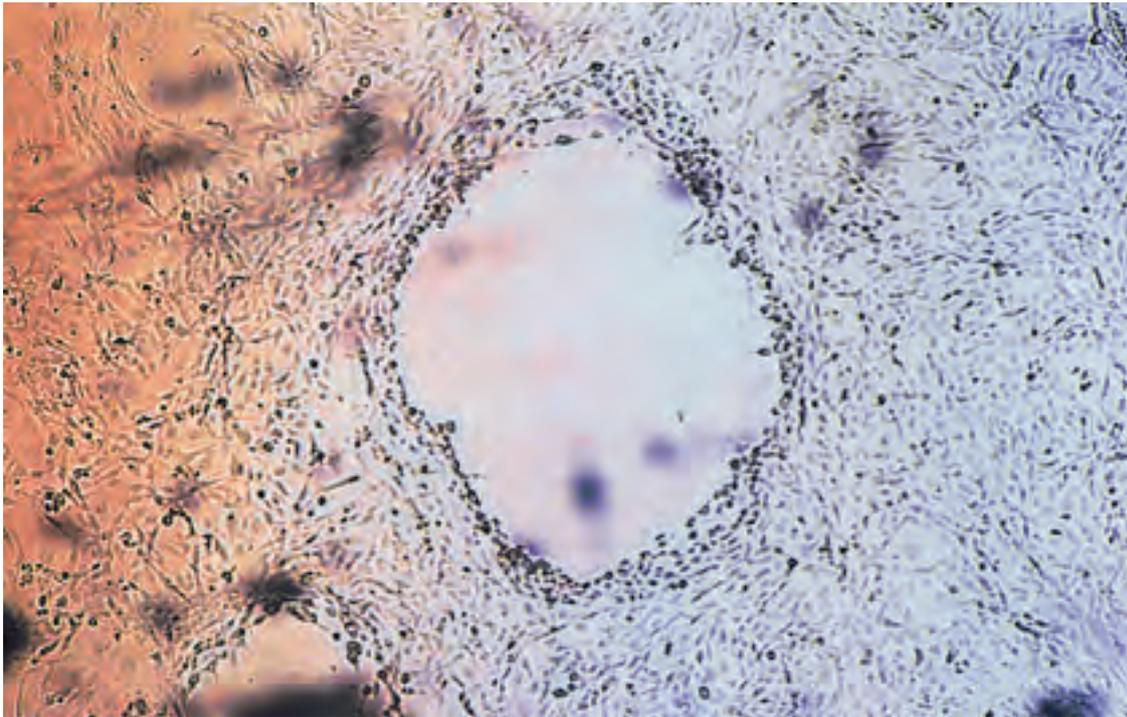


写真3 EHV-1感染 BF-2細胞。細胞の崩壊によるCPEが見られる。

注意：EHNに関する写真はすべて Elizabeth MacArthur Agricultural Institute, NSW Agriculture, NSW, Australia 元所属の R. Whittington 博士および Division of Animal Health, Australian Animal Health Laboratory (AAHL), C.S.I.R.O, Geelong, Vic. Australia 所属の A. Hyatt 博士のご厚意により、本マニュアルに限るとの使用条件のもとに提供されたものです。これら写真の著作権は NSW Agriculture ならびに C.S.I.R.O. にありますので、無断複写、他人への譲渡等は一切できません。

# ピシリケッチア症 Piscirickettsiosis

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：ピシリケッチア症  
英名：Piscirickettsiosis あるいは Salmonid rickettsial septicemia (SRS)
- ② 病原体：ピシリケッチア科

### (2) 地理的分布

- ① 初発国：チリ
- ② 分布域：アイルランド、ノルウェー、カナダ太平洋沿岸・大西洋沿岸、アメリカ合衆国太平洋沿岸

### (3) 宿主域

- ① 自然発病：サケ科魚類では、ギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*)、マスノスケ (*O. tshawytscha*)、タイセイヨウサケ (*Salmo salar*)、ニジマス (*O. mykiss*)、カラフトマス (*O. gorbuscha*)。  
サケ科魚類以外では、ヨーロッパアンシーバス (*Dicentrarchus labrax*) 等。
- ② 実験感染：ギンザケ (*O. kisutch*)、ニジマス (*O. mykiss*)、タイセイヨウサケ (*Salmo salar*)
- ③ キャリア：本症の発生は長期間に及ぶことが多く、発生期間中罹病魚は菌体を排出していると考えられる。
- ④ ベクター：伝播経路は不明。媒介生物による伝播の可能性もある。
- ⑤ その他：水平感染だけでなく、垂直感染の可能性も示唆されている。

### (4) 発生の特徴

- ① 基本的には海水飼育中のサケ科魚類で発症がみられる。
- ② ギンザケの場合、淡水飼育稚魚が海水中に移されて6～12週間後に発症する。
- ③ 春と秋に発生しやすい。
- ④ 例外的に、淡水飼育中のニジマス、ギンザケでの発症も報告されている。

### (5) 外観症状

- ① 体色が黒下し、遊泳が緩慢となる。
- ② 体表に白色小結節あるいは浅い出血性潰瘍（直径0.5～2.0cm）がみられる。

## (6) 剖検所見

- ① 肝臓表面皮下の黄白色の病巣が特徴的症狀であるが、瀕死魚であっても本症狀がみられる個体は少ない（5～10%）。
- ② 腹膜炎、臓器の褪色（貧血）、鰓の褪色、腹水の貯留がみられる。
- ③ 脾臓の軽度の腫脹、腎臓の褪色と腫脹がみられる。

## (7) 消毒

検討データがないため、施設・器具および手指の消毒は通常の細菌を対象とした消毒法を用いる。

## (8) 防除法

- ① 国外では、全菌体不活化ワクチンやサブユニットワクチンが市販されており、一定の効果を示す。
- ② 発病群の移動、感染耐過群の親魚としての飼育は行わない。

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

瀕死魚または当該疾病の外観症狀を示している死亡直後の個体を採取する。  
生魚は麻酔剤で麻酔、大型魚は撲殺する。

### (2) 検査のための試料の採材

- ① 魚体表面をアルコール綿あるいはアルコール噴霧器で消毒し、滅菌したハサミ・ピンセットを用いて解剖する。
- ② 内臓器の異常を調べ、剖検所見を記載する。
- ③ 肝臓及び腎臓を摘出する。
- ④ 肝臓及び腎臓の一部をメス等で切り出し、スライドグラス上に押し付けてスタンプ標本作製し（各臓器最低2枚；ギムザ染色）、ヘヤードライヤー（冷風）等で風乾後、スライドグラス立てに立てる。
- ⑤ 残りの肝臓及び腎臓は、臓器ごとにマイクロチューブ等の密封可能な滅菌済みのポリプロピレン製の容器に入れ、氷冷する。

## 3. 診断手順

### (1) スタンプ標本のギムザ染色

#### ① 準備

市販ギムザ染色液

1/12M リン酸ナトリウム緩衝液

- \* 1/12M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液と 1/12M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を混合して pH6.0 に調製する。

染色液（Working solution）

- \* 染色直前に市販ギムザ染色液を 1/12M リン酸緩衝液で 10 倍に希釈して使用する。

ディフ・クイック等の染色キットを用いる場合、染色手技は添付説明書に従う。

② 手技

- (a) メタノール固定したスタンプ標本を染色液に 30 分間浸漬する。
- (b) 水で洗う。
- (c) 風乾する。保存する場合は、キシレンに数分間浸漬した後、合成封入剤で封入する。
- (d) 油浸で顕微鏡観察を行う。

③ 顕微鏡観察

感染魚では、球菌状の菌体、あるいは 2 つの菌体がつながったリング状の菌体が宿主細胞内に観察される。上記像が観察された場合は、PCR 検査へ進む。

## (2)PCR 検査 1

① 菌体 DNA の抽出

ギムザ染色において細菌が多く観察された臓器に対して、適当な組織用 DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出する。抽出法などは、使用するキットのマニュアルに従う。なお、DNA 抽出に用いたマイクロチューブやマイクロチップなどはオートクレーブで滅菌して廃棄する。

② PCR

抽出した DNA および陽性対照 DNA をテンプレートとして、下記のプライマーおよび PCR 試薬を用いて PCR を行う。

③ プライマーおよび反応条件 4)

・プライマー

PSAL-F 5'-AGA CCT GAG GGT TAA AGA GGG C-3'

PSAL-R 5'-TCT CAG GTT CGC TCC ACA TC-3'

増幅産物サイズ 1108bp

・反応液組成 (1 検体分)

Taq ポリメラーゼ	0.1 μL
dNTPMixture	1.6 μL
× 10 Buffer	2.0 μL
dDW(滅菌超純水)	13.7 μL
プライマー PSAL-F(10pmol/ μL)	0.8 μL
プライマー PSAL-R(10pmol/ μL)	0.8 μL
検体	1.0 μL
合 計	20.0 μL

上記組成は、TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (タカラバイオ株式会社) の場合である。

PCR 反応条件

初期の変成	94℃	3min.
以下、変成～伸長を		38 サイクル
変成	94℃	30sec.
アニーリング	65℃	20sec.
伸長	72℃	90sec.
最後の伸長	72℃	5min.
保持	4℃	∞

④ PCR 産物の判定

PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 2% 程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。

臭化エチジウム存在下、トランスイルミネーターにより分子量 1108bp のバンドの有無を観察する。

目的のバンドが検出された場合は陽性と判定する。

(3)PCR 検査 2

① 菌体 DNA の抽出

初動診断の PCR 検査に供した臓器に対して、適当な組織用 DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出する。臓器が供試量に満たない等で DNA 抽出が困難な場合、初動診断に用いた DNA 抽出液を被検体とする。

抽出法などは、使用するキットのマニュアルに従う。なお、DNA 抽出に用いたマイクロチューブやマイクロチップなどはオートクレーブで滅菌して廃棄する。

② PCR

抽出した DNA および陽性対照 DNA をテンプレートとして、下記のプライマーおよび PCR 試薬を用いて PCR を行う。P. salmonis は遺伝的多型性が知られており、最終診断の場合、正確性を期すため (2) の PCR も併用した方が良い。

③ プライマーおよび反応条件 2)

・プライマー

RTS1 5'-TGA TTT TAT TGT TTA GTG AGA ATG A-3'

RTS4 5'-ATG CAC TTA TTC ACT TGA TCA TA-3'

増幅産物サイズ 283bp

・反応液組成 (1 検体分)

Taq ポリメラーゼ 0.1 μL

dNTPMixture 1.6 μL

× 10 Buffer 2.0 μL

dDW(滅菌超純水) 14.9 μL

プライマー RTS1(100pmol/ $\mu$ L)	0.2 $\mu$ L
プライマー RTS4(100pmol/ $\mu$ L)	0.2 $\mu$ L
検体	1.0 $\mu$ L
合 計	20.0 $\mu$ L

上記組成は、TaKaRa Ex *Taq*<sup>®</sup> Hot Start Version（タカラバイオ株式会社）を使用した場合である。

・PCR 反応条件

初期の変成	94℃	2min.
以下、変成～伸長を	39 サイクル	
変成	94℃	30sec.
アニーリング	50℃	30sec.
伸長	72℃	30sec.
最後の伸長	72℃	7min.
保持	4℃	$\infty$

④ PCR 産物の判定

PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 2%程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。

臭化エチジウム存在下、トランスイルミネーターにより分子量 283bp のバンドの有無を観察する。

目的のバンドが検出された場合は陽性と判定する。

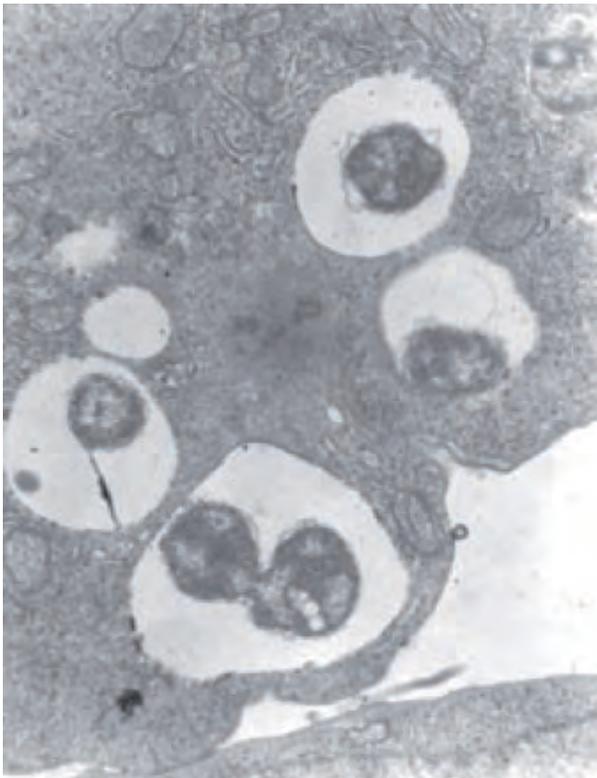
#### 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

- ① 病魚スタンプ標本をスライドグラスケースに入れ、テープ等で密封する。
- ② 腎臓及び肝臓を入れた各チューブのねじ蓋をテープ等で補強する。
- ③ 病魚スタンプ標本および病魚臓器を入れたチューブをそれぞれ防水防漏性の袋に入れ密封する。ジップ付き袋の場合は、ジップを閉めテープ等で密封する。
- ④ キムタオル等の吸水パッドとともに試料を一つの防水防漏性の袋に入れ密封する。
- ⑤ 試料と保冷剤（氷、ドライアイスは不可）とともに発泡スチロールに入れ、緩衝材等で隙間をうめる。
- ⑥ 当該個体の臨床検査・剖検記録・顕微鏡観察記録・PCR 検査記録を添付する。
- ⑦ 発泡スチロールの蓋を閉め、テープ等で密封する。
- ⑧ 増養殖研究所魚病診断・研修センターに電話し（電話番号 0596-66-1830）、試料送付の旨を伝え、送付日時を打ち合わせる。
- ⑨ 冷蔵宅配便で送付する。

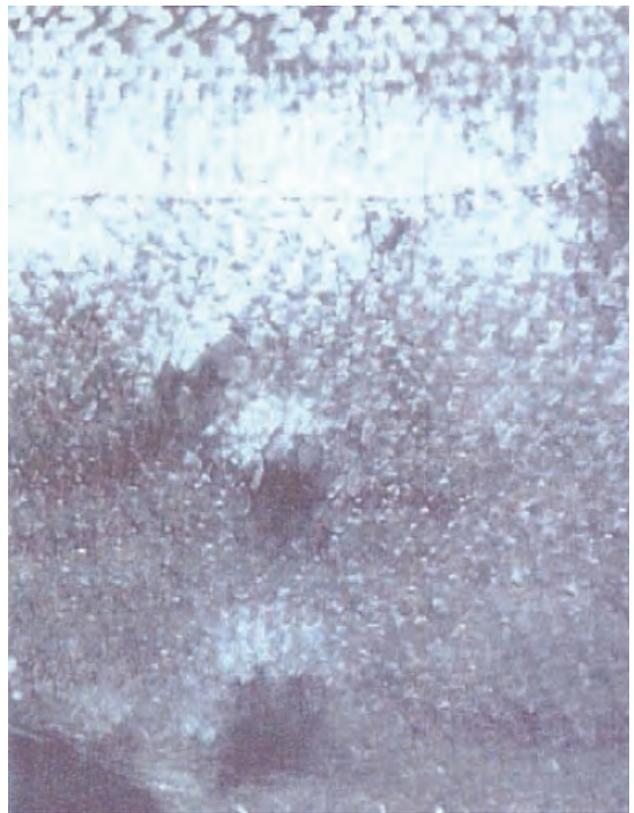
#### 5. 参考文献

- 1) Fryer, J. L. and R. P. Hedrick (2003): *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative

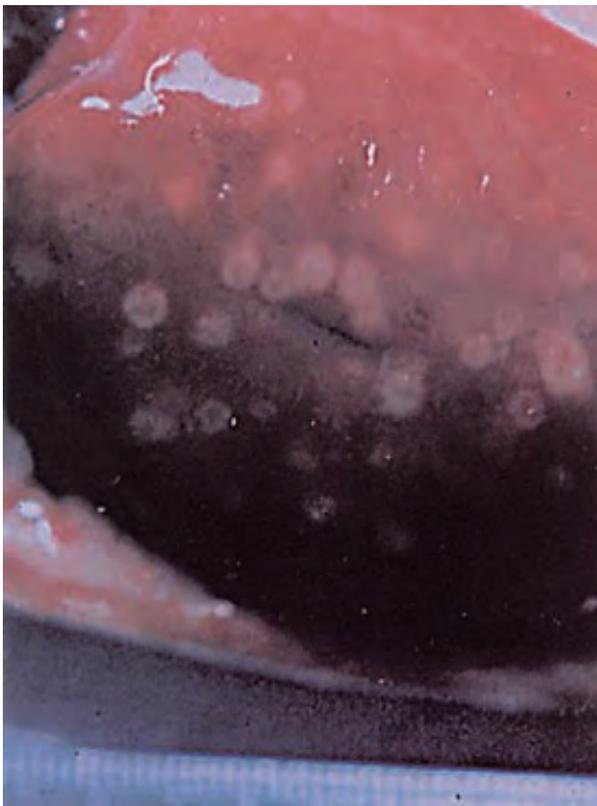
- intracellular bacterial pathogen of fish. *J. Fish Dis.*, 26, 251-62.
- 2) Marshall, S., S. Heath, V. Henríquez and C. Orrego (1998): Minimally invasive detection of *Piscirickettsia salmonis* in cultivated salmonids via the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3066-3069.
  - 3) Rozas, M. and R. Enríquez (2014): Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *J. Fish Dis.*, 37, 163-88.
  - 4) Sakai, T., A. Kumagai, H. Ohta, N. Oseko, M. Sano and T. Iida (2010): Improvement of PCR Targeting 16S Ribosomal DNA of *Piscirickettsia salmonis*. *Fish Pathol.*, 45, 140-142.



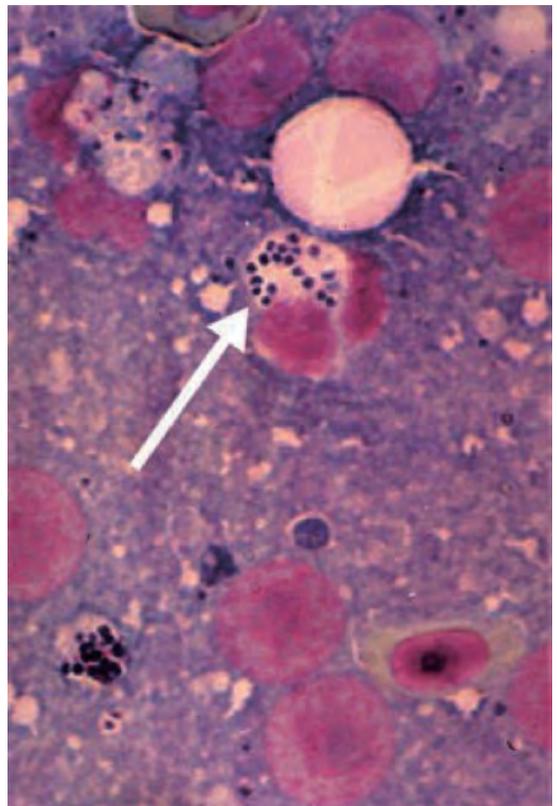
細胞内に寄生する *P. salmonis* の電子顕微鏡像 (吉水 守 博士 提供)



ギンザケの体表面にみられる小型の膨隆患部 (吉水 守 博士 提供)



ピシリケッチア症に罹病したギンザケの肝臓。白斑が観察される (吉水 守 博士 提供)



ピシリケッチア症に冒されたギンザケの腎臓塗抹標本 (ギムザ染色)。矢印が *P. salmonis* 菌体。(吉水 守 博士 提供)



# レッドマウス病

## ERM: Enteric redmouth disease

### 1. 疫学

#### (1) 病名と病原体

- ① 病名：レッドマウス病またはエンテリック・レッドマウス病  
英名：Enteric redmouth disease (ERM)
- ② 病原体：腸内細菌科 *Yersinia ruckeri*

#### (2) 地理的分布

- ① 初発国：アメリカ合衆国
- ② 分布域：カナダ、チリ、ベネズエラ、ヨーロッパ諸国、イラン、南アフリカ、オーストラリア、ニュージーランド、トルコ、日本

#### (3) 宿主域

- ① 自然発病：ほとんど全てのサケ科魚類が感染する。サケ科魚類以外では、二ホンウナギ (*Anguilla japonica*)、アムールチョウザメ (*Acipenser schrencki*)、シベリアチョウザメ (*Acipenser baerii*)、ナマズ (*Ictalurus punctatus*) など。
- ② 実験感染：コイ (*Cyprinus carpio*)
- ③ キャリア：感染耐過魚はキャリアとなり、主として腸管内に原因菌を長期にわたり保持し、過密飼育、低酸素、高水温、ハンドリングなどのストレスにより、本病の発生および環境中への原因菌の排出を繰り返す。
- ④ ベクター：甲殻類（ザリガニ）、鳥類、ほ乳類（ネズミ）からも *Y. ruckeri* は分離されており、宿主域は広いと考えられる。

#### (4) 発生の特徴

- ① 1950年代に米国アイダホ州のニジマスで発生し、北米大陸に広がった。
- ② 本病は7.5 cmほどに成長したニジマスに発生しやすい。
- ③ 病状の経過により急性型、亜急性型、慢性型に分けられる。
  - 急性型：春から夏にかけての水温上昇期に、主として当歳魚に発生するもので、30～60日間に死亡率は50～70%に達する。
  - 亜急性型：秋から冬にかけての水温下降期に流行し、死亡率は急性型より低いが、2～6ヶ月で10～50%に達する。
  - 慢性型：死亡率は約10%と低いが、商品サイズの魚や親魚に発生しやすい点の問題となる。
- ④ 水温13℃付近では、ハンドリング等のストレスが発症の要因になりやすい。18℃以上では、病勢が著しく強くなる。また、10℃以下では、病勢が著しく低くなると考えられている。

### (5) 外観症状

体色の黒化が見られる。口吻部、口腔内、下顎及び鰭基部が赤変（皮下出血）する。

### (6) 剖検所見

肝臓、脂肪組織、腸間膜、腸後部などに出血が認められる。脾臓の腫大が認められる。胃腸管後部又は排泄物に黄色粘液物が認められる。

### (7) 消毒

- ① 殺菌消毒剤の消毒用エタノール（70%エタノール）、消毒用イソプロピルアルコール（50%イソプロピルアルコール）、5%ヒビテン液、オスバンS等の逆性石けん液は、用法・用量において *Y. ruckeri* に対して殺菌効果を示し、手指や器具類の消毒に有効と考えられる。
- ② 次亜塩素酸ナトリウムは、有効塩素濃度 2ppm 以上で *Y. ruckeri* に対する殺菌効果が認められる。養殖池や池水を消毒する際は、池水等に含まれる有機物により塩素が消費されることを考慮し、有効塩素濃度 2ppm を下回らないように使用するとよい。
- ③ ポピドンヨード水溶液に対しては、有効ヨウ素濃度 4ppm 以上で *Y. ruckeri* に対する殺菌効果が認められる。

### (8) 防除法

- ① 血清型の一致が前提となるが、全菌体不活化ワクチンが有効である。
- ② 発病群の移動、感染耐過群の親魚としての飼育は行わない。
- ③ 発病池を消毒する。
- ④ 垂直感染を避けるため、受精作業時の消毒は重要であり、ポピドンヨード水溶液による媒精前の未受精卵の消毒が効果的である。

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

少なくとも 5 尾の瀕死魚または当該疾病の外観症状を示している死亡直後の個体を採取する。外観症状を観察し、症状を記録する。魚体重や体長、稚魚では、下顎の発赤等が顕著で無い場合もある。

### (2) 検査のための試料の採材

- ① できるだけ発生現場で細菌分離を行う。やむを得ず検査機関まで搬送して菌分離を行う場合は、生きたままビニール袋などで酸素詰めにし、水温変動に注意する。または、検査魚を現場で即殺後、個体ごとに別々に無菌の密閉可能な容器に包装し、氷冷または冷蔵状態で 24 時間以内に検査機関まで搬送する。検査魚として死魚しか入手できない場合は、なるべく新鮮なものを採取し、個体ごとにビニール袋などで密閉包装し、氷冷または冷蔵状態で搬送する。検査魚には採取場所および日時を明記した

ラベルを添付する。

魚体サイズによる検査部位：

全長 5 cm 以下の魚では腎臓を含む内臓全体を試料とする。

全長 5 cm 以上の魚では腎臓を試料とする。

- ② 魚体表面をアルコール綿等で消毒後、滅菌済のハサミ、ピンセット等を用いて開腹する。
- ③ 肝臓、脂肪組織、腸間膜、腸後部などの出血、脾臓の腫大、胃腸管後部又は排泄物における黄色粘液物の有無を中心に内臓器の異常を調べ、剖検所見を記載する。

### 3. 診断手順

#### (1) TSA 培地による細菌の分離

- ① TSA 培地には、トリプトケースソイ寒天培地（ベクトンディッキンソン）、トリプトソーヤ寒天培地（日水製薬株式会社）或いは、これらとの同等品を用いる。
- ② 滅菌済のハサミ、ピンセット等を用いて検査魚の腎臓を露出させる。通常は開腹後、腹側から鰓を除去し、腎臓を露出させる。死亡後時間が経過し、内臓（特に腸管）の損傷や融解が予想される場合には、背部皮膚を 70%アルコール綿または噴霧器で消毒した後、背側から背骨まで切開し、腎臓を露出させる。
- ③ 白金耳を用いて、腎臓を TSA 培地に塗抹する。
- ④ 菌体塗抹後のシャーレはビニールテープ等で密閉後、検査機関まで保冷容器に十分量の氷または冷媒を入れ搬送する。但し、凍結しないよう注意する。
- ⑤ 試料接種した培地は 25℃で 3 日間培養する。培養期間中毎日、出現するコロニーの形態（直径、色、透明感、コロニー周縁の形状、コロニー全体の形状）を観察する。TSA 培地では、コロニーは円形で小さく、乳白色で半透明、構造は均質、表面は平滑、辺縁は平滑で明瞭、色素の産生はない。
- ⑥ 試料接種した培地にコロニーが現れたら、性状検査を実施する。3 日後においてもコロニーが出現しなければ、試料は陰性と診断する。

#### (2) 性状検査 グラム染色

- ① 市販のグラム染色キットを用いることができる（日水製薬フェイバー G 等）。
- ② スライドガラスに被検菌を薄く塗抹し、空气中で自然乾燥後、ガラス裏面より火炎固定する。固定は、メタノール固定で行ってもよい。
- ③ フェイバー G を用いた場合、染色液 A をスライドガラス上の塗抹面に滴下し、正確に 1 分間染色後、穏やかに水洗いする。
- ④ 軽く動かしながら脱色液で染色液 A の青色が溶け出さなくなるまで脱色後、十分に水洗いする。
- ⑤ 染色液 B を滴下し、正確に 1 分間染色後、水洗する。青色、赤色ともに染めすぎると色調が暗くなり、判別しづらくなるので、過染は避ける。
- ⑦ 顕微鏡にて菌の色調および形態（球菌、桿菌など）を観察する。グラム陽性菌は青色、陰性菌は赤色に染まる。*Y. ruckeri* は、赤色の短桿菌として染色される。
- ⑧ 顕微鏡が無い等でグラム染色の実施が困難な場合、以下のグラム鑑別により判定し

でも良い。3%水酸化カリウム水溶液をスライドグラスに1滴のせ、それに平板培地上のコロニーを白金耳で取ってよく混ぜる。液が粘稠で糸を引くようになればグラム陰性菌、変化がなければグラム陽性菌である。

### (3) チトクローム・オキシダーゼ試験

- ① 市販のチトクローム・オキシダーゼ試験用紙や綿棒等を用いることができる。
- ② 試験用紙の場合、先ず紙を精製水で湿らせ、ガラス棒などで被検菌を試験紙の表面になすりつける。なお、ニクロム線は擬陽性の原因となるため用いない。
- ③ 1分以内に深青色を呈するものを陽性、無変化を陰性とする。

### (4) PCR 検査 (初動診断)

#### ① 菌体 DNA の抽出

熱抽出法または市販の DNA 抽出キット等により菌体 DNA を抽出する。DNA 抽出に用いたマイクロチューブやマイクロチップなどはオートクレーブで滅菌して廃棄する。

熱抽出：マイクロピペットチップ等を用いて釣菌した少量の菌体を 100  $\mu$ L の TE バッファー (10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA) に懸濁し、98°C で 10 分間加熱処理する。遠心分離 (12,000rpm、3 分間) に供し、菌体残滓を沈殿させ、上清 1  $\mu$ L を PCR の鋳型として用いる。

DNA 抽出キット：使用するキットのマニュアルに従う。

#### ② PCR

抽出した DNA および陽性対照 DNA をテンプレートとして、下記のプライマーおよび PCR 試薬を用いて PCR を行う。

#### ③ プライマー及び反応条件 2)

・プライマー

YER3 5'-CGA GGA GGA AGG GTT AAG T-3'

YER4 5'-AAG GCA CCA AGG CAT CTC T-3'

増幅産物サイズ；588bp

・反応液組成 (1 検体分)

Taq ポリメラーゼ	0.1 $\mu$ L
dNTPMixture	1.6 $\mu$ L
× 10 Buffer	2.0 $\mu$ L
dDW(滅菌超純水)	14.9 $\mu$ L
Fwd. YER3(100pmol/ $\mu$ L)	0.2 $\mu$ L
Rev. YER4(100pmol/ $\mu$ L)	0.2 $\mu$ L
検体	1.0 $\mu$ L
合 計	20.0 $\mu$ L

## PCR 反応条件

初期の変成	94℃	5min.
以下、変成～伸長を	30 サイクル	
変成	94℃	40sec.
アニーリング	60℃	40sec.
伸長	72℃	1min.
最後の伸長	72℃	5min.
保持	4℃	∞

### ④ PCR 産物の判定

PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 2% 程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。

臭化エチジウム存在下、トランスイルミネーターにより分子量 588bp のバンドの有無を観察する。

目的のバンドが検出された場合は陽性と判定する。

## (5) 分離コロニーの PCR 検査 (最終診断)

### ① 菌体 DNA の抽出

(6) ①の手技と同様に行う。

### ② PCR

抽出した DNA および陽性対照 DNA をテンプレートとして、下記のプライマーおよび PCR 試薬を用いて PCR を行う。

### ③ プライマー及び反応条件 3)

・プライマー

ruck1 5'-CAG CGG AAA GTA GCT TG-3'

ruck2 5'-TGT TCA GTG CTA TTA ACA CTT AA-3'

増幅産物サイズ；409bp

・反応液組成 (1 検体分)

Taq ポリメラーゼ	0.1 μL
dNTP Mixture	1.6 μL
× 10 Buffer	2.0 μL
dDW(滅菌超純水)	14.9 μL
Fwd. ruck1 (100pmol/ μL)	0.2 μL
Rev. ruck2 (100pmol/ μL)	0.2 μL
検体	1.0 μL
合 計	20.0 μL

・PCR 反応条件

通常の PCR の場合

初期の変成	94℃	5min.
以下、変成～伸長を	30 サイクル	
変成	94℃	40sec.
アニーリング	60℃	40sec.
伸長	72℃	1min.
最後の伸長	72℃	5min.
保持	4℃	∞

④ PCR 産物の判定

PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 2% 程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。

臭化エチジウム存在下、トランスイルミネーターにより分子量 409bp のバンドの有無を観察する。

目的のバンドが検出された場合は陽性と判定する。

#### 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

- ① 細菌検査および PCR 検査で陽性と判定された分離コロニーを TSA 培地に接種し、25℃で 24～48 時間培養する。
- ② シャーレをビニールテープ等で密閉し、キムタオル等の吸水パッドで包む。
- ③ 防水防漏性の袋に入れ密封する。ジップ付き袋の場合は、ジップを閉めテープ等で密封する。
- ④ 吸水パッドとともに試料を防水防漏性の袋に入れ密封する。
- ⑤ 試料と保冷剤（氷、ドライアイスは不可）とともに発泡スチロールに入れ、緩衝材等で隙間をうめる。
- ⑥ 当該個体の臨床検査・剖検記録・細菌検査記録・PCR 検査記録を添付する。
- ⑦ 発泡スチロールの蓋を閉め、テープ等で密封する。
- ⑧ 増養殖研究所魚病診断・研修センターに電話し（電話番号 0596-66-1830）、試料送付の旨を伝え、送付日時を打ち合わせる。
- ⑨ 冷蔵宅配便で送付する。

#### 5. 参考文献

- 1) Barnes, A. C. (2011): Enteric redmouth disease (ERM) (*Yersinia ruckeri*). In “Fish disease and disorders Vol. 3 Vial, bacterial and fangal infections 2nd edition” (ed. by P. T. K. Woo and D. W. Bruno), CABI Publishing, New York, pp. 484-511.
- 2) Del Cerro, A., I. Marquez and J. A. Guijarro (2002): Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three

---

major fish pathogens, by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5177-5180.

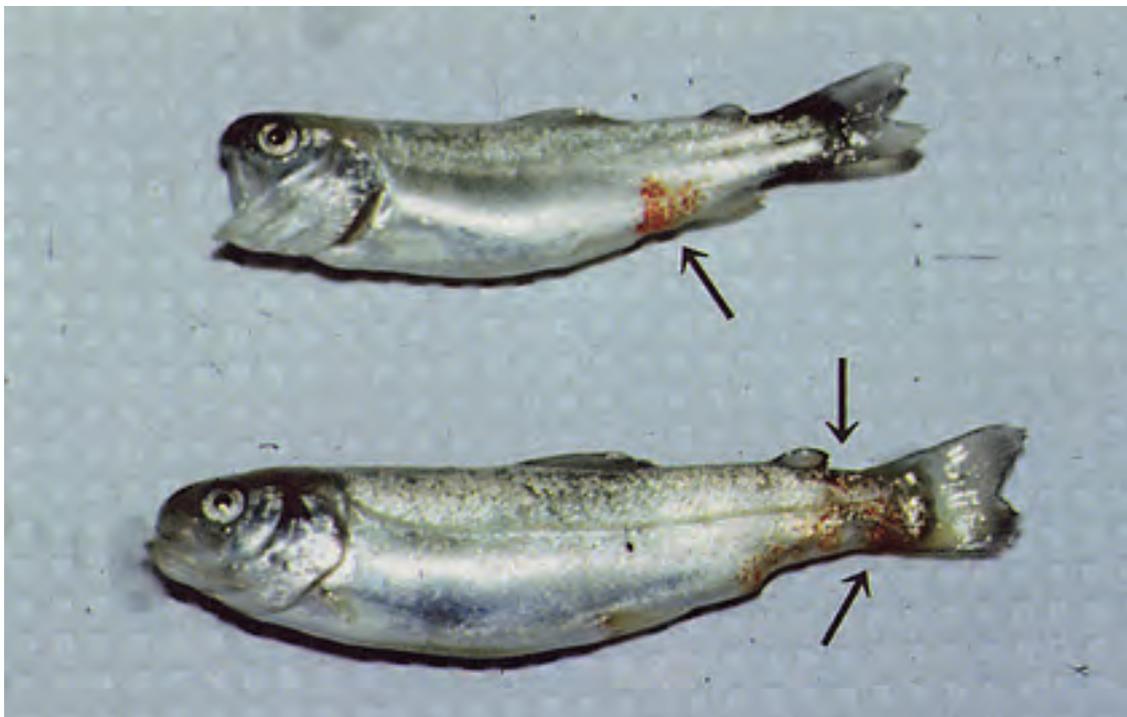
- 3) LeJeune, J. T. and F. R. Rurangirwa (2000): Polymerase chain reaction for definitive identification of *Yersinia ruckeri*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 12, 558-561.
- 4) Furones, M. D., C. J. Rodgers and C. B. Munn (1993): *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *Annual Rev. of Fish Diseases.*, 3, 105-125.
- 5) Sakai, T., C. Nakayasu T. Ito, S. Miwa, N. Oseko and T. Iida (2012): Virulence of *Yersinia ruckeri* for Four Indigenous Fish Species in Japan. *Fish Pathol.*, 47, 74-79.
- 6) 坂井貴光・大迫典久・飯田貴次 (2006): レッドマウス病原菌の簡易迅速検出法について. *魚病研究*, 41, 127-130.



イワナ実験感染魚：体色黒化、下顎および鰭基部等の発赤がみられる。(坂井 貴光 博士提供)



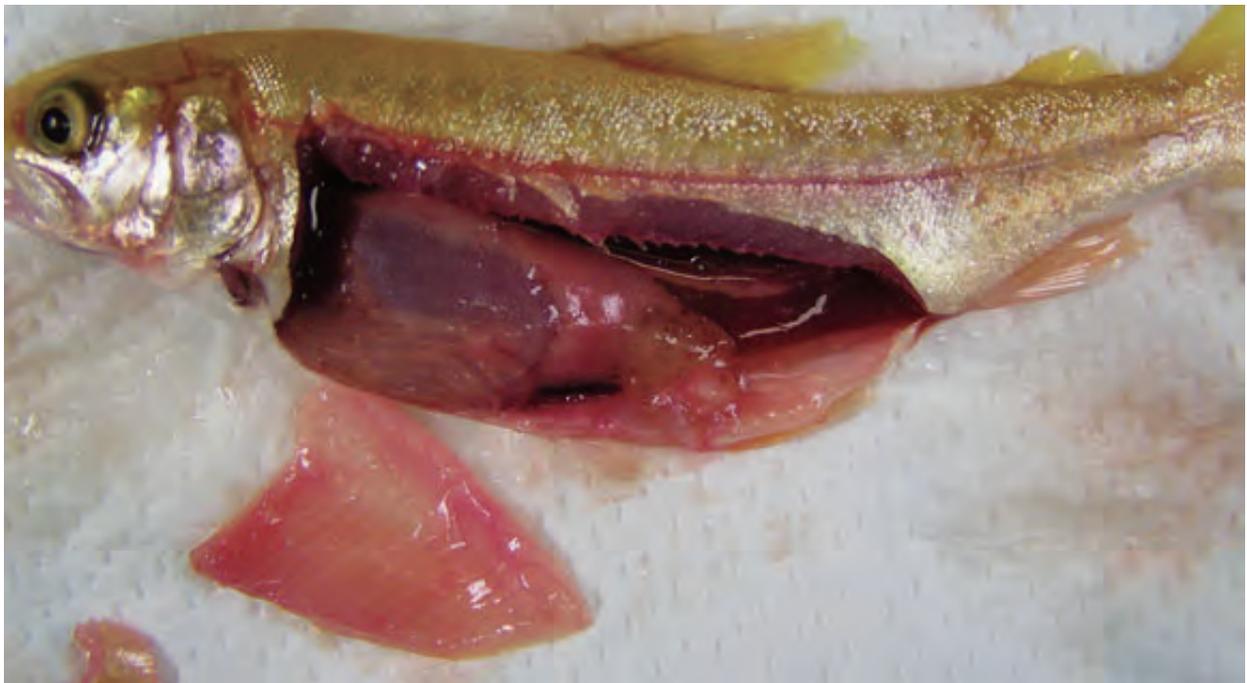
ニジマス実験感染魚：口腔内、口吻部、下顎、鰭基部および肛門部位に発赤がみられる。(坂井 貴光 博士提供)



罹病したニジマス稚魚。尻鰭基部や尾柄部皮下に出血（矢印）がみられる。(S. Lapatra 博士提供)



罹病したニジマスの口腔内の症状。写真左：口腔内上側の皮下出血（下顎を切除して撮影）、写真中央：胸部腹面の皮下出血、写真右：口腔内下側の皮下出血（上顎吻部を切除して撮影）。（吉水 守博士提供）



ニジマス（実験感染魚）：肝臓、脂肪組織、腸間膜、腸後部などに出血が認められる。脾臓の腫大が認められる。（坂井 貴光 博士提供）



ニジマス（罹病魚）：脂肪組織および腸間膜に出血がみられる。（S. Lapatra 博士提供）



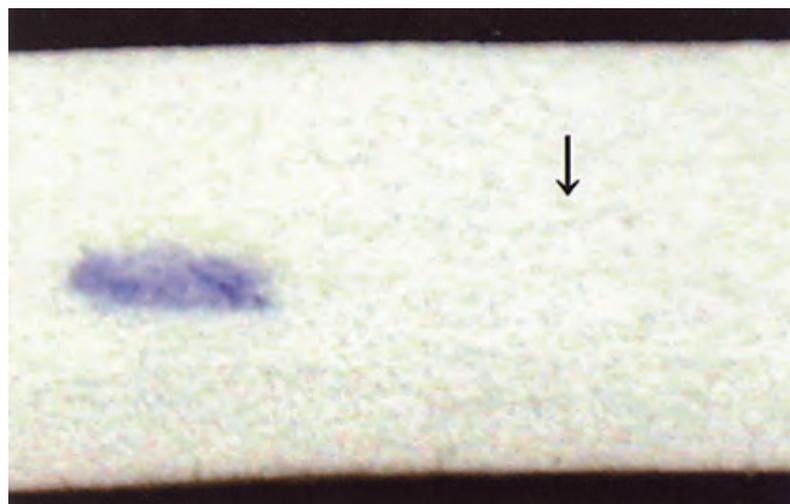
ニジマス（罹病魚）：鰓（白矢印）および腹膜（黒矢印）に出血がみられる。（S. Lapatra 博士提供）



菌分離のため背面から切開する場合（矢印は腎臓）。



TSA 培地における *Y. ruckeri* のコロニー。(48 時間培養後) 左：透過光で撮影、右：落射光で撮影



チトクローム・オキシダーゼ試験結果。*Y. ruckeri* は陰性（右、矢印）、左は陽性対照。



# 旋回病 Whirling Disease

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：旋回病  
英名：Whirling Disease
- ② 病原体：*Myxobolus cerebralis*（ミクソゾア門、粘液胞子虫綱、双殻目、ミクソボルス科、ミクソボルス属）

### (2) 地理的分布

- ① 初発国：ドイツ
- ② 分布域：ヨーロッパ諸国、アメリカ合衆国、ロシア、南アフリカ、中南米諸国、オーストラリア、ニュージーランド。ただし、交互宿主であるイトミミズが分布する地域であれば、どこでも発生する可能性がある。

### (3) 宿主域

- ① 自然発病：多くのサケ科魚類が発病し得るが、魚種によって感受性に違いがある。ニジマス、ベニザケ、スチールヘッドは感受性が高く、ブルックトラウト、カットスロートトラウト、タイセイヨウサケ、マスノスケは中程度、ブラウントラウト、ブルトラウト、ギンザケ、スプレイクは比較的抵抗力がある。
- ② 実験感染：同一魚種でも系統によって感受性に差がある。
- ③ キャリア：感受性の高い魚種の成魚はキャリアになる。

### (4) 発生の特徴

水温 16～17℃・90 日間、12～13℃・120 日間で胞子が成熟することを考慮すると、積算温度で 1800℃・日が発症に必要だと考えられる。罹病は稚魚期に多く、成魚期には少ない。死亡率はときに 90%に達する。

### (5) 外観症状

- ① 旋回遊泳（写真1）。
- ② 骨曲がり、あるいは頭骨の変形や体躯幹部の湾曲（写真2）。
- ③ 尾柄部の黒化。

### (6) 剖検所見

特徴的な剖検所見は報告されていない。

### (7) 消毒

- ① 土や有機物の洗浄・除去。
- ② 90℃以上の温度で 10 分間の処理。
- ③ 24 時間以上の乾燥。天日干しが理想的。
- ④ 500 ppm 次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) で 10 分間の消毒。
- ⑤ 第 4 級アンモニウム化合物 (1500 ppm) で 10 ~ 15 分間の消毒。

### (8) 防除法

- ① コンクリート池で飼育する。
- ② 飼育水を紫外線またはオゾンで処理する。
- ③ 発病前の時期に抗生物質フマギリンを経口投与する。

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

外観的に 1 (5) の症状を呈する検体（おもに稚魚）を収集する。

### (2) 検査のための試料の採材

胞子の確認のため、検体の頭部を切断して冷蔵または冷凍保存する。PCR 検査用には、冷凍した頭部を用いてもよいが、90%エタノールで固定して保存してもよい。病理組織検査に用いるため、鰓及び頭蓋底部を含む頭部を Davidson 液で固定して保存しておく。

## 3. 診断手順

### ① 酵素消化軟骨の観察 (Markiw and Wolf, 1974)

(a) 材料：新鮮な頭部組織（大型魚では一部のみでも可）をチャック付き袋に入れた状態で、外部から物理的に圧迫して潰し、ホモジナイズする。ホモジネートを 50 mL チューブに移し、下記の酵素処理により消化し、軟骨を採取する。

ペプシン消化；約 20 倍量の 0.5% ペプシン液 (pH<4.0) を加え、37℃で攪拌しながら消化する。稚魚なら 1 時間で十分であるが、成魚なら 2 時間から一晩かけて消化したのち、遠心 (1200 x g, 10 min.) してペプシン消化液を除去後、ペレットを得る。

(b) トリプシン消化；上記ペレットに対して約 20 倍量の 0.5% トリプシン液 (pH=8.5) を加え、室温で 30 分間消化し、約 200 μm のメッシュでろ過後、遠心 (1200 x g, 10 min.) してペレットを得る。

(c) デキストロースによる遠心濃縮；旋回病の疑いが濃いのに胞子が検出されない場合や、組織残渣が多く検鏡が困難な場合に行う。55%デキストロース溶液を 15 mL チューブに 5 cm の深さまで入れた後、検体のホモジネート液を静かに重層する。遠心 (1200 x g, 30 min.) 後、上清を除去し、ペレットを得る。

(d) 胞子の観察；スライドガラス上に酵素消化した胞子液を一滴垂らし、カバーガラスを載せてウェットマウントで観察、あるいは血球計算盤等を用いて観察する。

顕微鏡の 200 倍（対物 20 倍、接眼 10 倍）で 150 視野を観察し、胞子を観察する。代表的な 10 個の胞子についてサイズの平均値と範囲を測定し、8 ~ 10  $\mu\text{m}$ 、円形で極嚢 2 個であれば、陽性と推定診断する（写真 3）。

#### (イ) PCR 法

材料：PCR 用に採取した頭部軟骨組織あるいは 3 (ア) で作製した酵素消化軟骨サンプル。

- ・プライマー (Andree *et al.*, 1998) :

Tr5-16 : 5'-GCA TTG GTT TAC GCT GAT GTA GCG A-3'

Tr3-16 : 5'-GAA TCG CCG AAA CAA TCA TCG AGC TA-3'

増幅産物サイズ ; 1300 bp

- ・反応液組成 (1 検体分)

Taq ポリメラーゼ	0.4 $\mu\text{L}$
dNTP Mixture	4.0 $\mu\text{L}$
× 10 Buffer	5.0 $\mu\text{L}$
dDW(滅菌超純水)	32.1 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1.5 $\mu\text{L}$
Fwd. Tr5-16(20 $\mu\text{M}$ )	2.0 $\mu\text{L}$
Rev. Tr3-16(20 $\mu\text{M}$ )	2.0 $\mu\text{L}$
検体	2.0 $\mu\text{L}$
合 計	49.0 $\mu\text{L}$

- ・PCR 反応条件

通常の PCR の場合

初期の変成 95°C 5 min.

以下、変成~伸長を 35 サイクル

変成 95°C 1 min.

アニーリング 65°C 2 min. 30 sec.

伸長 72°C 1 min. 30 sec.

最後の伸長 72°C 10 min.

保持 4°C  $\infty$

## 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

- ① 生鮮個体を送る場合：冷蔵 (4°C) または冷凍 (-20°C ~ -80°C) で輸送する。
- ② 固定標本を送る場合：冷蔵 (4°C) で輸送する。
- ③ 精製胞子標本を送る場合：冷蔵 (4°C) で輸送する。

## 5. 参考文献

Andree, K. B., E. MacConnell and R. P. Hedrick (1998): A nested polymerase chain reaction for the detection of genomic DNA of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, 34, 145-154.

Gilbert, M. A. and W. O. Granath Jr. (2003): Whirling disease of salmonid fish: life cycle, biology, and disease. *J. Parasitol.*, 89, 658-667.

Markiw, M. E. and K. Wolf (1974): *Myxosoma cerebralis*: isolation and concentration from fish skeletal elements – sequential enzymatic digestions and purification by differential centrifugation. *J. Fish. Res. Board Can.* 31, 15-20.

Hedrick, R. P., M. El-Matbouli, M. A. Adkison and E. MacConnell (1998): Whirling disease: re-emergence among wild trout. *Immunol. Rev.*, 166, 365-376.



写真1 旋回病に罹病し、旋回遊泳するニジマス。(Dr. Stephen Atkinson: Oregon State University 提供)



写真2 旋回病に罹病したニジマス。体躯間部の湾曲と尾部の黒色化がみられる。(Dr. Stephen Atkinson: Oregon State University 提供)



写真3 *Myxobolus cerebralis* の孢子。(Dr. Stephen Atkinson: Oregon State University 提供)



# コイ春ウイルス血症 SVC : Spring Viremia of Carp

## 1. 疫 学

### (1) 病名と病原体

- ① 病 名：コイ春ウイルス血症  
英 名：Spring Viremia of Carp (SVC)
- ② 病原体：ラブドウイルス科に属する SVC ウイルス。  
別名 Rhabdovirus carpio

### (2) 地理的分布

- ① 初発国：正確には不明であるが、古くから (中世ヨーロッパ) 中央ヨーロッパおよび東ヨーロッパを中心に、コイの大量死が知られていた。1971 年に Fijian らが本症を命名した。
- ② 分布域：ほとんどのヨーロッパ各国、旧ソ連邦西部 (ベラルーシ、グルジア、リトアニア、モルドバ、ロシア、ウクライナ) で報告がある。近年はブラジル、アメリカ合衆国、カナダで報告がある

### (3) 宿主域

- ① 自然発病魚：コイ科魚類のマゴイ (*Cyprinus carpio carpio*)、ニシキゴイ (*Cyprinus carpio koi*)、フナ (*Carassius carassius*)、キンギョ (*Carassius auratus*)、ハクレン (*Hypophthalmichthys molitorix*)、コクレン (*Aristichthys nobilis*)、ソウギョ (*Ctenopharyngodon idella*)、オルフェ (*Leuciscus idus*)、テンチ (*Tinca tinca*) で報告がある。コイ科以外ではヨーロッパナマズ (*Silurus glanis*) およびニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) からウイルス分離の報告がある。感受性はコイ類が最も高く、ついでコイ科魚種、コイ科以外の魚種の順となる。
- ② 実験感染魚：ローチ (*Rutilus rutilus*)、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) などのその他のコイ科魚類、グッピー (*Lebistes (=Poecilia) reticulata*)、およびパイク (*Esox lucius*) などで感受性が報告されている。

### (4) 発生の特徴

一般的に幼魚で感受性が高いが、年齢を問わず成魚でも感染する。病名が示すように、一般に春先の水温上昇期によくみられる。水温が 7℃を越えると発生し、10 から 15℃で最も被害が大きい。17℃を越えると外観症状が明瞭でなくなることもあるが、死亡はみられる。23℃を越えると死亡はみられなくなる。感染耐過魚はウイルスキャリアーとなり、外観症状を示すことなくウイルスを排出する。結果としてこれらが次なる感染源となり、本ウイルスに感受性を有

する魚種に伝播する。本疾病は発生初期および終期のコイ類や、コイ以外の魚種では外観症状が明瞭でない場合があるので注意を要する。

## (5) 外観症状

罹病魚には腹部膨満や体色の暗化（写真 1）、体表の点状出血や眼球突出（写真 2）、粘液便、鰓の褪色（写真 3）などがみられる。

## (6) 剖検所見

罹病魚には内臓器（肝臓、腎臓、腸管、心臓）および腹膜や腹部脂肪組織の点状出血、脾腫、鰓の点状出血（写真 3）、体側筋の点状出血（写真 4）、顕著な腹水（透明または出血性）の貯留、浮腫などが主にみられる。

## (7) 消毒

消毒に関しては病性鑑定指針を参照。

## (8) 防除法

- ① 化学療法は無効である。
- ② 発病群の移動、感染耐過群の親魚としての飼育は疾病蔓延のおそれがあるので行わない。
- ③ 発病池の消毒を行う。
- ④ 細菌等の 2 次感染を薬剤で抑止することは有効である。

## 2. 試料採取

### (1) 被検魚の収集

- ① 少なくとも 10 尾の瀕死魚または当該疾病の外観症状を示す生存魚を採取する。
- ② 被検魚の収集から採材まではできるだけ速やかに行うことが望ましい。
- ③ 被検魚を検査機関まで輸送する場合は、生きたままビニール袋などに入れて酸素パッキングし、水温変動に注意して搬送するか、検査対象魚を個体ごと別々に無菌の密閉可能な容器に収容し、氷冷または冷蔵状態で 48 時間以内に搬送する。搬送の際、被検魚が凍結することのないよう注意する。
- ④ 被検魚として死魚しか入手できない場合は、なるべく新鮮なものを採取し、個体ごとにビニール袋などで密閉包装し、氷冷または冷蔵状態で搬送する。
- ⑤ 臓器試料または被検魚には採取場所および日時を明記したラベルを添付する。

### (2) 外観症状および剖検所見の記載

- ① オイゲノールなどの麻酔剤で麻酔するか、または大型魚では撲殺する。
- ② 外観症状を記載する（1-(5) 外観症状の項参照）。
- ③ 魚体表面を 70% アルコール綿またはアルコール噴霧器で消毒し、滅菌したハサミやピンセットなどで解剖する（被検魚の採取から 48 時間以内に行う）。
- ④ 内臓の異常を調べ、剖検所見を記載の上、検査に必要な部位を採取する（1-(6) 剖検所見の項参照）。

### (3) ウイルス検査のための臓器試料の採材

- ① 明らかに病徴を呈している魚
  - (a) 全長 4cm 以下の仔魚  
魚全体を試料とする。

(b) 全長 4 ～ 6cm の魚

腎臓を含む内臓全体および脳を試料とする。

(c) 全長 6cm 以上の魚

腎臓、脾臓および脳を試料とする。(後述の 3-(1) の組織を用いた RT-PCR には腎臓のみを使用)

② 病徴の見られない魚 (不顕性感染が疑われる魚)

上記①の試料に鰓を加える。

#### (4) 採材済み試料等の処理

採材済み試料および器具などは病原体による汚染・伝播を防止するために以下の処置を施す必要がある。被検魚、臓器試料の残りは焼却処分やオートクレーブ処理、輸送用コンテナおよび水は次亜塩素酸ソーダなどで消毒する。解剖器具、微生物培養用器具は再使用や廃棄の前にオートクレーブによって滅菌する。

### 3. 診断手順

#### (1) 組織検査試料を用いた RT-PCR 検査 (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法) によるウイルスの同定

① RNA の抽出：市販の RNA 抽出キットを使用する。抽出法などは、使用するキットのマニュアルに従う。(以下 TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup> 社) の使用例)

(a) 前述の 2-(3) で採材した組織試料のうち、腎臓または腎臓を含む内臓組織 (最大 5 尾分を 1 検体としてプール) の 10-50mg をハサミにて切り出し、マイクロチューブに入れた後に細切れにする。ホモジナイズペッスルを用いても良い。TRIzol<sup>®</sup> を 1 mL 加え、組織が分解するまで強く攪拌し、室温で 5 分間放置する。なお、内臓組織は確定診断の際の試料となるので、使い切らないで、-80℃に保存しておく。

(b) これにクロロホルム 200 μL を加え 15 秒間激しく攪拌し、室温で 5 分間放置後、4℃で 12,000g・10 分間遠心分離する。

(c) 透明上清 (水相) を別のチューブに移し、500 μL の 2-プロパノールを入れて軽く混合し、10 分間放置後、4℃で 12,000g・10 分間遠心分離する。

(d) 上清を吸い取って除去した後、75% エタノール 1,000 μL を入れて軽く攪拌する。4℃で 7,500g・5 分間遠心後、上清を除去して乾燥させる。

(e) 乾燥後、dDW (DNase・RNase free) 60 μL を加えてよく溶かす。

\* RNA は分解されやすいので、溶解後は速やかに水冷する。保存する場合は、-80℃で行う。

\*\* ウイルスに汚染した器具等は滅菌缶に入れオートクレーブ処理する。

② RT-PCR (市販の RT-PCR キットを使用):

Koutna ら (2003) により報告された RT-PCR を用いた組織からの SVCV の検出法。

(a) Invitrogen<sup>™</sup> 社の RT-PCR キット SuperScript<sup>™</sup> III One-Step RT-PCR with Platinum<sup>®</sup> Taq および以下に示す合成したプライマー exSVCV F および exSVCV R を使用する。

- ・組織診断用プライマーの配列 (Koutna et. al. 2003)

exSVCV F : 5'-GGA TAA TAT CGG CTT GGA AAG C-3'

exSVCV R : 5'-GCC TAA ATG TGT TGA TGG AAC G-3

増幅産物サイズ ; 470bp

- (b) 以下に示した組成で RT-PCR 反応液を調製し (1 検体あたり 45  $\mu$ L を PCR チューブに入れる)、上記①の RNA 抽出液 5  $\mu$ L (検体) を反応液に添加する。

- ・RT-PCR 反応液の調製

2 × Reaction Mix (キット)	25 $\mu$ L
dDW (滅菌超純水)	14 $\mu$ L
exSVCV F primer (10pmol/ $\mu$ L)	2 $\mu$ L
exSVCV R primer (10pmol/ $\mu$ L)	2 $\mu$ L
RT Platinum <sup>®</sup> Taq Mix (キット)	2 $\mu$ L
検体	5 $\mu$ L
合 計	50 $\mu$ L

- (c) 以下のプログラムで RT-PCR を行う。

逆転写	50°C	30min.
初期の変性	94°C	2min.
以下、変成～伸長を	34 サイクル	
変性	94°C	15sec.
アニーリング	50°C	30sec.
伸長	68°C	60sec.
最後の伸長	68°C	7min.
保持	4°C	$\infty$

- (d) RT-PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 2% のアガロースゲルで電気泳動を行う。

- (e) 臭化エチジウム存在下、トランスイルミネーターにより分子量 470bp のバンドの有無を観察する。RT-PCR 増幅産物が確認されたものを陽性と判定する。

## (2) 培養細胞による SVC ウイルスの分離

### ① 組織試料の調製

- (a) 検査試料は前述の 2-(3) で採材した組織試料 (最大 5 尾プール 1 検体分とする) を用いる。

- (b) これら試料は各検体をガラスホモジナイザーにいれ、10 倍量の 10x 抗生物質添加培地 \*1 を加え、組織が乳化するまで冷却しながら磨砕する。

- (c) ホモジネート液を 4°C で 2,000 g、15 分間遠心分離し、上清を回収したのち

20℃、2時間、または4℃で一晩放置して接種用試料とする。

\* 1: 2% 血清添加イーグル最小必須培地 (MEM) と、x100 抗生物質 - 抗真菌液 (Invitrogen™-Gibco® 抗生物質 - 抗真菌剤 (100x) など) を、10:1 の割合で混合する。

## ② 培養細胞への接種

使用する株化細胞：EPC (Epithelioma papulosum cyprini) 細胞

細胞培養液：牛胎児血清 (FCS) 10% を含むイーグルの最小必須培地 (MEM) に、x100 抗生物質 - 抗真菌液 (上記① \*1 参照) を 1/100 量添加する。

(a) 予め EPC 細胞を 24 ウェル細胞培養プレートに 20℃で培養しておく。

接種する細胞は、分散後 24 時間程度経過したものをを用いる。

(b) 接種用試料を 1 サンプルあたり 2 ウェルに終濃度が 1/200 及び 1/1000 となるように接種 (各ウェル 1 mL の培地に対して、50 µL と 10 µL を接種) し、20℃で培養する。

## ③ 培養および観察

(a) 40 ~ 100 倍の倍率で 7 日間毎日顕微鏡観察し、試料接種培養細胞における細胞の形態変化を観察する。観察には位相差倒立顕微鏡の使用を薦める。

(b) 接種した培養細胞に細胞変性効果 (CPE: Cytopathic effect) (写真 6) が現れたら、直ちにウイルスの同定手順に着手する。

(c) 7 日後においても CPE が発現しなければ、さらに新たな培養細胞に試料を継代して培養を行わなければならない。

## ④ 継代培養

(a) 新たに 24 ウェル細胞培養プレートの EPC 細胞を用意する。

(b) 継代するプレートの培養上清について、1 サンプルあたり使用した 2 ウェル (上記② (b) 参照) から 50 µL ずつピペットで採取し、計 100 µL を新たに用意したプレートの 1 ウェルに植え継ぐ。

(c) 前述したように 20℃で 7 日間培養する。

(d) CPE が生じなければ、試験結果は陰性と判定する。

## (3) 分離ウイルスを用いた RT-PCR 検査によるウイルスの同定

① RNA の抽出：市販の RNA 抽出キットを使用する。抽出法などは、使用するキットのマニュアルに従う。(以下 TRIzol LS® (Invitrogen™ 社) の使用例)

(a) 培養細胞の細胞変性効果 (CPE) が完全に出現した組織培養液を遠沈管に回収し、4℃で 3,000rpm・5 分間遠心分離する。

(b) 遠心上清 250 µL に TRIzol LS® を 750 µL 加えて十分に攪拌し、室温で 5 分間放置する。

これ以降の抽出ステップは前述の 3-(1) ①の (b) ~ (e) を参照。

② 分離ウイルスを用いた RT-PCR (市販の RT-PCR キットを使用)

i) RT-PCR 検査：

この RT-PCR は OIE マニュアル (2016) に準拠した方法である。しかしながら、この検査では、SVCV の他に近縁種の パイクフライ ラブドウイルス (Pike Fry

Rhabdovirus: PFRV) の遺伝子が増幅する可能性がある。特に、PFRV の宿主が SVCV と共通することがあるので注意を要する。

- (a) Invitrogen™ 社の RT-PCR キット SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum® *Taq* および以下に示す合成したプライマー F1 および R2 を使用する。

分離ウイルス診断用プライマーの配列 (OIE マニュアル 2009)

SVCV F1 : 5'-TCT TGG AGC CAA ATA GCT CAR\* R\*TC-3'

SVCV R2 : 5'-AGA TGG TAT GGA CCC CAA TAC ATH\* ACN\* CAY\*-3'

増幅産物サイズ ; 714bp

\* R: A または G、H: A または C または T、N: A または C または G または T、Y: C または T

- (b) 以下に示した組成で RT-PCR 反応液を調製し (1 検体あたり 45 µL を PCR チューブに入れる)、上記①の RNA 抽出液 5 µL を反応液に添加する。

RT-PCR 反応液の調製

2 × Reaction Mix (キット)	25 µL
dDW (滅菌超純水)	8 µL
SVCV F1 primer (10pmol/ µL)	5 µL
SVCV R2 primer (10pmol/ µL)	5 µL
RT Platinum® <i>Taq</i> Mix (キット)	2 µL
検体	5 µL
合 計	50 µL

- (c) 以下のプログラムで RT-PCR を行う。

逆転写	50°C	30min.
初期の変性	94°C	2min.
以下、変成～伸長を	35 サイクル	
変性	94°C	15sec.
アニーリング	55°C	30sec.
伸長	68°C	60sec.
最後の伸長	68°C	7min.
保持	4°C	∞

- (d) 2.0%のアガロースゲルによる電気泳動で 714bp のサイズの RT-PCR 増幅産物が確認されたものを陽性と判定する。

ii)2nd (Semi-Nested) PCR 検査 :

この方法は OIE マニュアル (2016) に示された方法で、2nd-PCR を行うことに

より、SVCV の検出感度を上げることができる。従って上記 "i)RT-PCR 検査" で陽性バンドが得られなかった時にのみ実施する。なお、この方法では PFRV との区別はできない。

(a) 2nd-PCR に使用するプライマーの配列は以下の通りである。

SVCV F1 : 5'-TCT TGG AGC CAA ATA GCT CAR\* R\*TC-3'

SVCV R4 : 5'-CTG GGG TTT CCN\* CCT CAA AGY\* TGY\*-3'

増幅産物サイズ ; 606bp

\* R: A または G、H: A または C または T、N: A または C または G または T、Y: C または T

(b) 2nd-PCR は市販の PCR キットを用いる。例として Takara EX *Taq*<sup>®</sup> HS を用いた場合は、以下に示した組成で PCR 反応液を調製し (1 検体あたり 47.5  $\mu$ L を PCR チューブに入れる)、“i) RT-PCR 検査”の増幅産物 2.5  $\mu$ L を反応液に添加する。

2nd-PCR 反応液の調製 (Takara EX *Taq* HS の場合)

10x EX <i>Taq</i> buffer	5.0 $\mu$ L
2.5mM dNTP mixture	4.0 $\mu$ L
dDW (滅菌超純水)	28.25 $\mu$ L
SVCV F1 primer (10pmol/ $\mu$ L)	5.0 $\mu$ L
SVCV R4 primer (10pmol/ $\mu$ L)	5.0 $\mu$ L
Takara EX <i>Taq</i> <sup>®</sup> HS	0.25 $\mu$ L
検体	2.5 $\mu$ L
合 計	50.0 $\mu$ L

(c) サーマルサイクラーが 94°C に達したところで一時停止し、チューブをセットして再スタートさせる。

(d) PCR のプログラムは以下の通りである。

初期の変性	94°C	30sec.
以下、変成~伸長を		35 サイクル
変性	94°C	30sec.
アニーリング	55°C	30sec.
伸長	72°C	60sec.
最後の伸長	72°C	7min.
保持	4°C	$\infty$

(e) RT-PCR と同様の電気泳動により 606bp の増幅産物が得られたものを陽性と判定する。

iii) Nested-PCR 検査：

上記 OIE マニュアルに示された "i) の RT-PCR 検査" および "ii) の 2nd-PCR 検査" の方法では、SVCV と類似のウイルスである PFRV を分けることができない。そこで増養殖研では SVCV を特異的に検出し、PFRV と分けることを目的として、この Nested-PCR 検査を開発した。(“4) その他” 参照)

(a) Nested-PCR に使用する SVCV 特異プライマーの配列は以下の通りである。

Nested-PCR 用プライマーの配列

SVCV nest F： 5'-TGA AGA Y\*TG TGT CAA TCA AGT C-3'

SVCV nest R： 5'-GCG AR\*T GCA GAG AAA AAG TG-3'

増幅産物サイズ；369bp

\* R: A または G、Y: C または T

(b) Nested-PCR は市販の PCR キットを用いる。例として Takara EX *Taq*<sup>®</sup> HS を用いた場合は、以下に示した組成で PCR 反応液を調製し (1 検体あたり 49.0 μL を PCR チューブに入れる)、1/50 に希釈した "i) RT-PCR 検査" または "ii) の 2nd-PCR 検査" の増幅産物 1.0 μL を反応液に添加する。

Nested-PCR 反応液の調製 (Takara EX *Taq*<sup>®</sup> HS の場合)

10x EX <i>Taq</i> buffer	5.0 μL
2.5mM dNTP mixture	4.0 μL
dDW (滅菌超純水)	34.75 μL
SVCV nest F primer (10pmol/ μL)	2.5 μL
SVCV nest R primer (10pmol/ μL)	2.5 μL
Takara EX <i>Taq</i> <sup>®</sup> HS	0.25 μL
検体	1.0 μL
合 計	50.0 μL

(c) サーマルサイクラーが 94℃ に達したところで一時停止し、チューブをセットして再スタートさせる。

(d) PCR のプログラムは以下の通りである。

初期の変性	94℃	30sec.
以下、変成～伸長を	30 サイクル	
変性	94℃	30sec.
アニーリング	55℃	30sec.
伸長	72℃	60sec.
最後の伸長	72℃	7min.

(e) RT-PCR と同様の電気泳動により 369bp の増幅産物が得られたものが SVCV 陽性と判定する。

#### (4) その他

OIE マニュアルでは “i) の RT-PCR 検査” または “ii) の 2nd-PCR 検査” で陽性となった場合、SVCV と PFRV を区別するために増幅産物の塩基配列をシーケンスすることが勧められている。この増幅産物はウイルスの糖タンパクをコードする遺伝子で、SVCV の系統解析にも利用される。

### 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

魚の組織を試料として、組織から RT-PCR 法に直接ウイルスを検出して陽性を示した場合は、-80℃に保存しておいた検査に使用しなかった魚類組織を冷凍下の条件の宅急便で増養殖研究所魚病診断・研修センター宛に送付する。

ウイルス分離によって、陽性を示した場合は分離されたウイルスまたは継代したウイルスを培地に懸濁した状態で、冷蔵下(4℃)の条件の宅急便で増養殖研究所魚病診断・研修センターに送付する。分離されたウイルスを保存する場合は-80℃で行い、送付も冷凍下の条件の宅急便で送付する。

送付する際は、事前に増養殖研究所魚病診断・研修センターへ連絡し、担当者との相談の上、受け取りを確実にすること。

### 5. 参考文献

Ahne W., H.V. Bjorklund, S. Essbauer, N. Fijan, G. Kurath, JR Winton (2002): Spring viremia of carp (SVC). *Dis. Aquat. Org.*, 52, 261-272.

Dikkeboom A., L. C. Radi, K. Toohey-Kurth, S. Marcquenski, M. Engel, A. E. Goodwin, K. Way, D. M. Stone, C. Longshaw (2004): First report of spring viremia of carp virus (SVCV) in wild common carp in North America. *J. Aquat. Anim. Health*, 16, 169-178.

Faisal M. and W. Ahne (1984): Spring viraemia of carp virus SVC: Comparison of immunoperoxidase, fluorescent antibody and cell culture isolation techniques for detection of antigen. *J. Fish Dis.*, 7, 57-64.

Kiryu I., T. Sakai, J. Kurita, T. Iida (2007): Virucidal Effect of Disinfectants on Spring Viremia of Carp Virus. *Fish Pathol.*, 42, 111-113.

Koutna M., T. Vesely, I. Psikal, J. Hulova (2003): Identification of spring viraemia of

carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR. *Dis. Aquat. Org.*, 55, 229-235.

O.I.E.(2016) Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals -2016. CHAPTER 2.3.9 ([http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=chapitre\\_svc.htm#chapitre\\_svc.biblio-33](http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=chapitre_svc.htm#chapitre_svc.biblio-33)).

Stone D.M., W. Ahne. K. L. Denham, P. F. Dixon, C. T.- Y. Liu, A. M. Sheppard, G. R. Taylor, and K.Way (2002): Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp viruses and pike fry rhabdovirus isolates reveals four distinct piscine vesiculovirus genogroups. *Dis. Aquat. Org.*, 53, 203-210.

Wolf. K. (1988): Fish viruses and viral diseases. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, 476pp.

注意：SVC に関する写真は、いずれもヨーロッパ魚病学会のご厚意により、「ヨーロッパ魚病学会誌；Vol 15, No 4. 増補版 “What should I do?”」より転載したものであり、著作権はヨーロッパ魚病学会にあります。



写真1 SVCに罹病したコイの外観症状。体色の暗化、眼球突出、腹水貯留による腹部の膨満がみられる。



写真2 SVCに罹病したコイの外観症状。腹部膨満、眼球突出、体表の点状出血が見られる。



写真3 SVCに罹病したコイ。浮腫、鰓の褪色、脾腫、内臓・鰓および脂肪組織の点状出血がみられる。



写真4 SVCに罹病したコイ。体側筋に点状出血が観察される。

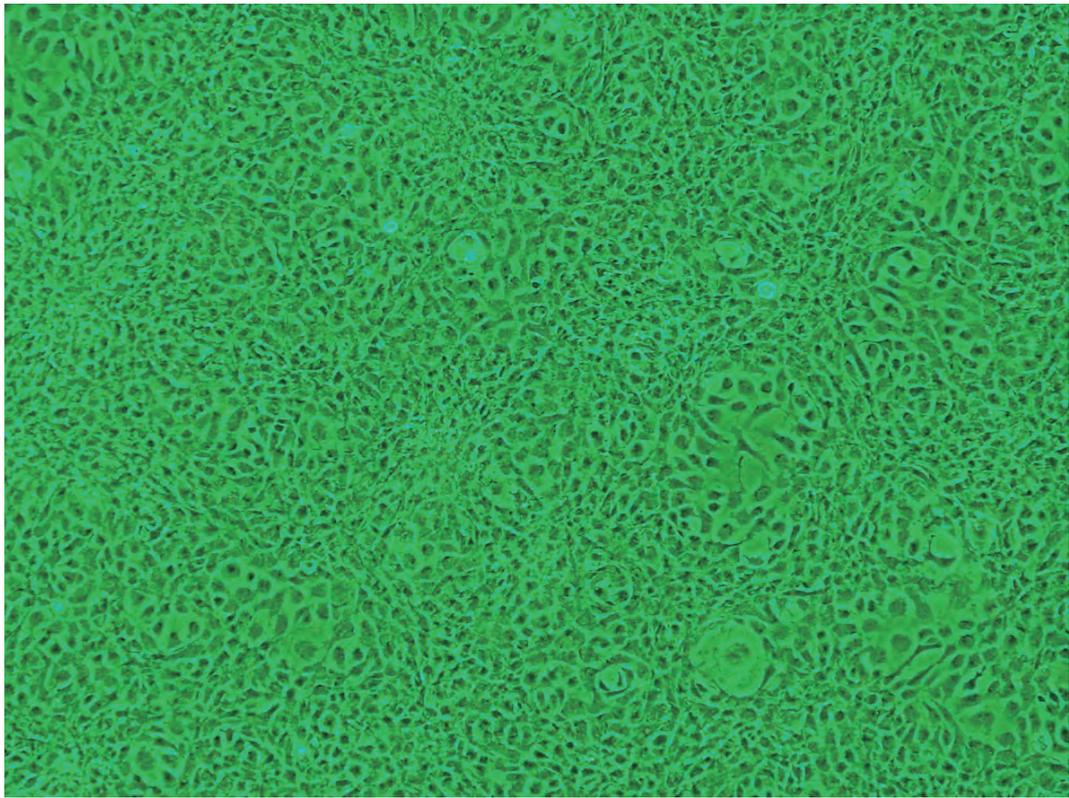


写真5 ウイルスの分離に使用される EPC 細胞（非感染）

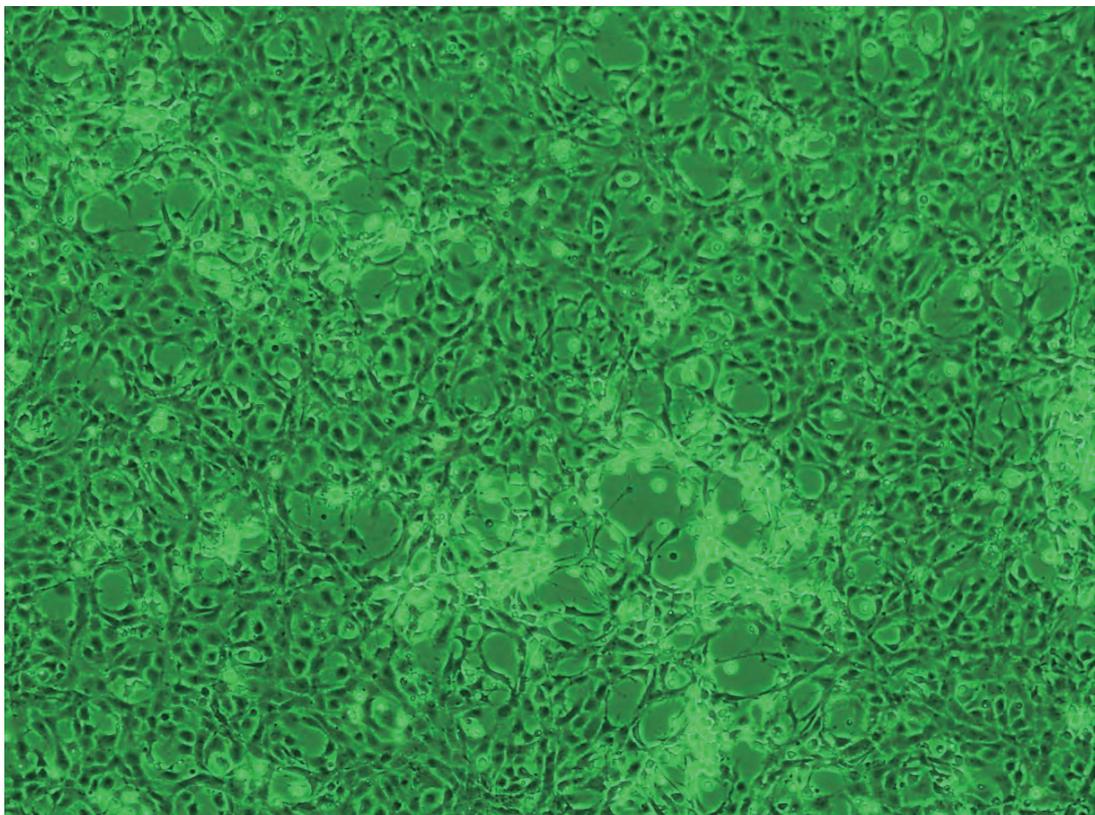


写真6 SVC ウイルス感染 EPC 細胞。EPC 細胞における SVC ウイルスの CPE は、細胞の球形化を伴う変性像が観察され、次第に培養容器から剥離する。

# コイヘルペスウイルス病 KHV

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：コイヘルペスウイルス病  
英名：Koi herpesvirus disease
- ② 病原体：Cyprinid herpesvirus 3 (=Koi herpesvirus (KHV))

アロヘルペスウイルス科シプリニウイルス属に属する(写真1)。本ウイルスは、コイのウイルス性乳頭腫症ウイルス Carp herpesvirus (CHV)(=Cyprinid herpesvirus 1) やキンギョ造血器壊死症ウイルス Goldfish hematopoietic necrosis virus (GFHNV)(=Cyprinid herpesvirus 2) とは、異なるウイルスである。

### (2) 発生地域

イスラエル、ヨーロッパ諸国、米国、東南アジア諸国等で報告されている。

### (3) 宿主域

- ① マゴイ (*Cyprinus carpio carpio*) およびニシキゴイ (*Cyprinus carpio koi*)
- ② これまでの感染実験では、キンギョおよびソウギョでは発病しないことが知られており、ウイルスキャリアーになる可能性についても、一般に低いものと考えられている。

### (4) 発生の特徴

- ① マゴイ、ニシキゴイで感受性に差はなく、幼魚から成魚まで発生する。一方、ふ化仔魚には感染しない。
- ② 20-25℃程度の水温で発生し、致死性が高く、累積死亡率が100%に達することもある。発生は水温の影響を受ける。13℃以下の水温では死亡が見られないが、感染したウイルスは魚体内で長期間生存し、水温の上昇とともに発病する。
- ③ 人為感染では16℃で感染した魚は長期間ウイルスを排出する。また、20-25℃の場合と比較して28℃での死亡率は低く、29℃では死亡は認められない。一方、28℃での死亡率は20-25℃の水温と比較して低下し、29℃以上では死亡は認められない。
- ④ 河川の上流の養魚場で発生した後、下流の養魚場でも大発生を起こした事例が知られ、本病の伝染性は強い。また、感染耐過魚からウイルスが排出される可能性が指摘される。

### (5) 症状

病魚は、行動が緩慢となり、しばしば平衡感覚の失調をきたし、摂餌不良となる。背鰭をたたむことが多くなり(写真2)、鰭条の間の組織が崩壊して鰭が破れて見えることもある。外観的には本病の特徴は鰭の変化であり、鰭の褪色、びらん、イクチオボドやトリコジナなどの原虫や滑走細菌などの細菌の二次感染がしばしば見られる(写真3)。ただし、これら鰭の顕著な肉眼的変性は2次感染等によるもので、KHVにより直接引き起こされたものではない。その他に

は、鰭基部や体表のうっ血および出血（写真 4）、体表の部分的褪色や黒化、粘液の異常分泌あるいは眼球の落ち込み（写真 5）などが観察される。実験感染魚では体表粘膜上皮の剥離が顕著に見られる（写真 6）。特徴的な剖検所見は乏しく、内臓の癒着が見られる程度である。

## (6) 組織病理学的所見

ウイルス感染細胞の核は仁が消失し内部がしばしば無構造化、場合によっては肥大する（写真 7）。電顕観察ではこのような核の内部にはウイルスのキャプシドが多数認められる。*In situ* hybridization ではこのような核の内部にウイルス遺伝子が検出される。染色質は核の縁辺部に濃縮する。時間が経つと核内部に弱好酸性の封入体が観察される場合もある。感染細胞は最初に表皮に現れ、次に鰓、さらに腎、脾、消化管等の内部臓器に出現し、最後に中枢神経に現れる。最も病変が顕著なのは表皮であり、しばしば広範囲に剥離し、出血を起こす。鰓では上皮細胞の増生が起こり、顕著な場合には二次鰓弁が癒合して鰓弁が棍棒状化する。ただし、鰓にこのような著変が観察されない場合もある。また、鰓では細菌や原虫の二次感染による腐敗やびらんが生ずることもある。内部臓器では一部で炎症が見られるが、組織の壊死や崩壊が広範囲に見られることはない。

## (7) 消毒

オートクレーブによる滅菌、アルコールや塩素消毒など一般的なウイルスの消毒法に準ずる。

## (8) 防除法

一般的なウイルスの防除法に準ずる。

## 2. 試料採取法

### (1) 被検魚の収集

- ① 被検魚の収集から採材まではできるだけ速やかに行うことが望ましく、できれば発生現場で臓器試料を摘出する。摘出した臓器試料は、個体ごとに無菌の密閉可能な容器に収容し、検査機関へ直ちに氷冷または冷蔵状態で運搬する。ウイルスが不活化するため、臓器試料の凍結は好ましくないが、やむを得ず送付まで保存する場合は、試料を  $-80^{\circ}\text{C}$  に凍結保存後、凍結した状態で輸送する。
- ② 被検魚を検査機関まで輸送する場合は、検査対象魚を発生現場で即殺後、個体ごとに無菌の密閉可能な容器に収容し、氷冷または冷蔵状態で 48 時間以内に輸送する。運搬の際、被検魚が凍結することのないように注意する。
- ③ 被検魚として死魚しか入手できない場合は、なるべく新鮮な個体を採取し、個体ごとにビニール袋などで密閉包装して氷冷または冷蔵状態で搬送する。この場合も、運搬の際、被検魚が凍結することのないように注意する。
- ④ 臓器試料または被検魚には、採取場所、日時、個体あるいは試料番号、魚体長および体重などの情報を明記したラベルを添付する。

### (2) 外観症状および剖検所見の記載

- ① 外観症状を記載する。特に鰓の所見に注意する。鰓に寄生する原虫、細菌などを顕

微鏡により観察し、記録する。

② 解剖後、剖検所見を記載の上、検査に必要な部位を採材する。

### (3) ウイルス検査のための臓器試料の採材

① 臓器採材が困難な稚仔魚 できる限り筋肉部位を取り除き、魚全体を試料とする。

② 臓器採材が可能な魚 鰓、腎臓および脾臓を試料とする。

## 3. 診断手順

### (1) PCR 法 1

#### ① 準備

(a) 採取した病魚試料

(b) PCR 法使用機器および試薬 (サーマルサイクラー、マイクロピペット、エッペンドルフチューブ、酵素・試薬類、電気泳動装置および試薬類など)

(c) プライマー

KHV Sph I-5F : 5'-GACACCACATCTGCAAGGAG-3'

KHV Sph I-5R : 5'-GACACATGTTACAATGGTGGC-3'

増幅産物サイズ : 292bp

#### ② 手技

(a) 適量の病魚試料 (QiaAmp DNA mini kit, Qiagen を使用する場合には 15 ~ 20mg 湿重量) を採取し、市販の DNA 抽出キットにより核酸抽出する。抽出法などは、使用するキットのマニュアルに従う。

(b) PCR 反応液は市販の PCR キットを用いて作製する。MgCl<sub>2</sub> および dNTP の分量はキットのマニュアルに従い、プライマーは終濃度でそれぞれ 0.5μM とする。Takara Ex Taq Hot Start Version (Takara) を用いた際の反応液 1 検体分の組成と容量を下記に示す。

(試薬)	(容量)	(終濃度)
10x buffer	2 μL	1x
dNTP	1.6 μL	
上流プライマー (50μM)	0.2 μL	0.5 μM
下流プライマー (50μM)	0.2 μL	0.5 μM
Takara Ex Taq	0.1 μL	
テンプレート (検体)	1 μL	
精製水	14.9 μL	
合計	20 μL	

(c) 抽出した核酸、陽性対照 DNA および陰性対照 (精製水) をテンプレートとして下記のプロトコルで PCR 反応を行う。

初期変性 94°C 30sec.

以下、変性、アニーリング、伸長を 40 サイクル。

変性 94°C 30sec.

アニーリング	63℃	30sec.
伸長	72℃	30sec.
最後の伸長	72℃	7min.

- (d) PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカールとともに 2% 程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。
- (e) 臭化エチジウムまたはその他の核酸染色試薬の存在下、トランスイルミネーターにより 292bp のバンドの有無を観察する。
- ③ 判定目的のバンドが検出された個体を陽性、検出されなかった個体を陰性と判定する。

## (2) PCR 法 2

### ① 準備

- (a) 採取した病魚試料
- (b) PCR 法使用機器および試薬 (サーマルサイクラー、マイクロピペット、エッペンドルフチューブ、酵素・試薬類、電気泳動装置および試薬類など)
- (c) プライマー
- KHV TK F :5' -GGG TTA CCT GTA CGA G-3'
- KHV TK R :5' -CAC CCA GTA GAT TAT GC-3'
- 増幅産物サイズ :409bp

### ② 手技

- (a) 適量の病魚試料 (QiaAmp DNA mini kit, Qiagen を使用する場合には 15 ~ 20mg 湿重量) を採取し、市販の DNA 抽出キットにより核酸抽出する。抽出法などは、使用するキットのマニュアルに従う。
- (b) PCR 反応液は市販の PCR キットを用いて作製する。MgCl<sub>2</sub> および dNTP の分量はキットのマニュアルに従い、プライマーは終濃度で 0.1μM とする。Takara Ex Taq Hot Start Version (Takara) を用いた際の反応液 1 検体分の組成と容量を下記に示す。

(試薬)	(容量 1)	(容量 2)	(終濃度)
10x buffer	2.0 μL	5.0 μL	1x
dNTP	1.6 μL	4.0 μL	
上流プライマー (10μM)	0.2 μL	0.5 μL	0.5 μM
下流プライマー (10μM)	0.2 μL	0.5 μL	0.5 μM
Takara Ex Taq	0.1 μL	0.25 μL	
テンプレート (検体)	1.0 μL	2.5 μL	
精製水	14.9 μL	37.25 μL	
合計	20.0 μL	50.0 μL	

最終液量 20 μL の系で 2.5 μL のテンプレートを加える場合には、精製水を 13.4 μL とする。

(c) 抽出した核酸、陽性対照 DNA および陰性対照（精製水）をテンプレートとして下記のプロトコルで PCR 反応を行う。

初期変性	94℃	5min.
以下、変性～伸長を	40 サイクル。	
変性	95℃	1min.
アニーリング	55℃	1min.
伸長	72℃	1min.
最後の伸長	72℃	10min.

(d) PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカールとともに 2% 程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。

(e) 臭化エチジウムまたはその他の核酸染色試薬の存在下、トランスイルミネーターにより 409bp のバンドの有無を観察する。

③ 判定目的のバンドが検出された個体を陽性、検出されなかった個体を陰性と判定する。

### (3) LAMP 法方法

#### ① 準備

(a) 採取した病魚試料

(b) LAMP 法使用機器および試薬 ホモジナイザーペッスル 検体処理用およびマスターミックス調製用滅菌チューブ (0.5 mL 又は 1.5 mL) ピペット (0.5-10  $\mu$ L、10-100  $\mu$ L、100-1,000  $\mu$ L) フィルター付きチップ 反応チューブ冷却用アルミ製ラック 氷 (クラッシュアイス) およびアイスボックス 微量簡易遠心機 8 連マイクロチューブ用簡易遠心機 ボルテックスミキサー Loopamp 反応チューブ 簡易抽出処理用 TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) 市販の DNA 分離試薬 (DNeasy Tissue Kit ; Qiagen 社製など) Loopamp プライマーセット KHV Loopamp DNA 増幅試薬キット中の 2  $\times$  Reaction Mix. (RM)、Bst DNA Polymerase (Bst DNA Polymerase)、Distilled Water (DW) リアルタイム濁度検出の場合 Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (LA-320C、RT-160C) 蛍光目視検出の場合 紫外線照射装置 (波長 240~260nm、350~370nm) 広幅の眼鏡又は防護面 Loopamp 蛍光・目視検出試薬 Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (LA-320C、RT-160C)、又はインキュベーター (温度精度が  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  以内 : ホットボンネット付)

※ インキュベーター使用の場合は、別途、反応停止用ヒートブロックが必要。

(c) プライマー

KHV-FIP : 5'-CCCAAACCCAAGAAGCAGAAACCCGTTGCCTGTAGCATAG  
AAGA-3'

KHV-BIP : 5'-CACTCCTCCGATGGAGTGAAACTGCCCATGTGCAACTT  
TG-3'

KHV-F3 : 5'-CTGTATGCCCGAGAGTGC-3'

KHV-B3 : 5'-AACTCCATCGCCGTCATG-3'  
 KHV-LF : 5'-CCCGCCGCCGCA-3'  
 KHV-LB : 5'-TGGAAGTGTCTGATGAGCGT-3'

② 手技

(a) 検体の調製 市販の DNA 分離試薬 (DNeasy Tissue Kit ; Qiagen 社製など) を用いる場合 抽出方法などは、使用するキットのマニュアルに従う。DNA 抽出サンプルは、95℃で 5 分間加熱処理し、氷上で保存する。LAMP 法簡易抽出試薬を用いる場合 検体前処理用滅菌チューブに採取した魚病試料 5-10mg を入れ、TE buffer 100 μL を加えてホモジナイザーペッスルを用いて組織を均一化する。Ex F 100 μL を加えキャップを閉めてボルテックスミキサーで混和する(1 秒間×3 回)。微量簡易遠心機で数秒間遠心 (以下、スピンドウン) し、95℃で 5 分間加熱処理する。1M Tris-HCl : pH 7.0 10 μL を加えてボルテックスミキサーで混和する。混和後、室温で 2,000 × g 以上で 30 秒間遠心し、氷上に移し、上清をサンプル溶液とする。

※ 簡易抽出法を用いた場合は、市販の DNA 分離試薬を用いた場合に比べて感度が 1 オーダー程度低下する可能性がある。

(b) マスターミックスの調製 -20℃で保存していた各試薬を室温で解凍し、解凍後は直ちに氷上で保存する。別途用意したマスターミックス調製用滅菌チューブに Loopamp DNA 増幅試薬キットの 2 × Reaction Mix. (RM)、Bst DNA Polymerase、Distilled Water (DW) と、Loopamp プライマーセット KHV の Primer Mix. KHV (PM KHV) を下表の割合で分注する。ピペッティング又はキャップを閉めた上で軽く数回叩くこと (以下、タッピング) により良く混合した後、スピンドウンする。

※ 調製したマスターミックスはすぐに使用すること。

試薬用量 (例)

	1 test 分	10 tests 分
2 × Reaction Mix.(RM)	12.5 μL	125 μL
Primer Mix. KHV(PM KHV)	2.5 μL	25 μL
Bst DNA Polymerase	1.0 μL	10 μL
Distilled Water(DW)	4.0 μL	40 μL
合 計	20.0 μL	200 μL

<蛍光目視検出の場合>

上記マスターミックスの Distilled Water (DW) 4 μL のうち、1.0 μL を Loopamp 蛍光・目視検出試薬とし、Distilled Water (DW) を 3.0 μL 加えて合計 20.0 μL とする。

(c) サンプルの混合 氷上に置いた Loopamp 反応チューブにマスターミックス 20 μL を分注する。サンプルの DNA、並びに陰性コントロールとして Distilled Water (DW) を、陽性コントロールとして Positive Control KHV(PC KHV) を 5 μL 添加し、

全量 25  $\mu$ L とする。ピペッティング又はキャップを閉めた上でのタッピングにより良く混合した後、8 連マイクロチューブ用簡易遠心機でスピンドウンする。

※ 混合の際には気泡が立たないように注意する。

※ 反応チューブにサンプル溶液が添加されていることを目視で確認すること。

(d) 増幅反応および検出 Loopamp リアルタイム濁度測定装置、又はインキュベーター（温度精度が $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 以内：ホットボンネット付）を $65^{\circ}\text{C}$ に設定し、表示温度が設定温度に達していることを確認する。分注済みの反応チューブをセットし、 $65^{\circ}\text{C}$ で60分間インキュベートする。増幅反応後にヒートブロックを用いて酵素失活操作（ $80^{\circ}\text{C}$ 、5分間又は $95^{\circ}\text{C}$ 、2分間）を行って反応を停止させる。

※ リアルタイム濁度測定装置の場合、酵素失活は自動処理される。インキュベーターを用いる場合は、別途必ず酵素失活操作を行うこと。Loopamp リアルタイム濁度装置による検出装置の表示画面上で陽性コントロールと陰性コントロールの濁度の上昇の有無を確認する。陽性コントロール(Positive Control KHV(PC KHV))で濁度が上昇し、陰性コントロール(Distilled Water ; DW)で濁度が上昇していなければ、増幅反応は正常に進行している(図-1)。それ以外の場合には、増幅反応が適切に進行していない可能性があるため、試薬調製からの再検査を実施する必要がある。次に、各検体の判定を行う。増幅反応時間内(60分間)に濁度の上昇が認められた場合を「陽性」、濁度の上昇がみられない場合を「陰性」とする。

※ 検体によって濁度上昇開始時間や濁度上昇値が陽性コントロール(Positive Control KHV(PC KHV))と異なる場合がある。蛍光目視による検出判定は、紫外線照射装置(波長240-260nm、350-370nm)を用いて反応チューブ底面より紫外線を照射して反応チューブの側面より観察し、陽性コントロール(Positive Control KHV(PC KHV))と同様に緑色の蛍光を発すれば陽性、陰性コントロール(Distilled Water ; DW)と同様に蛍光を発しなければ陰性と判定する。観察は、目を眼鏡等で保護した状態で行う。記録する場合は、電気泳動撮影用カメラ等を用いる。

※ 検体によって、陽性コントロールよりも強く蛍光を発することがあるが、蛍光の強さと検体のコピー数の間に相関はない。

※ 地下水など重金属イオンを多量に含む飼育水で飼育された病魚試料を用いた場合、蛍光反応が阻害される可能性がある。

※ 紫外線照射装置を用いた判定が明確でない場合は、市販のブラックライトを反応チューブ底面にあてて、チューブ側面より観察する(写真8-A)、蛍光灯下で肉眼観察する(写真8-B)、電気泳動撮影用カメラで撮影し観察する(写真8-D)などの方法を適宜用いる。

#### 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

- ① 1次診断陽性検体の中で、できるだけ新鮮な3検体について、冷凍またはエタノール固定して送付する。
- ② 増養殖研究所魚病診断・研修センターのホームページに掲載されている魚病診断依

頼書および水産防疫対策要綱（平成 28 年 7 月 1 日）の別記様式 6「病性鑑定材料送付時の添付調書」に必要事項を記入し、サンプルとともに送付する。

## 5. 参考文献

- Bercovier H., Y.Fishman, R.Nahary, S.Sinai, A.Zlotkin, M. Eyngor, O. Gilad, A. Eldar and R. P. Hedrick (2005): Cloning of the Koi Herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiology* 5:13, 1-9.
- Gilad,O., S. Yun, M. A. Adkinson, K. Way, N. H. Willits, H. Bercovier and R. P. Hedrick(2003): Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J. Gen Virol.*, 84, 2661-2668.
- Gray, W. L., Mullis, S.E. LaPatra, J. M. Groff and A. Goodwin (2002): Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish.*J.Fish Dis.*, 25,171-178.
- Hedrick, R. P., O. Gilad, S. Yun, J. V. Spangenberg, G. D. Marty, R. W. Nordhausen, M. J. Kebus, H. Bercovier and A. Eldar (2000): A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J. Aquat. Animal Health.* 12, 44-57.
- Ito, T., M. Sano, J. Kurita, K. Yuasa and T. Iida (2007):Carp larvae are not susceptible to koi herpesvirus. *Fish Pathol.*, 42, 107-109.
- Miwa S., I. Kiryu, K. Yuasa, T. Ito and T. Kaneko (2015): Pathogenesis of acute and chronic diseases caused by cyprinid herpesvirus-3. *J. Fish Dis.*, 38, 695-712.
- Mori, Y., K. Nagamine, N. Tomita and T. Notomi (2001) : Detection of Loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289, 150-154.
- OIE (the World Organisation for Animal Health) (2016): Manual of diagnostic tests for aquatic animals (2016). <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/>.
- Yuasa, K., M. Sano, J. Kurita, T. Ito and T. Iida (2005): Improvement of a PCR Method with the Sph I -5 Primer Set for the Detection of Koi Herpesvirus (KHV). *Fish Pathol.*, 40, 37-40.

---

Yuasa, K., T. Ito and M. Sano (2008): Effect of water temperature on mortality and virus shedding in carp experimentally infected with koi herpesvirus. *Fish Pathol.*, 83-85.

Yuasa, K., M. Sano and N. Oseko (2013): Goldfish is not a susceptible host of koi herpesvirus (KHV) disease. *Fish Pathol.*, 48, 52-55.

吉野 学, 渡 一, 小島 禎, 池戸正成 (2006) : LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法によるコイヘルペスウイルスの高感度迅速検出, 魚病研究, 第 41 巻 第 1 号, 19-27.

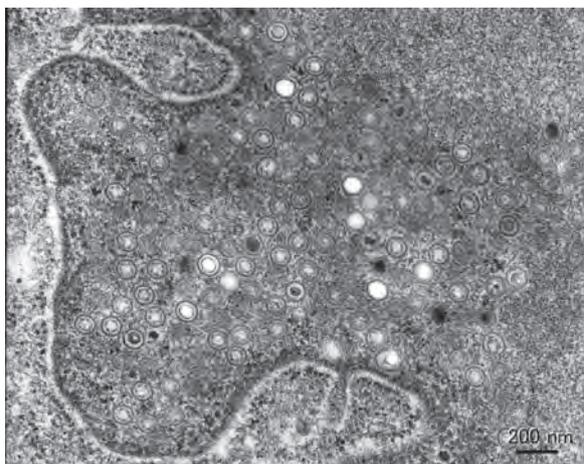


写真 1. KF - 1 細胞で増殖する KHV の電子顕微鏡像。核内にヌクレオキャプシド(矢印)が観察される。(三輪理博士 提供)



写真 2. 人為感染 7 日後のマゴイ。背びれをたたみ遊泳する (湯浅啓博士 提供)。

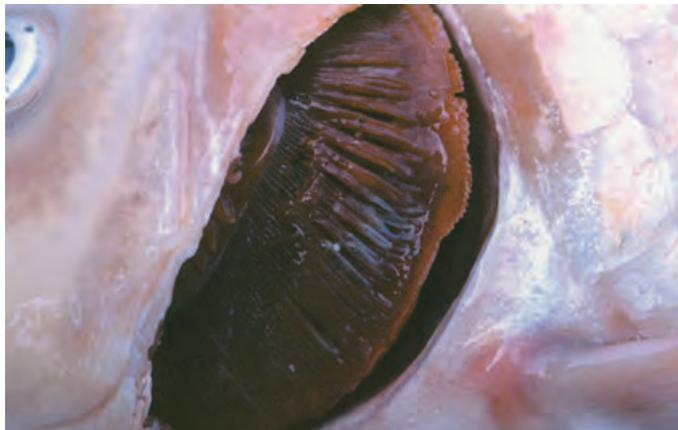


写真 3. 感染死亡したマゴイの鰓。 *Flavobacterium columnare* の混合感染が見られる。鰓上皮細胞の壊死が顕著で「鰓ぐされ」状態を呈する。(田中深貴男氏 提供)



写真 4. 感染死亡したニシキゴイ。(R. P. Hedrick 博士・A. Eldar 博士提供: American Fisheries Society, 2000)



写真5. 感染死亡したマゴイ。眼の落ち込みが見られる。

(湯浅啓博士提供)



写真6. 人為感染7日後のマゴイ。体表粘膜上皮が剥離してできた白色固形物が体表に付着している。

(湯浅啓博士提供)

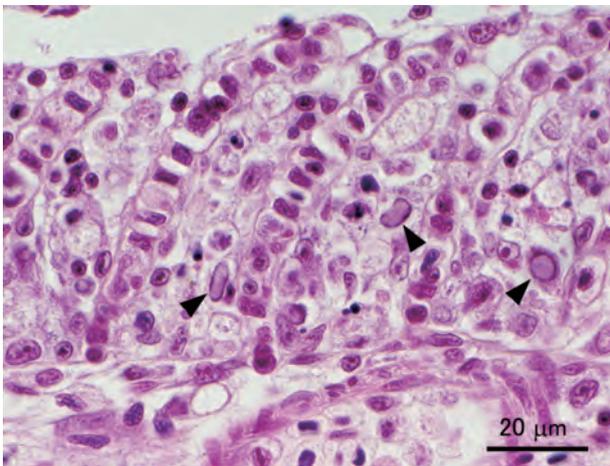


写真7. 感染魚の鰓の病理組織像。鰓上皮細胞の著しい増生、ウイルスが感染した細胞核の仁の消失とクロマチンの核縁辺部への濃縮(矢頭)が観察される。(三輪理博士提供)

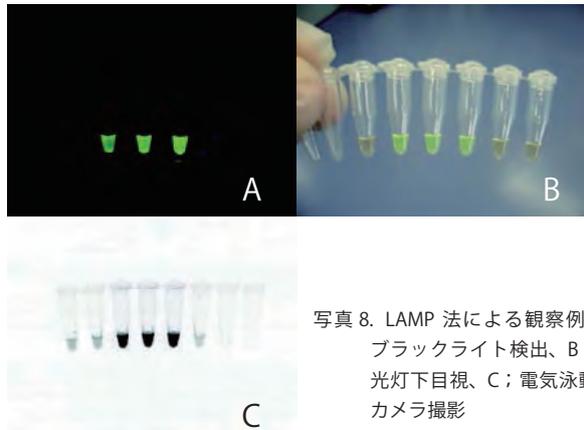


写真8. LAMP法による観察例 A; ブラックライト検出、B; 蛍光灯下目視、C; 電気泳動用カメラ撮影

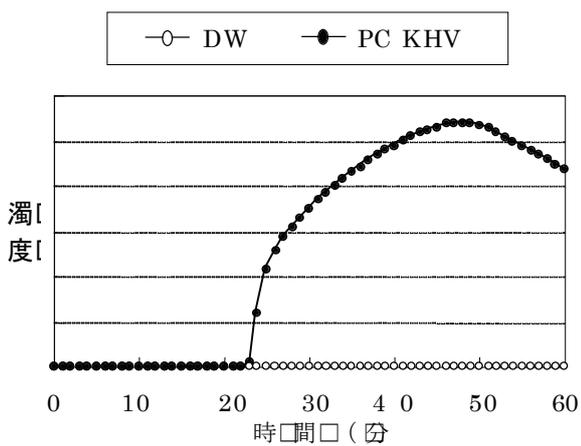


図1. Positive Control KHV (PC KHV) の増幅曲線パターン (使用装置: Loopamp リアルタイム濁度測定装置)



# マダイグルゲア症 Glugeosis of red sea bream

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：マダイグルゲア症  
英名：Glugeosis of red sea bream
- ② 病原体：*Glugea pagri*（微孢子虫門、微孢子虫綱、微孢子虫目、パンスポロブラスト亜目、グルゲア科、グルゲア属）

### (2) 地理的分布

- ① 初発国：中国（広東省）
- ② 分布域：中国（広東省）

### (3) 宿主域

- ① 自然発病：中国の広東省で海面養殖されたマダイ幼魚。
- ② 実験感染：情報無し
- ③ キャリア：情報無し
- ④ ベクター：情報無し
- ⑤ その他：情報無し

### (4) 発生の特徴

2011年5月から6月、広東省で養殖されたマダイ幼魚（平均体長4.2 cm）の54%（50尾中27尾が陽性）に発生したが、それ以降は報告がない。

### (5) 外観症状

- ① 緩慢遊泳。
- ② 食欲不振。
- ③ 重篤の場合は、腹部膨満。

### (6) 剖検所見

内臓諸器官の表面に多数の白色粒状キセノマがみられ、腹腔内に充満している。

### (7) 消毒

とくに知られていない。

(8) 防除法

病原体の持ち込みを防ぐ。

2 検体採取

(1) 検体の収集

外観的に 1 (5) の症状を呈する検体を収集する。

(2) 検査のための試料の採材

胞子の確認のため、検体を冷蔵または冷凍保存する。PCR 検査用には、90% エタノールで固定して保存してもよい。病理組織検査に用いるため、患部がみられる内臓器官を Davidson 液で固定して保存しておく。

3. 診断手順

(ア) 胞子の観察

収集した罹患魚を解剖し、腹腔内にみられるキセノマをスライドガラス上でつぶして、胞子の形態およびサイズをウェットマウントで測定する。寄生体は担孢子胞 (sporophorous vesicle) 内で多数の胞子を形成する。胞子は大小二型あり、大胞子は楕円形または卵型で、長さ 7.2 ~ 9.0  $\mu\text{m}$  (平均 7.9  $\mu\text{m}$ )、幅 2.3 ~ 3.8  $\mu\text{m}$  (平均 2.9  $\mu\text{m}$ )、小胞子は卵形で、長さ 3.9 ~ 5.1  $\mu\text{m}$  (平均 4.4  $\mu\text{m}$ )、幅 2.1 ~ 3.0  $\mu\text{m}$  (平均 2.5  $\mu\text{m}$ ) である。

(イ) SSU rDNA の塩基配列

DNA を抽出し、SSU rDNA をシーケンスして塩基配列を決定する。GenBank の登録データ (JX852026) との類縁度を調べて、一致度より同定する。

4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

生鮮個体を送る場合：冷蔵 (4℃) または冷凍 (-20℃ ~ -80℃) で輸送する。

固定標本を送る場合：冷蔵 (4℃) で輸送する。

精製胞子標本を送る場合：冷蔵 (4℃) で輸送する。

5. 参考文献

Su, Y., J. Feng, X. Sun, J. Jiang, Z. Guo, L. Ye and L. Xu (2014): A new species of *Glugea* Thelohan, 1891 in the red sea bream *Pagrus major* (Temminck & Schlegel) (Teleostei: Sparidae) from China. *Syst. Parasitol.*, 89, 175-183.

## 2. 甲殻類

イエローヘッド病 (YHD)

壊死性肝膵炎 (NHP)

タウラ症候群 (TS)

伝染性皮下造血器壊死症 (IHHN)

急性肝膵臓壊死病 (AHPND)

伝染性筋壊死症 (IMN)

バキュロウイルス・ペナエイ感染症

エビの潜伏死病 (CMD)

鰓随伴ウイルス病 (GAV)

モノドン型バキュロウイルス感染症



# イエローヘッド病 Yellow head disease (YHD)

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

① 病名：イエローヘッド病

英名：Yellow head disease (YHD)

② 病原体：Yellow head virus (YHV genotype 1) (ロニウイルス科 オカウイルス属)。YHVはロニウイルス科 オカウイルス属に分類される。イエローヘッド複合ウイルス群には、8つの遺伝子型が知られ、YHVは遺伝子型1であり、イエローヘッド病の病原体である。遺伝子型2である Gill-associated virus (GAV) およびその他4つの遺伝子型(3~6)は、東アジア、アジアおよびオーストラリアの健康なウシエビで一般的に検出されるが、イエローヘッド病とほとんど関連がない。遺伝子型7の病原性は不明である。遺伝子型8は病エビから検出されている。YHVとGAVは類似ウイルスであるが、RT-PCRにより区別できる。また、病理所見がタウラ症候群 (Taura syndrome (TS)) と類似しているが、RT-PCRによって区別できる。

### (2) 地理的分布

① 初発国：タイ

② 分布域：中国、インド、インドネシア、マレーシア、フィリピン、スリランカ、台湾、ベトナム

### (3) 宿主域

① 自然発病：主にウシエビ (ブラックタイガー; *Penaeus monodon*) で、その他、クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*)、テンジクエビ (バナナエビ; *Fenneropenaeus merguensis*)、ノーザンホワイトシュリンプ (*Litopenaeus setiferus*)、ヨシエビ (*M. ensis*) 等で報告されている。

② 実験感染：バナメイエビ (ホワイトレッグシュリンプ、シロアシエビ; *Litopenaeus vannamei*)、ブルーシュリンプ (*L. stylirostris*)、アステカエビ (ノーザンブラウンシュリンプ; *Farfantepenaeus aztecus*) など広義のクルマエビ類の多くが感受性を示す。実験的に感染可能な宿主範囲は広いが、自然での発症はウシエビ (ブラックタイガー; *P. monodon*) であるので、この種の移動には特に注意が必要である。

③ キャリア：文献情報は無いが、天然エビはキャリアとなり得ると考えられる。

④ ベクター：情報なし

⑤ その他：文献情報は無いが、感染経路は、水平感染 (共食い) や垂直感染すると考えられる。また、ストレス (pH、溶存酸素などの環境要因の急激な変化など) で重篤化する<sup>1)</sup>。

#### (4) 発生の特徴

- ① 1990年にタイで養殖していたブラックタイガーに発生した。
- ② 養殖池隅の水面近くを緩慢に遊泳する。
- ③ 数日間過剰な摂餌行動を示した後、摂餌不良となる。
- ④ 感染を経験した養殖場を除き、天然および養殖場における *P. monodon* における検出率は1%以下である。
- ⑤ 過密養殖池で発症しやすく、発症すると3日程度で斃死個体がみられ、他個体への伝播は非常に速い。
- ⑥ 死亡率は3～5日で100%に達することもある<sup>2)</sup>。
- ⑦ ウシエビ(ブラックタイガー)(*P. monodon*)では、ポストラバ(PL)15以降のものが感染しやすい<sup>3)</sup>。

#### (5) 外観症状

- ① 全身の退色が認められる。
- ② 肝臓の黄色化により頭胸部が薄黄色化を示す個体も認められる(写真1)。
- ③ 重症のエビは体部が黄色味を帯びた白色を呈し、しばしば頭胸部が膨れる(写真1)。

#### (6) 剖検所見

鰓は白色あるいは薄黄色を呈し、時として肝臓も薄黄色化が認められる(写真2)。

#### (7) 消毒

- ① 60℃ 15分の加熱処理で不活化される<sup>4)</sup>。
- ② 30ppt(0.03mg/mL)の塩素処理で不活化される。(YHVは海水中で最長72時間は感染力を維持できる<sup>4)</sup>。

#### (8) 防除法

有効な予防、治療法は知られていない。

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

- ① RT-PCRのための検体：少なくとも10尾の瀕死エビまたは死亡直後の個体、ないしは1.(5)に示すような本疾病に特徴的な外観症状を示すものを選ぶ。
- ② 病理組織検査のための検体：活着している5-10尾の病エビないし、1.(5)に示すような本疾病に特徴的な外観症状を示すものを選ぶ。
- ③ 被検個体の採取場所、採取日時、海水温、年齢、死亡状況、他からの種苗の移入の有無など、疫学的情報を記録する。

### (2) 検査のための試料の採材

- ① RT-PCRのための採材：新鮮なリンパ様器官あるいは鰓。あるいは小さな個体であ

ればエビ全体を材料とする。

- ② 病理組織検査のための採材：大型のエビの場合は、中腸腺前方、中腸線内部（いわゆる胃の内腔）、前方の腹節、後方の腹節それぞれに Davidson の固定液を注射する。エビ体重の 5-10% 程度の固定液を注射する。注射後ただちに尾部から解剖バサミで甲殻に切れ目を入れる。切れ目は腹節では真横に、頭胸甲では斜め上に、内部臓器を傷つけないように注意しながら眼の付け根付近まで入れる。これは固定液を浸透しやすくするためである。12g より大型のエビでは、さらに頭胸甲と腹節の境目および腹部中央に背側から体軸と垂直に体の半分程度まで切れ目を入れる。その後速やかに固定液に投入し、1 日程度固定する。注射が不可能な小型のエビの場合は体全体を直接固定液に投入して固定する 5)。固定液はサンプリング直前まで冷蔵庫か氷中で冷やしておき、サンプルを投入したら 30 分程度はゆっくり攪拌する。その後一晩置いた後、70% エタノールで 1 時間程度洗い、さらに新しい 70% エタノールに置換して保存する。

・ Davidson の固定液の組成

95% エチルアルコール	33 mL
市販のホルマリン原液	22 mL
100% 酢酸（氷酢酸）	11.5 mL
蒸留水	33.5 mL
合計	100 mL

なお、上記は全量を 100 に合わせるためのもので、簡便に 95% エタノール：ホルマリン原液：氷酢酸：蒸留水を体積比 3:2:1:3 の割合で混合してもよい。作製した本固定液は 4℃ で保存すれば 2 ヶ月程度は使用可能である。

### 3. 診断手順

#### (1) RT-PCR (1st PCR)

- ① キットや試薬のマニュアルに従って、新鮮なエビのリンパ様器官あるいは鰓から RNA を抽出する。スピンカラムを用いたキットで十分 RNA が抽出できない場合（特に死亡個体から抽出する場合など）、フェノール・クロロホルム法 (TRIZol (Inbitrogen)、RNAiso Pllus (Takara) 等) によって十分量の RNA が抽出できる場合がある。その際、リンパ様器官あるいは鰓は約 10-20 mg を採取する。
- ② 陰性対照として、可能であれば YHV 陰性の組織を使用する。困難な場合には蒸留水やバッファを用いる。陽性対照としては可能であれば YHV 陽性の組織を用いる。困難な場合には、YHV の DNA テンプレートを陽性対照とする。
- ③ プライマーおよび反応条件

・ プライマー (YHV および GAV 共通)

GY1 : 5'-GAC-ATC-ACT-CCA-GAC-AAC-ATC-TG-3'

GY4 : 5'-GTG-AAG-TCC-ATG-TGT-GTG-AGA-CG-3'

増幅産物サイズ ; 794 bp

・反応液組成（1 検体分）

（試薬）	（容量）	（終濃度）
2 × reaction mix （0.4 mM of each dNTP, 3.2 mM MgSO <sub>4</sub> ）	12.5 μL	1x
Superscript III RT/Platinum™ Taq mix	1.0 μL	1 unit/ μL
プライマー（各 10μM）	各 0.45 μL	各 0.18μM
テンプレート核酸 （0.005 pg-500 ng/reaction）	2.0 μL	
蒸留水	8.6 μL	
<u>（全量 25 μL にメスアップ）</u>		
合計	25 μL	

- ・使用酵素キット：SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific)

・RT-PCR 反応条件

逆転写	50°C	30min.
初期の変成	94°C	2min.
以下、変成～伸長を 35 サイクル		
変成	95°C	30 sec.
アニーリング	66°C	30 sec.
伸長	68°C	45sec.
最後の伸長	68°C	7min.

- ④ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 1.5 % アガロースゲルで電気泳動を行う。
- ⑤ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータにより塩基数 794 bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。

（2）Nested-PCR

- ① 使用する試料；テンプレート DNA として 3.（1）初動診断法：RT-PCR (1st PCR) の増幅産物、対照は（1）初動診断法：RT-PCR (1st PCR) に同じ。
- ② プライマーおよび反応条件
  - ・プライマー（YHV 特異的。GAV は増幅しない。）
  - GY2：5'-CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3'
  - Y3：5'-ACG-CTC-TGT-GAC-AAG-CAT-GAA-GTT-3'
  - 増幅産物サイズ；277 bp

・反応液組成（1 検体分）

（試薬）	（容量）	（終濃度）
HotStarTaq Master Mix （containing 2.5 units HotStarTaq DNA Polymerase, 1x PCR Buffer, 200 μM of each dNTP）	12.5 μL	1x
プライマー（各 10μM）	各 0.9 μL	各 0.36 μM
テンプレート DNA（<500 ng/reaction）	2.0 μL	
蒸留水	8.7 μL	
合計	25 μL	

・使用酵素キット：HotStarTaq Master Mix Kit（Qiagen）

・RT-PCR 反応条件

初期の変成	95℃	15min.
以下、変成～伸長を	35 サイクル	
変成	95℃	30 sec.
アニーリング	66℃	30 sec.
伸長	72℃	45 sec.
最後の伸長	72℃	7 min.

- ③ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 1.5 % アガロースゲルで電気泳動を行う。
- ④ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータにより塩基数 277 bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。
- ⑤ OIE マニュアルでは、この方法で検査するときはシーケンス（配列解析）を行って、遺伝子型を確認するのが望ましい、としているため、増幅産物の配列解析を行い、遺伝子型を確認する。

### （3）病理組織学的検査

- ① 固定標本をトリミングし、各部分を常法通りパラフィンに包埋する。
- ② 切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施し、検鏡する。本疾病に感染した場合、組織に強い壊死が散在し、核濃縮と核崩壊が認められる（写真3）。特にリンパ様器官、造血組織、鰓、皮下組織、筋肉、腸、生殖腺等外胚葉由来および中胚葉由来組織において、均一に濃く塩基性に染まる球状の直径 2μm 以下の細胞質内封入体が多数認められる（写真4）。

## 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

- ① RT-PCR 検査で陽性または擬陽性と診断された個体の試料・記録を増養殖研へ送付する。

- ② 送付するもの：臨床検査・剖検記録、PCR の泳動像写真、PCR 検査用組織試料（凍結、冷蔵あるいは 70% エタノール固定）。病理組織の場合は固定後 70% エタノールに置換した試料を送付する。

## 5. 参考文献

- 1) Flegel T.W., Boonyaratpalin S. & Withyachumnarnkul B. (1997): In: Diseases in Asian Aquaculture III, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 285–296.
- 2) Chantanachookin C., Boonyaratpalin S., Kasornchandra J., Direkbusarakom S., Aekpanithanpong U., Supamattaya K., Sriuraitana S. & Flegel T.W. (1993): Dis. Aquat. Org., 17, 145–157.
- 3) Khongpradit R., Kasornchandra J. & Boonyaratalin S. (1995): In: Diseases in Asian Aquaculture II, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, p. 6.
- 4) Flegel T.W., Sriurairatana S., Wongterrasupaya C., Boonsaeng V., Panyim S. & Ithyachumnarnkul B. (1995b): Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 76–83.
- 5) Bell, T. A. and Lightner, D. V. (1998): A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Allen Press, Inc. Lawrence, Kansas.

その他の記載はすべて OIE マニュアル（2015）による。



写真1 YHDに罹病したウシエビ(左)の外観症状。頭胸部が黄色味がる。右は健常エビ。(D.V.Lightner 博士提供)



写真2 YHDに罹病したウシエビの黄色化した鰓。(D.V.Lightner 博士提供)

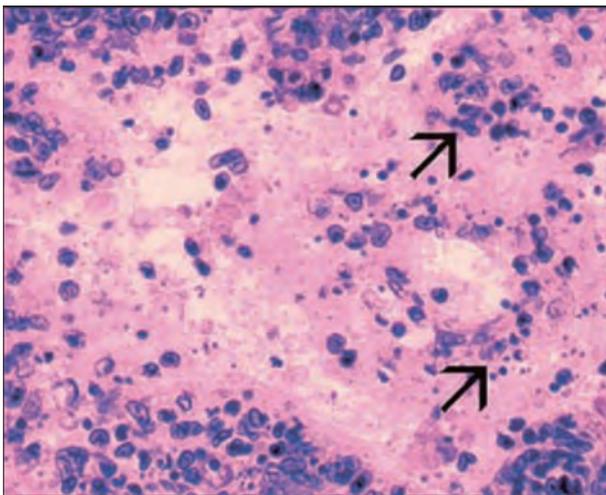


写真3 YHDに罹病したウシエビのリンパ組織の病理組織像(HE染色)。強い壊死が散在し、核濃縮と核崩(矢印)が認められる。(D.V.Lightner 博士提供)

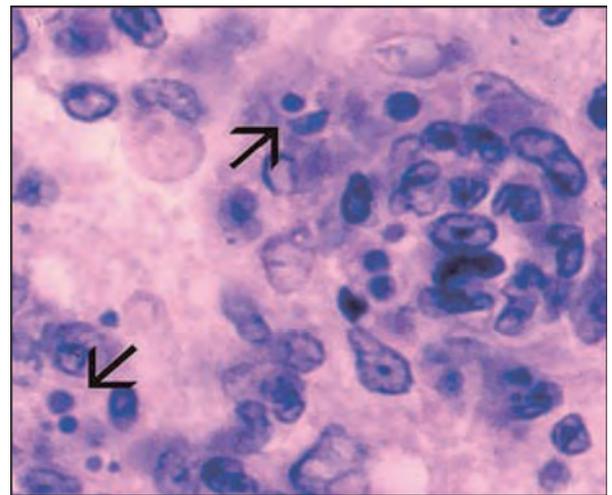


写真4 YHDに罹病したウシエビのリンパ組織の病理組織像(HE染色)。核周辺部の細胞質内に球形の塩基性封入体(矢印)が認められる。(D.V.Lightner 博士提供)



# 壊死性肝膵炎 Necrotising hepatopancreatitis (NHP)

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：壊死性肝膵炎  
英名：Necrotising hepatopancreatitis (NHP)
- ② 病原体：プロテオバクテリア門アルファプロテオバクテリア綱の未分類の細菌 *Necrotising hepatobacterium* (NHPB) 又は Rickettsial-like organism (PLO)。本病原体は分離培養法が確立されていない未分類の細菌のため予備的に *Candidatus Hepatobacter penaei* と呼ばれる。

### (2) 地理的分布

- ① 初発国：1985年にアメリカ合衆国テキサス州のエビ養殖場
- ② 分布域：西半球に分布する。これまでにベリーズ、ブラジル、コロンビア、コスタリカ、エクアドル、エルサルバドル、グアテマラ、ホンジュラス、メキシコ、ニカラグア、パナマ、ペルー、アメリカ合衆国、ベネズエラにおけるエビ養殖場で発生が確認されている。

### (3) 宿主域

- ① 自然発病：バナメイエビ（ホワイトレグシュリンプ、シロアシエビ；*Litopenaeus vannamei*）、ブルーシュリンプ（*L. stylirostris*）、アステカエビ（ノーザンブラウンシュリンプ；*Farfantepenaeus aztecus*）
- ② 実験感染：実験的にはバナメイエビにおいて注射<sup>1)</sup>及び経口投与<sup>2)</sup>で感染し死亡することが証明されている。また死亡率に関する記載はないが、アメリカンロブスター（*Homarus americanus*）では経口投与によって肝膵臓の壊死が起こることが証明されている<sup>3)</sup>。
- ③ キャリア：発症を生き延びたエビは細菌を持続的に保菌し、キャリアとなる可能性がある。また、天然のエビ（*L. vannamei*、*F. aztecus*、*F. duorarum*、*L. setiferus*）から本細菌が検出されている。
- ④ ベクター：知られていない。
- ⑤ その他：広義の *Penaeus* 属のエビ類（ウシエビ属：*Penaeus*、アステカエビ属：*Farfantepenaeus*、バナメイエビ属：*Litopenaeus*、クルマエビ属：*Marsupenaeus*）のほとんどが宿主になるとされる。

### (4) 発生の特徴

バナメイエビでは稚エビ及び親エビで感受性が実証されており、急性感染により死亡率は100%に達する場合もある。約30℃以上の高水温や20-38%の塩

分濃度の変化が長期間にわたり持続すると発症しやすい。

## (5) 外観症状

以下の外部症状が観察されることがある。

- ① 緩慢な動き、色素胞の発達による尾肢や腹肢の暗色化、付着生物による甲殻のひどい汚れが認められる。
- ② 食欲減退や成長不良、痩せ、甲殻の軟化が認められる。
- ③ 二次的な細菌の甲殻への感染が認められる。

以上の肉眼所見については NHP 特異的な症状ではないが、急性 NHP の場合は緩慢な動作と外観変化の後、摂餌量の著しい減少を示す。

## (6) 剖検所見

剖検によって以下の症状が観察されることがある。

- ① 消化盲嚢（肝膵臓）の萎縮が認められる。
- ② 鰓の色の暗色化が観察される。

## (7) 消毒

宿主外の細菌は通常の殺菌方法で殺菌可能と考えられる。OIE マニュアルでは卵や幼生の消毒が重要であるとされているが具体的な方法は明記されていない。

## (8) 防除法

池入れ前の種苗や親エビなどを PCR 等で本細菌のスクリーニングをすることは病原体の侵入を防ぐ上で重要である。また、水平感染を増長する共食いを防ぐためにも NHP の初期症状を早期発見することは重要である。

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

- ① PCR 及び Real-time PCR 検査のための検体：少なくとも 10 尾の瀕死エビまたは死亡直後の個体、あるいは 1.(5) に示すような本疾病が疑われる外観症状を示すものを選ぶ。
- ② 病理組織検査のための検体：生きている 5-10 尾の瀕死エビあるいは 1.(5) に示すような本疾病が疑われる外観症状を示すものを選ぶ。
- ③ 被検個体の採取場所、採取日時、水温、塩濃度、年齢、死亡状況、他からの種苗の移入の有無等、疫学状況を記録する。

### (2) 検査のための試料の採材

- ① PCR 及び Real-time PCR 検査のための採材：主要な標的組織である肝膵臓を材料とする。検体が小さい場合は 1 から 5 個体をプールして用いる。
- ② 病理組織学的検査のための採材：収集した検体を Davidson 固定液に投入し、1 日程度固定する。固定後、70% エタノールで 1 時間程度洗い、新しい 70% エタノール

に置換して保存する。

### 3. 診断手順

#### (1) PCR 検査

##### ① 試料からの DNA 抽出

PCR 検査用の DNA は 25-50 mg の肝臓から市販の DNA 組織抽出キットを用いて説明書に従い抽出する。OIE マニュアルには DNA 抽出キットとして QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen)、MagMax™ Nuceli Acid kits (Life Technologies)、Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification Kit (Promega) などが一例として記載されている。

##### ② プライマー及び反応液組成、反応条件

###### ・プライマー

NHPF2: 5'-CGT TGG AGG TTC GTC CTT CAG T-3'

NHPR2: 5'-GCC ATG AGG ACC TGA CAT CAT C-3'

増副産物サイズ：379 bp

###### ・反応液組成（1 検体分）

OIE マニュアルには Aranguren らの方法に従い illustra™ puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads (RTG beads, GE Healthcare) を用いた方法が記載されている<sup>4)</sup>。ここでは Aranguren らの手法に従い RTG beads の 1 チューブ分の反応液調整法を記載する。

(試薬)	(容量)	(終濃度)
S.D.W.	8.50 µL	
NHPF2 (1 pmol/ µL)	7.75 µL	0.31 µM
NHPR2 (1 pmol/ µL)	7.75 µL	0.31 µM
Template (5-50 ng/ µL DNA)	1.00 µL	
合計	25.00 µL	

###### ・PCR 条件

初期の変成	95 °C	5 min.
以下、変成～伸長を		35 サイクル
変成	95 °C	30 sec.
アニーリング	60 °C	30 sec.
伸長	72 °C	30 sec.
最後の伸長①	60 °C	1 min.
最後の伸長②	72 °C	2 min.
保持	4 °C	∞

③ 電気泳動

PCR 終了後、増副産物を適当な DNA 分子マーカールとともに 0.5 μg/mL のエチジウムブロマイドを含む 1.5 % アガロースゲルで電気泳動を行う。

④ トランスイルミネータにより塩基数 379 bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。

(2) Real-time PCR 検査

① 試料からの DNA 抽出

使用する試料や対象は (1)PCR 検査に同じ。

② プライマー及び TaqMan プローブ

・プライマー

NHP1300F: 5'-CGT TCA CGG GCC TTG TAC AC-3'

NHP1366R: 5'-GCT CAT CGC CTT AAA GAA AAG ATA A-3'

増副産物サイズ；67 bp

・TaqMan プローブ

NHP：5'-FAM-CCG CCC GTC AAG CCA TGG AA-TAMRA-3'

③ 反応液組成及び反応条件

OIE マニュアルには Arenguren らの方法に従ったリアルタイム PCR 検査法が記載されている\*。ここでは Aranguren らの手法に従い PerfeCTa qPCR SuperMix (Quanta Biosciences) を用いた反応液調整法を記載する。

\*OIE マニュアル記載の TaqMan One-step real-time PCR SuperMix (Quanta Biosciences) に該当する製品は現在、市販されていない。

・反応液組成 (1 検体分)

(試薬)	(容量)	(終濃度)
S.D.W.	1.8 μL	
NHP1300F (10 pmol/ μL)	0.6 μL	0.3 μM
NHP1366R (10 pmol/ μL)	0.6 μL	0.3 μM
TaqMan プローブ NHP (1 pmol/ μL)	2.0 μL	0.1 μM
PerfeCTa qPCR SuperMix	10.0 μL	1 ×
Template (4 ng/ μL DNA)	5.0 μL	20 ng/ μL
合計	20.0 μL	

・Real-time PCR 条件

初期の変成 95 °C 3 min.  
以下、変成～伸長を 40 サイクル

変成	95 °C	15 sec.
アニーリングと伸長	60 °C	1 min.

### (3) 病理組織学的検査

固定標本をトリミングし、肝膵臓を常法通りパラフィンに固定する。切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施し、検鏡する。NHP は感染初期を除いて通常のヘマトキシリン・エオシン染色で容易に診断可能である。疾病の進行段階に応じて消化盲嚢（肝膵臓）には以下のような病理組織学的特徴がみられる。

- ① 急性期では肝膵臓の萎縮、消化盲嚢上皮の軽度の萎縮、細菌巣の形成とそれに対する血球の浸潤や、消化盲嚢細管の被嚢化、盲嚢上皮細胞の壊死と剥離が観察される。
- ② 移行期では盲嚢上皮細胞の壊死・脱落に応じて血球の浸潤が見られる。盲嚢上皮の萎縮は顕著であり、水腫状の大きな空所が肝膵臓内に形成される。盲嚢上皮細胞は細胞高が低くなり細胞内の脂肪滴は大きく減少し、細菌塊が認められる。しばしば中央に細菌塊を含んだ結節の形成が観察される。
- ③ 慢性期では水腫状の空所や結節は減少し、浸潤してきた血球に置き換わる。細菌塊を含む肥大した細胞の数は顕著に減少し、壊死した盲嚢には線維化やメラニンの沈着が観察される。

## 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

- ① PCR 検査で陽性または疑陽性と診断された個体の試料・記録を増養殖研へ送付する。
- ② 送付するもの：臨床検査・剖検記録、PCR の電気泳動像写真、PCR 検査用組織試料（凍結・冷蔵あるいは 70% エタノール固定）。

## 5. 参考文献

- 1)Frelier, P. F., J. K. Loy and B. Kruppenbach (1993): Transmission of Necrotizing Hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, 61 (1), 44-48.
- 2)Vincent, A. G., V. M. Breland and J. M. Lotz (2004): Experimental infection of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* with Necrotizing Hepto-pancreatitis (NHP) bacterium by per os exposure. *Dis. Aquat. Org.*, 61, 227-233.
- 3)Avila-Villa, L. A., T. Gollas-Galv'an, M. Mart'inez-Porchas, F. Mendoza-Cano and J. Hern'andez-Lopez (2012): Experimental Infection and Detection of Necrotizing Hepatopancreatitis Bacterium in the American Lobster *Homarus americanus*. *The Scientific World J.*, Article ID 979381.

- 
- 4) Aranguren, L. F., Tang, K. F. and D. V. Lightner (2010): Quantification of the bacterial agent of necrotizing hepatopancreatitis (NHP-B) by real-time PCR and comparison of survival and NHP load of two shrimp populations. *Aquaculture*, 307, 187–192.

その他の記載はすべて OIE マニュアル (2016) による。

# タウラ症候群 Taura syndrome(TS)

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：タウラ症候群  
英名：Taura syndrome (TS)
- ② 病原体：Taura syndrome virus (TSV) ジシストロウイルス科 アパラウイルス属  
少なくとも下記4種の遺伝子群がある。  
(1) アメリカ群 (2) 東南アジア群 (3) ベリーズ群 (4) ベネズエラ群

### (2) 地理的分布

- ① 初発国：1992年にエクアドルで最初に報告されたが、1990年にはすでにコロンビアで発生していた可能性がある。
- ② 分布域：中南米諸国、アメリカ合衆国、インドネシア、タイ、マレーシア、中国、台湾。

### (3) 宿主域

- ① 自然発病：主な自然感染宿主はバナメイエビ（ホワイトレッグシュリンプ、シロアシエビ；*Litopenaeus vannamei*）である。ブルーシュリンプ（*L. stylirostris*）でも自然感染は報告されているが、感受性は低い。
- ② 実験感染：ウシエビ（ブラックタイガー）(*Penaeus monodon*)、クルマエビ（*Marsupenaeus japonicus*）とコウライエビ（*Fenneropenaeus chinensis*）、ノーザンホワイトシュリンプ（*L. setiferus*）、サウザンホワイトシュリンプ（*L. schmitti*）、アステカエビ（ノーザンブラウンシュリンプ；*Farfantepenaeus aztecus*）とノーザンピンクシュリンプ（*Fa. duorarum*）で認められている。
- ③ キャリア：生残した宿主は慢性的にウイルスを保有し、キャリアとなる。
- ④ ベクター：ウイルスを保有するエビの冷凍加工品（本ウイルスは冷凍/解凍によっても活性を維持する）、加工工場からの廃棄物、それを食べる海鳥などがベクターになり得ると考えられている。

### (4) 発生の特徴

バナメイエビでは、0.05～5g程度の稚エビで明らかな症状を示し、急性感染により高い死亡率（40～90%ないしそれ以上）をもたらす。発生すれば群の感染率は100%に達する場合がある。塩分濃度が30ppt以下の時に発症しやすい。

### (5) 外観症状

- ① 症状は急性期、移行期、慢性期の3段階に分けられる。

- ② 急性期及び移行期では、一般的に体全体が薄赤く変色し、特に尾鰭と腹脚が明らかに赤くなる。付属肢に部分的な上皮の壊死が認められる。病エビは酸欠状態となり、溶存酸素の多い、池の表面や端に集まり、しばしばそれを狙う海鳥が集まってくる。養殖場ではこの鳥の群がりにより病気の発生が初めて知られることがある。
- ③ 明らかに急性期の病変を示しているエビでは、柔らかい殻と空胃が特徴である。
- ④ 急性期を生残した移行期のエビでは多くの不規則で点状のメラニン沈着が上皮にみられ、このようなエビでは軟弱な上皮と赤色素胞の拡大を示すこともある。
- ⑤ 移行期を生残したエビは慢性期の感染状態になる。慢性期の特徴は、死亡の停止、正常行動の回復、肉眼で観察できるメラニン沈着した病変の消失などがあげられる。

### (6) 剖検所見

特徴的な所見に乏しい。

### (7) 消毒

文献情報はないが、塩素剤など通常の消毒剤により本ウイルスの消毒は可能であると思われる。

### (8) 防除法

受精卵と仔エビの消毒が効果的とされる。垂直感染をさけるため、卵は清浄な海水でよく洗浄し、卵や幼生が親エビの糞便等による汚染を受けないようにする。また、本疾病に対する抵抗性のある家系が作成され、販売されている。

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

- ① RT-PCR のための検体：少なくとも 10 尾の瀕死エビまたは死亡直後の個体、ないしは 1. (5) に示すような本疾病に特徴的な外観症状を示すものを選ぶ。
- ② 病理組織検査のための検体：活着している 5-10 尾の病エビないし、1. (5) に示すような本疾病に特徴的な外観症状を示すものを選ぶ。
- ③ 被検個体の採取場所、採取日時、海水温、年齢、死亡状況、他からの種苗の移入の有無など、疫学的情報を記録する。

### (2) 検査のための試料の採材

- ① RT-PCR のための採剤：新鮮なエビの血リンパ。死亡や冷凍個体しか手に入らない場合は腹肢などの組織。あるいは小さな個体であればエビ全体を材料とする。
- ② 大型のエビの場合は、中腸腺前方、中腸線内部（いわゆる胃の内腔）、前方の腹節、後方の腹節それぞれに Davidson の固定液を注射する。エビ体重の 5-10% 程度の固定液を注射する。注射後ただちに尾部から解剖バサミで甲殻に切れ目を入れる。切れ目は腹節では真横に、頭胸甲では斜め上に、内部臓器を傷つけないように注意しながら眼の付け根付近まで入れる。これは固定液を浸透しやすくするためである。12g より大型のエビでは、さらに頭胸甲と腹節の境目および腹部中央に背側から体軸と垂直に

体の半分程度まで切れ目を入れる。その後速やかに固定液に投入し、1 日程度固定する。注射が不可能な小型のエビの場合は体全体を直接固定液に投入して固定する 1)。固定液はサンプリング直前まで冷蔵庫か水中で冷やしておき、サンプルを投入したら 30 分程度はゆっくり攪拌する。その後一晩置いた後、70% エタノールで 1 時間程度洗い、さらに新しい 70% エタノールに置換して保存する。

• Davidson の固定液の組成

95% エチルアルコール	33 mL
市販のホルマリン原液	22 mL
100% 酢酸（氷酢酸）	11.5 mL
蒸留水	33.5 mL
合計	100 mL

なお、上記は全量を 100 に合わせるためのもので、簡便に 95% エタノール：ホルマリン原液：氷酢酸：蒸留水を体積比 3:2:1:3 の割合で混合してもよい。作製した本固定液は 4℃ で保存すれば 2 ヶ月程度は使用可能である。

### 3. 診断手順

#### (1) RT-PCR 方法 1

- ① 新鮮なエビの血リンパかまたは適当な RNA 抽出キットにより組織または血リンパから抽出された RNA を用いる。これら新鮮な血リンパは 1.0  $\mu$ L を、抽出された全 RNA（濃度：1~100ng/ mL）は 10  $\mu$ L をテンプレートとして使用する。なお、抽出方法などについては、使用するキットのマニュアルに従うこと。

注意：10% のクエン酸ソーダは通常血リンパの血液凝固阻止剤として用いられるが、逆転写反応または PCR に影響を与えるおそれがある。したがって、クエン酸ソーダによる PCR の反応阻害が疑われた場合は、テンプレートに使用した血リンパ原液を 10 倍に水で希釈して使用することを推奨する。

- ② 陰性対照として、可能であれば TSV 陰性の組織を使用する。困難な場合には蒸留水やバッファを用いる。陽性対照としては可能であれば TSV 陽性の組織を用いる。困難な場合には、TSV の DNA テンプレートを陽性対照とする。

- ③ プライマーおよび反応条件

• プライマー

TSV 9195 : 5'-TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC-3'

TSV 9992 : 5'-AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT-3'

増幅産物サイズ ; 213bp

• 反応液組成（1 検体分）

（試薬）	（容量）	（終濃度）
5xEZ バッファー	10 $\mu$ L	1x

rTth DNA polymerase (2.5units/ $\mu$ L)	2.0 $\mu$ L	0.1units/ $\mu$ L
dNTP(10mM each)	1.5 $\mu$ L	300 $\mu$ M
酢酸マンガン (25mM)	5.0 $\mu$ L	2.5 mM
プライマー (各 10 $\mu$ M)	各 2.3 $\mu$ L	各 0.46 $\mu$ M
テンプレート DNA	5.0 $\mu$ L	
蒸留水	21.9 $\mu$ L	
合計	50 $\mu$ L	

- 使用酵素キット：GeneAmp®EZ rTth RNA PCR Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific)

- RT-PCR 反応条件

逆転写	60°C	30min.
初期の変成	94°C	2min.
以下、変成～伸長を 40 サイクル		
変成	94°C	45sec.
アニーリングおよび伸長	60°C	45sec.
最後の伸長	60°C	7min.

- ④ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 2.0% アガロースゲルで電気泳動を行う。
- ⑤ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータにより塩基数 213bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。

## (2) RT-PCR 方法 2

- ① 使用する試料や対照は (1)RT-PCR 方法 1 に同じ。
- ② プライマーおよび反応条件<sup>2)</sup>

- プライマー

TSV55P1 : 5'-GGC-GTA-GTG-AGT-AAT-GTA-GC-3'

TSV55P2 : 5'-CTT-CAG-TGA-CCA-CGG-TAT-AG-3'

増幅産物サイズ ; 1303bp

- 反応液組成 (1 検体分)

(試薬)	(容量)	(終濃度)
10x Buffer for AMV RT	5 $\mu$ L	1x
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3 $\mu$ L	3.0mM <sup>*1</sup>
dNTP mix (10mM each)	1 $\mu$ L	200 $\mu$ M each
RNase inhibitor	1 $\mu$ L	0.4units/ $\mu$ L
プライマー	各 1 $\mu$ L	各 0.46 $\mu$ M
テンプレート RNA	1 $\mu$ L	2pg-20ng/ $\mu$ L
eAMV-RT	1 $\mu$ L	0.4units/ $\mu$ L

JumpStart AccuTaq LA DNA polymerase	1 μL	0.05units/ μL
蒸留水	35 μL	
合計	50 μL	

\*1: バッファ中の MgCl<sub>2</sub> を含む。

・使用酵素キット：Enhanced Avian HS RT-PCR Kit (Sigma-Aldrich)

・RT-PCR 反応条件

逆転写	50℃	45min.
初期の変成	95℃	5min.
以下、変成、アニーリング、および伸長を 40 サイクル		
変成	95℃	1min.
アニーリング	60℃	45sec.
伸長	72℃	1.5min.
最後の伸長	72℃	5min.

- ④ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 1.0% アガロースゲルで電気泳動を行う。
- ⑤ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータにより塩基数 1303bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。

### (3) 病理組織学的検査

- ① 固定標本をトリミングし、各部分を常法通りパラフィンに包埋する。
- ② 切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施し、検鏡する。急性期ではすべての足肢、鰓、後腸、食道、胃、体表のクチクラ上皮において、巣状ないしは拡散した上皮細胞の壊死が特徴的に観察される（写真 4）時としてクチクラ上皮下の結合組織や感染した上皮基部に接する筋繊維の細胞も感染する。病変部の壊死細胞では、核濃縮あるいは核崩壊した核、エオシン好性が増した細胞質、明白な細胞残渣が認められる（写真 5）。この細胞残渣は一般的にしばしばエオシン好性から（写真 5）。薄い塩基性好性の球状体（直径 1～20 μm）であり、フォイルゲン反応（DNA に対して）陽性を示す濃縮あるいは崩壊した核から DNA を含まない細胞質内封入体として区別される（写真 6）。これらの球状体および崩壊した核は「コショウふられたような」あるいは「散弾銃の銃痕のような」様子で観察され、急性期のタウラ症候群の特徴となっている。移行期では、病巣に顕著な血球の浸潤および蓄積が起り、これらが黒点を形成するメラニン沈着を引き起こす。ただし、このような病変はビブリオ属細菌による感染症等、他の原因によっても引き起こされる。慢性期では、急性期にみられる組織病変は消失し、顕著な病変はみられない。

## 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

- ① RT-PCR 検査で陽性または擬陽性と診断された個体の試料・記録を増養殖研へ送付する。

- ② 送付するもの：臨床検査・剖検記録、PCR の泳動像写真、PCR 検査用組織試料（凍結、冷蔵あるいは 70% エタノール固定）。病理組織の場合は固定後 70% エタノールに置換した試料を送付する。

## 5. 参考文献

- 1) Bell, T. A. and Lightner, D. V. (1998): A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Allen Press, Inc. Lawrence, Kansas.
- 2) Erickson H.S., Zarin-Herzberg M. and Lightner D.V. (2002): Detection of Taura syndrome virus (TSV) strain differences using selected diagnostic methods: diagnostic implications in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, 52(1),1-10.

その他の記載はすべて OIE マニュアル（2015）による。



写真1 TS に罹病したホワイトレグシュリンプの外観症状（急性期、移行期）。体全体が赤みを帯び、特に尾脚は顕著な赤色を示す。(D. V. Lightner 博士提供)

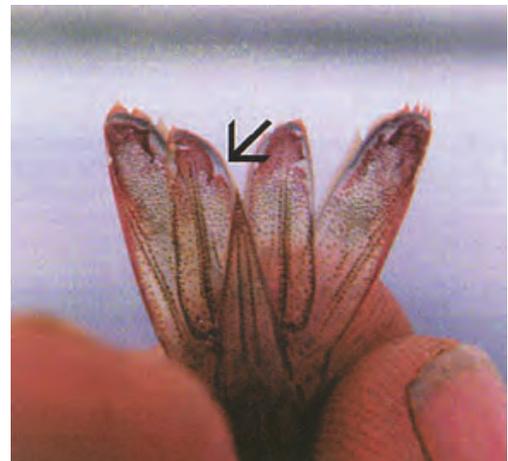


写真2 TS に罹病したホワイトレグシュリンプの外観症状（急性期、移行期）。尾脚のクチクラ上皮の部分壊死により先端部分にギザギザ模様が観察される。(D. V. Lightner 博士提供)



写真3 TS に罹病したホワイトレグシュリンプの移行期の外観症状。体表全体の至る所で不規則に点状を示す上皮のメラニン沈着が観察される。(D. V. Lightner 博士提供)

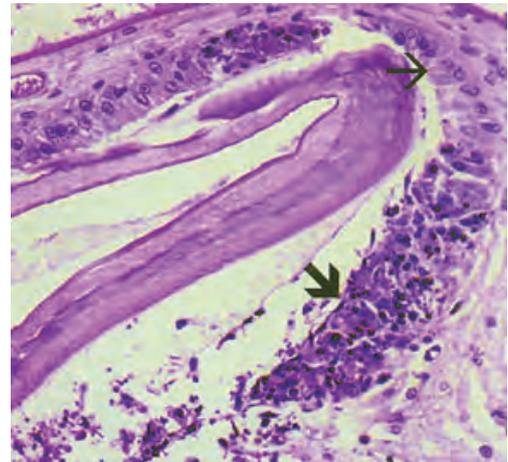


写真4 TS に罹病したホワイトレグシュリンプの急性期の胃の病理組織像（HE 染色）。クチクラ上皮の広範囲な壊死巣が観察される（太矢印）。隣接した組織では正常を示す（細矢印）。(D. V. Lightner 博士提供)

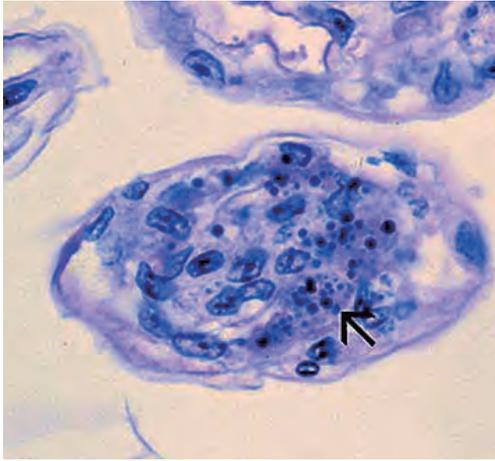


写真5 TSに罹病したホワイトレグシュリンプの急性期の鰓の病理組織像 (HE 染色)。病変部の壊死細胞では、核濃縮あるいは核崩壊した核とエオシン好性が増した細胞質、および明白な細胞残渣が特徴的に認められる。(D. V. Lightner 博士提供)

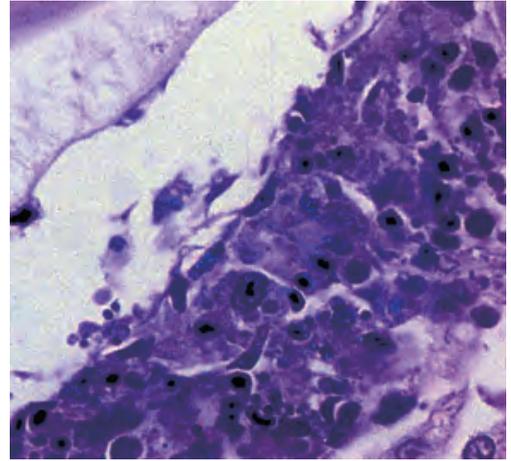


写真6 TSに罹病したホワイトレグシュリンプの急性期の胃の病理組織像 (HE 染色、高倍率)。病変部のクチクラ上皮と上皮下の結合組織の細胞では、核濃縮あるいは核崩壊した核、エオシン好性が増した細胞質、様々な染色性を示す球状の細胞質封入体が認められる。これらの球状体および崩壊した核は“コショウがふられたような”あるいは“散弾銃の銃痕のような”様子で、本病で特徴的に観察される。(D. V. Lightner 博士提供)



# 伝染性皮下造血器壊死症 Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis (IHHN)

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：伝染性皮下造血器壊死症  
英名：Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis (IHHN)
- ② 病原体：Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)  
(パルボウイルス科ブレビデンソウウイルス属)

Type 1 および type 2 の 2 つの遺伝子型が知られている。前者は南北アメリカ大陸とフィリピン、後者は東南アジアに分布する。また、本ウイルスと相同な配列がエビのゲノム中に組み込まれていることがあるが、これらの配列には感染性は無いと考えられている。

### (2) 地理的分布

アメリカ合衆国南東海岸、カリブ海・中南米諸国、ハワイ、グアム、タヒチ、ニューカレドニア、シンガポール、タイ、マレーシア、フィリピン、インドネシア、ミャンマー、イラン、オーストラリア

### (3) 宿主域

- ① 自然発病：自然発病は主にブルーシュリンプ (*Litopenaeus stylirostris*)、バナメイエビ (ホワイトレッグシュリンプ、シロアシエビ；*L. vannamei*) 及びウシエビ (ブラックタイガー；*Penaeus monodon*)。
- ② 実験感染：多くのエビ類が感受性を示す。
- ③ キャリア：生残した宿主は慢性的にウイルスを保有し、キャリアとなる。
- ④ ベクター：知られていない。

### (4) 発生の特徴

32℃では 24℃に比較して宿主 (バナメイエビ) 内のウイルス量が 1/100 程度に落ちたという実験結果があるが、32℃でも宿主 DNA50ng あたり 105 程度までのウイルスゲノムのコピーが検出されている。ブルーシュリンプでは、幼生やポストラーバでは病気は発生せず、PL35 以降で発症して大量死をもたらすが、成エビでは感染しても発症・死亡することはまれである。

### (5) 外観症状

#### ブルーシュリンプ

- ・感染個体は死に至るまで、水面近くを緩慢に遊泳し、そこから底面にゆっくりと沈降する行動を繰り返す。

- ・特徴的な外観症状は乏しいが、表皮（特に腹部のつなぎ目）に白あるいは黄褐色の斑点がみられ、まだら模様のようにみえることもある。
- ・瀕死個体では薄青みがかかり、腹部筋肉の色がくすんでみえることもある。

バナメイエビ（ホワイトレグシュリンプ、シロアシエビ；*Litopenaeus vannamei*）

- ・この種には IHHN ウイルスは典型的な慢性疾病を引き起こす。
- ・RDS(Runt deformity syndrome) と呼ばれる、屈曲した額角、しわのよった触角、変形した外皮等の変形症状がみられる。
- ・RDS を示す集団では各個体の大きさがばらつき、特に矮小な個体が目立つ。

## (6) 剖検所見

特徴的な所見に乏しい。

## (7) 消毒

池や器具の消毒には塩素剤およびヨード剤が有効である。

## (8) 防除法

受精卵と仔エビの消毒が効果的とされるが我が国でエビの卵稚仔を対照にして承認された消毒薬はない。垂直感染をさけるため、卵は清浄な海水でよく洗浄し、卵や幼生が親エビの糞便等による汚染を受けないようにする。

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

- ① RT-PCR のための検体：少なくとも 10 尾の瀕死エビまたは死亡直後の個体、ないしは 1. (5) に示すような外観症状のあるものを選ぶ。
- ② 病理組織検査のための検体：5-10 尾の病エビないし、1. (5) に示すような外観症状のあるものを選ぶ。死亡個体は病理組織検査には適さない。
- ③ 被検個体の症状、採取場所、採取日時、海水温、年齢、体重、死亡状況、他からの種苗の移入の有無など、疫学的情報を記録する。

### (2) 検査のための試料の採材

- ① PCR のための採材：病エビの鰓など、クチクラ上皮を含む組織、あるいは血リンパ。
- ② 病理組織検査のための採材

1)：大型のエビの場合は、中腸腺前方、中腸線内部（いわゆる胃の内腔）、前方の腹節、後方の腹節それぞれに Davidson の固定液を注射する。エビ体重の 5-10% 程度の固定液を注射する。注射後ただちに尾部から解剖バサミで甲殻に切れ目を入れる。切れ目は腹節では真横に、頭胸甲では斜め上に、内部臓器を傷つけないように注意しながら眼の付け根付近まで入れる。これは固定液を浸透しやすくするためである。

2)：12g より大型のエビでは、さらに頭胸甲と腹節の境目および腹部中央に背側

から体軸と垂直に体の半分程度まで切れ目を入れる。その後速やかに固定液に投入し、1日程度固定する。

- 3)：注射が不可能な小型のエビの場合は体全体を直接固定液に投入して固定する<sup>1)</sup>。固定液はサンプリング直前まで冷蔵庫か水中で冷やしておき、サンプルを投入したら30分程度はゆっくり攪拌する。その後一晩置いた後、70%エタノールで1時間程度洗い、さらに新しい70%エタノールに置換して保存する。

・Davidsonの固定液の組成

95% エチルアルコール	33 mL
市販のホルマリン原液	22 mL
100% 酢酸 (氷酢酸)	11.5 mL
蒸留水	33.5 mL
合計	100 mL

なお、上記は全量を100に合わせるためのもので、簡便に95%エタノール：ホルマリン原液：氷酢酸：蒸留水を体積比3:2:1:3の割合で混合してもよい。作製した本固定液は4℃で保存すれば2ヶ月程度は使用可能である。

### 3. 診断手順

#### (1) PCR 方法1

- ① 採取したエビ試料から市販のDNA抽出キットなどにより核酸を抽出する。抽出法は使用するキットのマニュアルに従う。
- ② PCRに際して、テンプレートとして次の対照を用いる。
  - ・陰性対照：IHHNV陰性エビ組織から同様な方法で抽出したDNA
  - ・陽性対照：IHHNV陽性エビ組織から同様な方法で抽出したDNA（陰性のエビ組織に陽性対照cDNAプラスミド等を加えたものから抽出してもよい）
  - ・テンプレートなし。
- ③ プライマーおよび反応条件
  - ・プライマー

389F：5'-CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA-3'

389R：5'-GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA-3'

増幅産物サイズ；389bp

・反応液組成（1検体分）

(試薬)	(容量)	(終濃度)
10x PCR バッファ	5.0 μL	1x
Ampli <sup>®</sup> Taq Gold DNA polymerase	0.5 μL	
dNTP(10mM each)	1.0 μL each	200 μM
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4.0 μL	2mM
プライマー (各 100ng/ μL)	各 1.5 μL	各 3ng/ μL

検体 DNA	1.0 μL
蒸留水	32.5 μL
合計	50.0 μL

上記は 1 検体あたりの反応液量が 50 μL であるが、全量を半分の 25 μL にして行ってもよい。

- 使用酵素キット：Ampli<sup>Taq</sup>® Gold (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific)

- PCR 反応条件

初期の変成	95°C	5min.
以下、変成、アニーリング、および伸長を 35 サイクル		
変成	95°C	30sec.
アニーリング	55°C	30sec.
伸長	72°C	1min.
最後の伸長	72°C	7min.

- ④ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 1.5 % アガロースゲルで電気泳動を行う。
- ⑤ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータによりサイズが 389bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。

## (2) PCR 方法 2

- ① 使用する試料や対照は (1)PCR 方法 1 に同じ。

- ② プライマーおよび反応条件

- プライマー

392F：5'-GGG-CGA-ACC-AGA-ATC-ACT-TA-3'

392R：5'-ATC-CGG-AGG-AAT-CTG-ATG-TG-3'

増幅産物サイズ；392bp

- 反応液組成、使用酵素キット、PCR 反応条件は (1)PCR 方法 1 に同じ。

- ③ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 1.5% アガロースゲルで電気泳動を行う。
- ④ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータにより塩基数 392bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。

## (3) 病理組織学的検査

- ① 固定標本をトリミングし、各部分を常法通りパラフィンに包埋する。
- ② 切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施し、検鏡する。外胚葉由来組織（ク

チクラ上皮、腸上皮、神経系) および中胚葉由来組織 (造血器官、触角腺、生殖腺、リンパ様器官、結合組織) の細胞において、しばしば核の肥大と核内にエオシン好性の封入体が観察される (Cowdry type A 封入体)。しかし、この病変は WSSV によるものとよく似ており混同しやすいので注意が必要である。

#### 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

- ① PCR 検査で陽性または擬陽性と診断された個体の試料・記録を増養殖研へ送付する。
- ② 送付するもの：臨床検査・剖検記録、PCR の泳動像写真、PCR 検査用組織試料 (凍結、冷蔵あるいは 70% エタノール固定)。病理組織の場合は固定後 70% エタノールに置換した試料を送付する。

#### 5. 参考文献

- 1) Bell, T. A. and Lightner, D. V. (1998): A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Allen Press, Inc. Lawrence, Kansas.

その他の記載はすべて OIE マニュアル (2015) による。



写真1 IHHN に罹病したブルーシュリンプの外観症状。体表に白色または黄褐色の斑点 (矢印) が観察される。(D. V. Lightner 博士提供)



写真2 IHHN に罹病し、成長不良性変形症候群を呈するホワイトレッグシュリンプ。額角および触覚の湾曲、変形が観察される。(D. V. Lightner 博士提供)

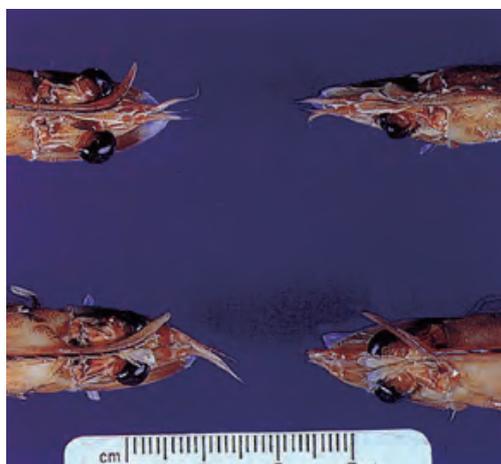


写真3 IHHN に罹病し、成長不良性変形症候群を呈するホワイトレッグシュリンプの頭部。額角および触覚の湾曲、変形が観察される。(D. V. Lightner 博士提供)

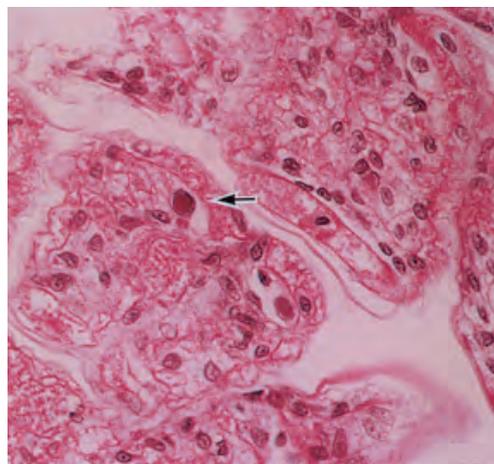


写真4 IHHN 罹病エビの鰓の病理組織像 (HE 染色)。核内にエオシンに染まった封入体 (矢印) が観察される。(D. V. Lightner 博士提供)



写真5 IHN 罹病エビの鰓の病理組織像(HE染色、高倍)。  
核内にエオシンに染まった封入体(矢印)が観察される。(D.V. Lightner 博士提供)

# 急性肝膵臓壊死病 Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) (=EMS/AHPND)

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：急性肝膵臓壊死病  
英名：Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) (=EMS/AHPND)
- ② 病原体：*Vibrio parahaemolyticus* (ビブリオ科ビブリオ属)、*Vibrio harveyi* (ビブリオ科ビブリオ属)、*Vibrio owensii* (ビブリオ科ビブリオ属)

### (2) 地理的分布

- ① 初発国：中国 (2009 年)
- ② 分布域：ベトナム (2011 年)、マレーシア (2011 年)、タイ (2012 年)、フィリピン (2015 年)、メキシコ (2013 年)、オーストラリア (2016 年)

### (3) 宿主域

- ① 自然発病：バナメイエビ (ホワイトレッグシュリンプ、シロアシエビ；*Litopenaeus vannamei*)、ウシエビ (*Penaeus monodon*)、コウライエビ (*Fenneropenaeus chinensis*)
- ② 実験感染：クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*)
- ③ キャリア：不明
- ④ ベクター：不明
- ⑤ その他：本疾病の原因細菌である *Vibrio* 属細菌はグラム陰性でエビ養殖池の常在菌である。原因菌は、プラスミド DNA に由来する病原因子 (毒素) を有する株である。

### (4) 発生の特徴

稚エビの池収容後、10 日～30 日で発症する。実験感染では 10 グラム以上の成長したエビも感染し死亡する。実験感染では菌数やエビのサイズにより異なるが感染開始 16 時間程度から斃死がみられ、2~3 日でほぼ 100% 死亡する。

ホルマリン不活化死菌を餌に混ぜて投与することでエビが死亡することから、毒素が病原因子であり、エビを死に至らしめることがわかっている。

### (5) 外観症状

肝膵臓の白色化が認められる。外骨格の軟化、腸管内容物が摂餌不良のため部分的にしか見られないか、もしくは認められない。重篤感染個体は底に沈降する。

### (6) 剖検所見

肝膵臓に顕著な細胞崩壊がみられる。

## (7) 消毒

感染エビの数週間の冷凍あるいは 55℃で 5 分や 80℃で 1 分の加熱処理により増殖能は減少するが、冷蔵ではそれほど減少しない。15 分の酸性処理 (pH 5) により、原因菌は増殖能を失う。原因菌は汽水で 9 日間、海水で 18 日間生存可能。エビを生かした状態での消毒法は無い。

## (8) 防除法

原因細菌がビブリオであることから、ビブリオが増殖しないような飼育水環境を整えることが重要である。東南アジアで実施されている防除法としては、養殖池の水が富栄養化しないように換水および残餌、脱皮殻と死骸を除去することが行われている。換水は 1 日に 10～15% 程度行われている。

原因細菌がビブリオであることから抗菌剤により治療が可能であるが、発生地域の一部では耐性菌が出現していることから、抗菌剤の使用は避けるべきである。

本感染症の拡大は親エビを成熟させるために用いる生餌（ゴカイ等）である考えられている。このことから、親エビの成熟に用いる生餌は国産のものを使用するか、使用前に PCR 検査で陰性であることを確認しておく必要がある。

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

死亡したエビ及び弱っているエビを使用する。

### (2) 検査のための試料の採材

細菌検査および PCR 検査ともに肝臓を使用する。胃および腸管からも検出できるので、肝臓とともに検査に用いるとよい。

細菌検査は TCBS 寒天培地を用いると、ビブリオを選択的に培養できる。増殖してきたコロニーを PCR 検査に用いる場合、複数のコロニーを供試する。複数のコロニーを供試する理由は、PCR の標的となる毒素遺伝子の近傍にトランスポゾンがあり、原因菌を培養することによりトランスポゾンとともに毒素遺伝子が脱落し、この場合 PCR の結果が陰性になるからである

新鮮な試料を用いる場合は、使用する組織を 3% 食塩濃度となるようにした液体培地 2 mL にエビの組織を入れ、2 時間程度振盪培養後に DNA を抽出すると良い。病性鑑定指針では Nested-PCR を実施するようになっているが、経験的に組織を液体培地で培養して PCR 検査したほうが良いと思われる。

## 3. 診断手順

診断法は OIE の AHPND の項に複数の PCR 法が記載されているが、いずれも毒素遺伝子を標的としたものである。以下は、病性鑑定指針に従った方法であ

るが、この方法以外でも問題はない。先述したように新鮮な試料を使用できる場合は、細菌培養後に PCR に用いた方が、Nested-PCR より感度よく検出できると思われる。

AHPND 診断の PCR は特別なことはしないので、購入された *Taq* polymerase と添付の反応液を使用すればよい。

先述のとおり標的遺伝子が脱落することがあるので、診断は複数個体を用いると良い。

#### 初動診断法：Nested-PCR

材料；肝臓より抽出した DNA

(1st)

プライマー；

AP4-F1 : 5'- ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC -3'

AP4-R1 : 5'- ACGATTTTCGACGTTCCCCAA -3'

増幅産物サイズ；1269 bp

PCR 反応；94℃で2分の熱変性後、94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で90秒を30サイクル行い、最後に72℃で2分間。

(2nd)

プライマー；

AP4-F2 : 5'- TTGAGAATACGGGACGTGGG -3'

AP4-R2 : 5'- GTTAGTCATGTGAGCACCTTC -3'

増副産物サイズ；230 bp

PCR 反応；94℃で2分の熱変性後、94℃で20秒、55℃で20秒、72℃で20秒を25サイクル行い、最後に72℃で2分間。

最終診断法：(ア)Nested-PCR

初動診断法と同じ。

(イ)シーケンス

## 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

新鮮な試料の場合は冷蔵で送付する。

## 5. 参考文献

FAO (2013): Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304). Hanoi, Viet Nam, on 25–27 June 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053. Rome. 54 pp. <http://www.fao.org/docrep/018/i3422e/i3422e00.htm;2013>

- FAO (2014): FAO yearbook. Fisheries and aquaculture statistics-2012. Rome, FAO. 76 pp.
- Flegel T.W. (2012): Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *J. Invert. Pathol.*, 110, 166-173.
- Flegel T. W. and C.F. Lo (2014): Interim primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). [http://www.enaca.org/modules/library/publication.php?publication\\_id=1128](http://www.enaca.org/modules/library/publication.php?publication_id=1128)
- Gomez-Gil B., S. Soto-Rodríguez, R. Lozano and M. Betancourt-Lozano (2014): Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain m0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. *Genome Announc.*, 2, e00055-14.
- Joshi J., J. Srisala, V. T. Hong, I. Chen, B. Nuangsaeng, O. Suthienkul, C. F. Lo, T. W. Flegel, K. Sritunyalucksana and S. Thitamadee (2014): Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 428-429, 297-302.
- Koiwai K, Tinwongger S, Nozaki R, Kondo H, Hirono I. (2016) Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease strain of *Vibrio parahaemolyticus* using loop-mediated isothermal amplification. *J Fish Dis.* 39:603-606.
- Kondo H., S. Tinwongger, P. Proespraiwong, R. Mavichak, S. Unajak, R. Nozaki and I. Hirono (2014): Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. *Genome Announc.*, 2, e00221-14.
- Kondo H, Van PT, Dang LT, Hirono I. (2015) Draft Genome Sequence of Non-*Vibrio parahaemolyticus* Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Strain KC13.17.5, Isolated from Diseased Shrimp in Vietnam. *Genome Announc.* 3(5). pii: e00978-15.
- Lee, C.T., Chen, I.T., Yang, Y.T., Ko, T.P., Huang, Y.T., Huang, J.Y., Huang M.F., Lin S.J., Chen C.Y., Lin S.S., Lightner D.V., Wang H.C., Wang, A. H.J., Wang, H.C., Hor. L. and Lo, C.F. (2015) The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 10798-10803.
- Liu L, Xiao J, Xia X, Pan Y, Yan S, Wang Y. (2015) Draft Genome Sequence of *Vibrio owensii* Strain SH-14, Which Causes Shrimp Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. *Genome Announc.* 3(6). pii: e01395-15.
- Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA) (2012): Final report of the Asia Pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: early mortality syndrome (EMS)/ acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS), 9–10 Aug 2012. Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand. August 2012. [http://www.enaca.org/modules/library/publication.php?publication\\_id=1059](http://www.enaca.org/modules/library/publication.php?publication_id=1059)
- Office International des Epizooties. Manual of diagnostic tests for aquatic animal (OIE)

(2013): <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/>

Tran L., L. Nunan, R. M. Redman, L. L. Mohney, C. R. Pantoja, K. Fitzsimmons and D. V. Lightner (2013): Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, 105, 45-55.

Tinwongger, S., Proespraiwong, P., Thawonsuwan, J., Sriwanayos, P., Kongkumnerd, J., Chaweepack, T. and Hirono, I. (2014) Development of PCR diagnosis for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Pathol* 49, 159-164.

Yang, Y.T., Chen, I.T., Lee, C.T., Chen, C.Y., Lin, S.S., Hor, L.I., Tseng, T.C., Huang, Y.T., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S., Wang, H.C. and Lo, C.F. (2014) Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc* 2, e00816-14.



図 左が AHPND のバナメイエビで肝臓が白くみえる。右は健康なバナメイエビ。(廣野育生博士提供)



# 伝染性筋壊死症 Infectious myonecrosis (IMN)

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：伝染性筋壊死症  
英名：Infectious myonecrosis (IMN)
- ② 病原体：Infectious myonecrosis virus (IMNV) (トチウイルス科トチウイルス属)。

### (2) 地理的分布

- ① 初発国：ブラジル東北部
- ② 分布域：インドネシア、東南アジア

### (3) 宿主域

- ① 自然発病：バナメイエビ (ホワイトレッグシュリンプ、シロアシエビ；*Litopenaeus vannamei*)
- ② 実験感染：ウシエビ (ブラックタイガー；*Penaeus monodon*)、ブルーシュリンプ (*L. stylirostris*) が不顕性感染を示す。自然での発症はバナメイエビであるので、この種の移動には特に注意が必要である。
- ③ キャリア：生残エビはキャリアとなると考えられる (未確認)
- ④ ベクター：海鳥
- ⑤ その他：ホワイトレッグシュリンプの稚エビ、未成エビで重篤。全ステージで感染。

### (4) 発生の特徴

- ① 2002年ブラジル北東部の Piauí 州で初めて発生<sup>1)</sup>。
- ② 2003年の1月～3月の雨期に被害が近隣州へ拡大<sup>4)</sup>。
- ③ 2004年までにほとんどの北東ブラジル地域 (Pernambuco 州まで) に拡大<sup>4)</sup>。
- ④ 2006年5月、インドネシアの東ジャワ州シスボンド地区においてアジアで初めて発生<sup>3)</sup>。
- ⑤ 水温、塩分濃度などの環境変化や網入れなどのストレス負荷直後に発症し高率で死亡する。
- ⑥ ストレス負荷直前までは盛んに摂餌し、消化管が餌で満たされていることもある。
- ⑦ ストレス直後の高死亡率が数日間継続することもある。

### (5) 外観症状

- ① 体側筋の点状あるいは広範囲な壊死による白濁が観察される (写真1)。末端節腹部および尾扇部が白濁することがしばしばある。
- ② 腹節の筋肉は本疾病以外のさまざまな原因で白濁する。クルマエビ類やオニテナガ

エビ (*Macrobrachium rosenbergii*) のホワイトテイル病は本疾病と似た外観症状を呈するが、本疾病とは異なるそれぞれ別のノダウイルスにより起こる。また、急性に本疾病に罹患しても必ずしも肉眼的に明確に筋肉が白濁しない場合もあり、PCR によって判断する必要がある。

## (6) 剖検所見

リンパ様器官の肥大 (通常の 3 ~ 4 倍の大きさ) が認められる。

## (7) 消毒

文献情報はないが、塩素剤等通常の消毒剤により本ウイルスの消毒は可能であると思われる。OIE マニュアル (2015) では卵や幼生の消毒と海水での洗浄を推奨しているが、我が国では甲殻類に対し認可された消毒剤はないため、記載しないほうがよいと考える。

## (8) 防除法

有効な予防、治療法は知られていない。

# 2 検体採取

## (1) 検体の収集

- ① RT-PCR のための検体：少なくとも 10 尾の瀕死エビまたは死亡直後の個体、ないしは 1. (5) に示すような本疾病に特徴的な外観症状を示すものを選ぶ。
- ② 病理組織検査のための検体：活着している 5-10 尾の病エビないし、1. (5) に示すような本疾病に特徴的な外観症状を示すものを選ぶ。
- ③ 被検個体の採取場所、採取日時、海水温、年齢、死亡状況、他からの種苗の移入の有無など、疫学的情報を記録する。

## (2) 検査のための試料の採材

- ① RT-PCR のための採材：新鮮な血球 (血リンパ)、筋肉組織、あるいはリンパ様器官。あるいは小さな個体であればエビ全体を材料とする。
- ② 病理組織検査のための採材：大型のエビの場合は、中腸腺前方、中腸線内部 (いわゆる胃の内腔)、前方の腹節、後方の腹節それぞれに Davidson の固定液を注射する。エビ体重の 5-10% 程度の固定液を注射する。注射後ただちに尾部から解剖バサミで甲殻に切れ目を入れる。切れ目は腹節では真横に、頭胸甲では斜め上に、内部臓器を傷つけないように注意しながら眼の付け根付近まで入れる。これは固定液を浸透しやすくするためである。12g より大型のエビでは、さらに頭胸甲と腹節の境目および腹部中央に背側から体軸と垂直に体の半分程度まで切れ目を入れる。その後速やかに固定液に投入し、1 日程度固定する。注射が不可能な小型のエビの場合は体全体を直接固定液に投入して固定する 2)。固定液はサンプリング直前まで冷蔵庫か氷中で冷やしておき、サンプルを投入したら 30 分程度はゆっくり攪拌する。その後一晩置いた後、70% エタノールで 1 時間程度洗い、さらに新しい 70% エタノールに置換して保存する。

・ Davidson の固定液の組成

95% エチルアルコール	33 mL
市販のホルマリン原液	22 mL
100% 酢酸 (氷酢酸)	11.5 mL
蒸留水	33.5 mL
合計	100 mL

なお、上記は全量を 100 に合わせるためのもので、簡便に 95% エタノール：ホルマリン原液：氷酢酸：蒸留水を体積比 3:2:1:3 の割合で混合してもよい。作製した本固定液は 4℃ で保存すれば 2 ヶ月程度は使用可能である。

### 3. 診断手順

#### (1) RT-PCR (1st PCR)

- ① 新鮮なエビの血球 (血リンパ)、筋肉組織、あるいはリンパ様器官から RNA を抽出する。スピンカラムを用いたキットで十分 RNA が抽出できない場合 (特に死亡個体から抽出する場合など)、フェノール・クロロホルム法 (TRIZol (Inbitrogen)、RNAiso Pllus (Takara) 等) によって十分量の RNA が抽出できる場合がある。その際、筋肉組織、あるいはリンパ様器官は約 10-20 mg を、血リンパは 50-100  $\mu$ L を採取する。血リンパからフェノール・クロロホルム法で RNA を抽出する場合、しばしば溶液中で血リンパがダマになって固まり、うまくいかないことがある。これを避けるために、注射筒に入った血リンパを遠心チューブの抽出溶液に混和するとき、注射針の先から溶液中に血リンパを勢いよく押し出して一様に懸濁させるとよい。

注意：10% のクエン酸ソーダは通常血リンパの血液凝固阻止剤として用いられるが、逆転写反応または PCR に影響を与えるおそれがある。したがって、クエン酸ソーダによる PCR の反応阻害が疑われた場合は、テンプレートに使用した血リンパ原液を 10 倍に水で希釈して使用することも可能であるが、核酸も希釈されるデメリットがある。クエン酸ソーダを使用しないのが最善であるが、その場合、凝固を防ぐために血リンパ採取開始から 5 分以内に抽出作業を開始する。

- ② 陰性対照として、可能であれば IMN 陰性の組織を使用する。困難な場合には蒸留水やバッファを用いる。陽性対照としては可能であれば IMN 陽性の組織を用いる。困難な場合には、IMN の DNA テンプレートを陽性対照とする。

- ③ プライマーおよび反応条件

・プライマー

4587F : 5'- CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA -3'

4914R : 5'- ACT-CGG-CTG-TTC-GAT-CAA-GT -3'

増幅産物サイズ ; 328 bp

・反応液組成 (1 検体分)

(試薬)	(容量)	(終濃度)
5xEZ バッファ	5.0 $\mu$ L	1x
rTth DNA polymerase (2.5units/ $\mu$ L)	1.0 $\mu$ L	0.1units/ $\mu$ L
dNTP mix (10mM each)	3.0 $\mu$ L	300 $\mu$ M
酢酸マンガン (25mM)	2.5 $\mu$ L	2.5mM
プライマー (各 10 $\mu$ M)	各 1.0 $\mu$ L	各 0.62 $\mu$ M
テンプレート核酸 (1-50ng/reaction)	1-5 $\mu$ L	
蒸留水	6.5 $\mu$ L	
合計	25.0 $\mu$ L	

- 使用酵素：rTth Enzyme および 5 × EZ Buffer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific)

- RT-PCR 反応条件

逆転写	60°C	30min.
初期の変成	95°C	2min.
以下、変成～伸長を	39 サイクル	
変成	95°C	45sec.
アニーリングおよび伸長	60°C	45sec.
最後の伸長	60°C	7min.

上記酵素および反応条件は OIE マニュアル (2015) で推奨されている方法である。推奨酵素自体は我が国で市販されているものの、これを用いたキットは現在日本では販売されていない。しかし SuperScript III など他の酵素(キット)を使用する場合は、酵素の温度耐性の違いから上記プロトコルでは感度が大きく落ちる可能性がある。下記に SuperScript III を用いた場合の反応液組成と反応条件の例を示す。

- 反応液組成 (1 検体分)

(試薬)	(容量)	(終濃度)
2 × reaction mix	12.5 $\mu$ L	1x
(0.4 mM of each dNTP, 3.2 mM MgSO <sub>4</sub> )		
Superscript III RT/Platinum <i>Taq</i> mix	1.0 $\mu$ L	1 unit/ $\mu$ L
プライマー (各 100 $\mu$ M)	各 0.125 $\mu$ L	各 0.5 $\mu$ M
テンプレート核酸	2.0 $\mu$ L	
(0.005 pg-500 ng/reaction)		
蒸留水	9.25 $\mu$ L	
(全量 25 $\mu$ L にメスアップ)		
合計	25.0 $\mu$ L	

- 使用酵素キット：SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum™*Taq* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific)

- RT-PCR 反応条件

逆転写	50℃	30min.
初期の変成	95℃	2min.
以下、変成～伸長を	39 サイクル	
変成	95℃	15 sec.
アニーリング	60℃	30 sec.
伸長	68℃	45sec.
最後の伸長	68℃	2 min.

- ④ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 1.5 % アガロースゲルで電気泳動を行う。
- ⑤ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータにより塩基数 328 bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。

## (2) Nested-PCR

- ① 使用する試料；テンプレート DNA として 3. (1) 初動診断法：RT-PCR (1st PCR) の増幅産物、対照は (1) 初動診断法：RT-PCR (1st PCR) に同じ。
- ② プライマーおよび反応条件

- プライマー

4725NF : 5'- GGC-ACA-TGC-TCA-GAG-ACA -3'  
 4863NR : 5'- AGC-GCT-GAG-TCC-AGT-CTT-G -3'  
 増幅産物サイズ；139bp

- 反応液組成 (1 検体分)

(試薬)	(容量)	(終濃度)
プライマー (各 10μM)	各 1.0 μL	各 0.465μM
テンプレート DNA	0.5 μL	
蒸留水	22.5 μL	
合計	25 μL	

- 使用酵素キット：puRe *Taq* Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Bioscience, GE Healthcare #27-9558-01)

- RT-PCR 反応条件

初期の変成	95℃	2 min.
以下、変成～伸長を	39 サイクル	
変成	95℃	30 sec.

アニーリング	65°C	30 sec.	39 サイクル
伸長	72°C	30 sec.	
最後の伸長	72°C	2 min.	

上記反応条件は OIE マニュアル(2015)で推奨されている方法であり、酵素キットは原著論文による。Ex *Taq*<sup>®</sup> などの、PCR に必要な各試薬 (buffer、dNTP、酵素等) を PCR 時に混合するタイプの酵素キットを用いた場合の反応液組成と反応条件を示す。

(試薬)	(容量)	(終濃度)
10X Ex <i>Taq</i> <sup>®</sup> Buffer	2 μL	10x
TaKaRa Ex <i>Taq</i> <sup>®</sup> HS	0.1 μL	5 units/μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	1.6 μL	
プライマー (各 100μM)	各 0.1 μL	各 0.5μM
テンプレート DNA	1 μL	<500 ng/reaction
蒸留水	15.1 μL	
合計	20 μL	

・使用酵素キット：TaKaRa Ex *Taq*<sup>®</sup> Hot Start Version (Takara)

・RT-PCR 反応条件

puRe *Taq* Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Bioscience, GE Healthcare #27-9558-01) 使用時と同じ。

- ③ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 1.5 % アガロースゲルで電気泳動を行う。
- ④ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータにより塩基数 139 bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。

### (3) 病理組織学的検査

- ① 固定標本をトリミングし、各部分を常法通りパラフィンに包埋する。
- ② 切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施し、検鏡する。

以下の病変が報告されているが必ずしも本疾病に特異的なものではない。

- ・血球浸潤を伴う体側筋繊維の凝固壊死および進行した融解壊死が認められる。
- ・体側筋組織は浮腫を起こし、やがて疎な結合組織に置換される。
- ・生体防御反応と考えられる、細胞の集まった球状組織 (スフェロイド) の増生によるリンパ様器官の肥大が起こる。
- ・上記の球状組織はしばしば異所的に鰓、心臓、触角腺、腹部神経索などにも認められる。

#### 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

- ① RT-PCR 検査で陽性または擬陽性と診断された個体の試料・記録を増養殖研へ送付する。
- ② 送付するもの：臨床検査・剖検記録、PCR の泳動像写真、PCR 検査用組織試料（凍結、冷蔵あるいは 70% エタノール固定）。病理組織の場合は固定後 70% エタノールに置換した試料を送付する。

#### 5. 参考文献

- 1) Lightner D.V., Pantoja C.R., Poulos B.T., Tang K.J.F., Redman R.M., Pasos de Andrade T. & Bonami J.R. (2004): Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, 7, 85.
- 2) Bell, T. A. and Lightner, D. V. (1998): A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Allen Press, Inc. Lawrence, Kansas.
- 3) Senapin S, Phewsaiya K, Briggs M, Flegel TW. (2007): Outbreaks of myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*, 266, 32-38.
- 4) Andrade T.P.D., Srisuvan T., Tang K.F.J. & Lightner D.V. (2007): Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). *Aquaculture*, 264, 9-15.

その他の記載はすべて OIE マニュアル（2015）による。



写真 1 IMN 人為感染の写真。上段；IMNV 注射後 12 日目のシロアシエビ（ホワイトレッグシュリンプ、バナメイエビ）(L. vannamei) 瀕死個体。広範な病変による白濁が認められる。下段；対照区のバナメイエビ。(湯浅 啓 博士提供)

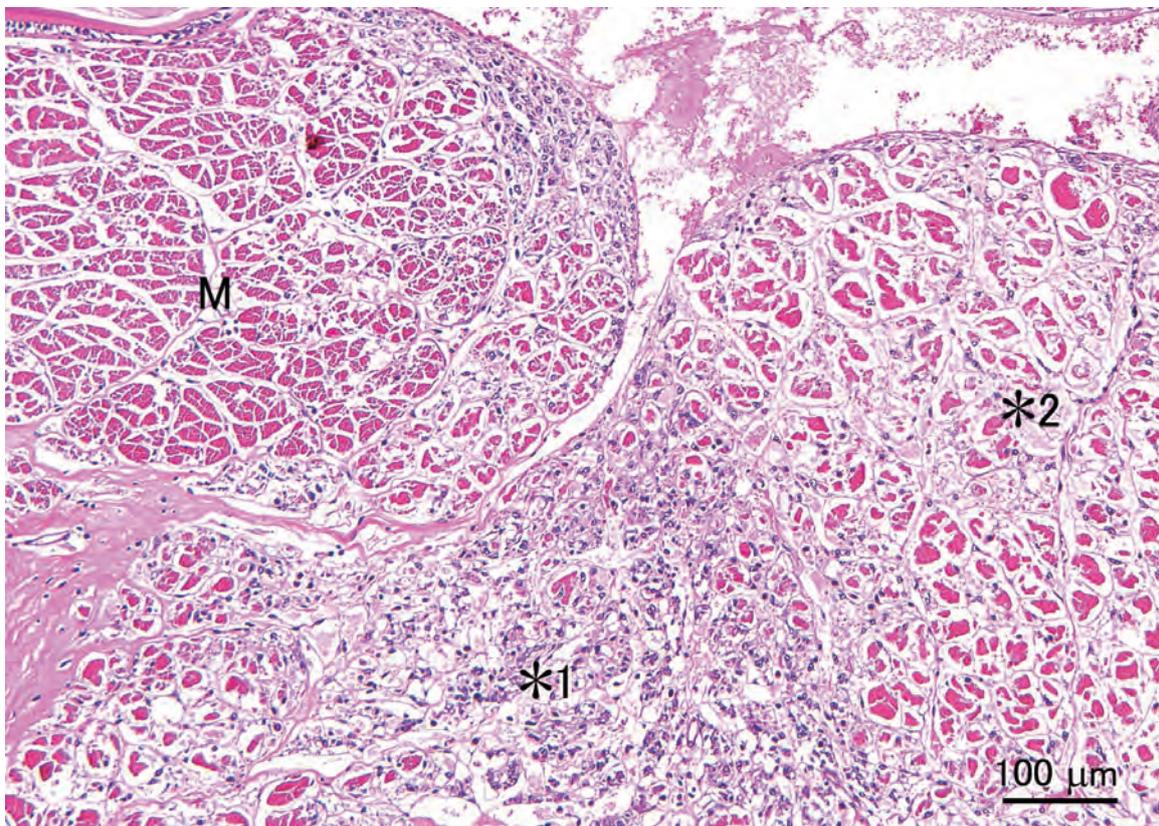


写真 2 実験感染で IMN を発症したバナメイの筋組織の横断面 (HE 染色)。M, 比較的正常な筋組織。\* 1, 血球などの宿主細胞が浸潤した病変。\* 2, 壊死した筋組織 (未だ宿主細胞の浸潤がない)。(桐生 郁也 博士提供)

# バキュロウイルス・ペナエイ感染症 Tetrahedral baculovirus

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：バキュロウイルス・ペナエイ感染症  
英名：Tetrahedral baculovirus

- ② 病原体：Baculovirus penaei (BP) (Synonyms: singly enveloped nuclear polyhedrosis virus from Penaeus vannamei, PvSNPV)

本ウイルスは2016年7月現在 International Committee on Taxonomy of Viruses の HP において記載されておらず、分類が定まっていないものと思われる。

### (2) 地理的分布

下記の3つの地域で見られ、それぞれの地域特有の系群がある。

- ① 南西大西洋およびアメリカ合衆国メキシコ湾岸とカリブ海諸国
- ② 南北アメリカ大陸太平洋沿岸
- ③ ハワイ

### (3) 宿主域

- ① 自然発病：以下の属の多くの種で発生報告がある；バナメイエビ属 (*Litopenaeus*) , アステカエビ属 (*Farfantepenaeus*) , インドエビ属 (*Fenneropenaeus*) , フトミゾエビ (*Melicertus*) , ウシエビ属 (*Penaeus*) 属, *Trachypenaeus* 属, *Protrachypene* 属
- ② キャリア：慢性的に感染した宿主がキャリアとなる。
- ③ ベクター：実験的にはアルテミアやワムシがベクターとなることが報告されている。

### (4) 発生の特徴

卵とノープリウス幼生を除くすべての発達段階で感染するが、プロトゾエア、ミシス、初期のポストラバが最も容易に感染し、死亡率が高い。稚エビ以降では死亡率は高くないが、成長不良や生残率の低下が見られる。感染は、感染した組織（共食い）、糞、包埋体、あるいはウイルスを含む池底の有機物等の摂食あるいは水を介した水平感染による。感染群のウイルス保有率は1%未満から100%まで様々である。

### (5) 外観症状

活力が低下する以外に特徴的な所見に乏しい。

### (6) 剖検所見

プロトゾエア、ミシス、初期のポストラバにおいては、重度の感染個体で

は中腸に白濁が見られることが多いが、稚エビや成エビでは特徴的な所見はない。

### (7) 消毒

消毒剤に関する文献情報はないが BP は塩素剤等の通常の消毒剤で消毒可能と思われる。また、低 pH (pH3 で 30 分)、熱 (60-90℃で 10 分)、紫外線照射 (累積線量  $7.08 \times 10^6 \mu\text{Wsec/cm}^2$ ) により不活化されるという報告がある。

### (8) 防除法

受精卵と仔エビの消毒が効果的とされるが我が国でエビの卵稚仔を対照にして承認された消毒薬はない。垂直感染をさけるため、卵は清浄な海水でよく洗浄し、卵や幼生が親エビの糞便等による汚染を受けないようにする。

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

- ① 押しつぶし標本のための検体：10 尾程度の活力が低下した病エビまたは死亡直後の個体を採取する。あるいは排泄物を採取する。
- ② PCR のための検体：少なくとも 10 尾の病エビまたは死亡直後の個体を採取する。
- ③ 病理組織検査のための検体：5-10 尾の病エビを選ぶ。死亡個体は病理組織検査には適さない。
- ④ 被検個体の症状、採取場所、採取日時、海水温、年齢、体重、死亡状況、他からの種苗の移入の有無など、疫学的情報を記録する。

### (2) 検査のための試料の採材

- ① 押しつぶし標本のための採材：  
肝臓や中腸。排泄物はそのまま用いる。
- ② PCR のための採材：  
病エビの肝臓および中腸
- ③ 病理組織検査のための採材<sup>1)</sup>：

大型のエビの場合は、中腸腺前方、中腸線内部 (いわゆる胃の内腔)、前方の腹節、後方の腹節それぞれに Davidson の固定液を注射する。エビ体重の 5-10% 程度の固定液を注射する。注射後ただちに尾部から解剖バサミで甲殻に切れ目を入れる。切れ目は腹節では真横に、頭胸甲では斜め上に、内部臓器を傷つけないように注意しながら眼の付け根付近まで入れる。これは固定液を浸透しやすくするためである。12g より大型のエビでは、さらに頭胸甲と腹節の境目および腹部中央に背側から体軸と垂直に体の半分程度まで切れ目を入れる。その後速やかに固定液に投入し、1 日程度固定する。注射が不可能な小型のエビの場合は体全体を直接固定液に投入して固定する<sup>1)</sup>。固定液はサンプリング直前まで冷蔵庫か氷中で冷やしておき、サンプルを投入したら 30 分程度はゆっくり攪拌

する。その後一晩置いた後、70%エタノールで1時間程度洗い、さらに新しい70%エタノールに置換して保存する。

・Davidsonの固定液の組成

95%エチルアルコール	33 mL
市販のホルマリン原液	22 mL
100%酢酸（氷酢酸）	11.5 mL
<u>蒸留水</u>	<u>33.5 mL</u>
合計	100 mL

なお、上記は全量を100に合わせるためのもので、簡便に95%エタノール：ホルマリン原液：氷酢酸：蒸留水を体積比3:2:1:3の割合で混合してもよい。作製した本固定液は4℃で保存すれば2ヶ月程度は使用可能である。

### 3. 診断手順

#### (1) 肝臓・中腸の観察

- ① 半海水または1%食塩水を用いて、エビ幼生、稚エビ・成エビの肝臓や中腸の押しつぶし標本を作成し、新鮮なまま顕微鏡で観察する。
- ② 排泄物を用いる方法は、稚エビあるいは成エビ、特に親エビの非破壊検査で有用である。検査用のエビを別の水槽に移し、数時間おいて排泄物を集め、直接ウエットマウント標本を作製して検鏡する。
- ③ 観察結果：押しつぶし標本では、肝臓、中腸の上皮細胞の核内に単独もしくは複数個が固まりとなった四面体型（ピラミッド型、通常3角形に見える）の包埋体（大きさ0.1μm以下から20μm程度）を確認する（写真1）。

#### (2) PCR 方法1

- ① 採取したエビ試料から市販のDNA抽出キットなどにより核酸を抽出する。抽出法は使用するキットのマニュアルに従う。
- ② PCRに際して、テンプレートとして次の対照を用いる。
  - ・陰性対照：BP陰性エビ組織から同様な方法で抽出したDNA
  - ・陽性対照：BP陽性エビ組織から同様な方法で抽出したDNA（陰性のエビ組織に陽性対照cDNAプラスミド等を加えたものから抽出してもよい）
  - ・テンプレートなし。
- ③ プライマーおよび反応条件
  - ・プライマー
    - BPA：5'-GAT-CTG-CAA-GAG-GAC-AAA-CC-3'
    - BPF：5'-TAC-CCT-GCA-TTC-CTT-GTC-GC-3'
  - 増幅産物サイズ；196bp

・反応液組成（1検体分）：Takara Ex Taq<sup>®</sup> Hot Start Version を用いた時の例を示

す。本キットでは  $MgCl_2$  はキットのバッファに含まれている。

(試薬)	(容量)	(終濃度)
10x PCR バッファ	2 $\mu$ L	1x
Takara Ex <i>Taq</i> <sup>®</sup>	0.1 $\mu$ L	
dNTP(4 種とも含む)	1.6 $\mu$ L	
プライマー (各 50 $\mu$ M)	各 0.2 $\mu$ L	各 0.5 $\mu$ M
検体 DNA	1.0 $\mu$ L	
蒸留水	14.9 $\mu$ L	
合計	20 $\mu$ L	

- 使用酵素キット：Takara Ex *Taq*<sup>®</sup> Hot Start Version (Takara)
- PCR 反応条件

初期の変成	95 $^{\circ}$ C	3min.
以下、変成～伸長を	30 サイクル	
変成	94 $^{\circ}$ C	30sec.
アニーリング	60 $^{\circ}$ C	30sec.
伸長	72 $^{\circ}$ C	1min.
最後の伸長	72 $^{\circ}$ C	5min.

- ④ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 2% 程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。
- ⑤ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータによりサイズが 196bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。

## (2) PCR 方法 2

- ① 使用する試料や対照は (1)PCR 方法 1 に同じ。
- ② プライマーおよび反応条件

- プライマー

6581 : 5'-TGT-AGC-AGC-AGA-GAA-GAG-3'

6582 : 5'-CAC-TAA-GCC-TAT-CTC-CAG-3'

増幅産物サイズ ; 644bp

- 反応液組成 (1 検体分) : Takara Ex *Taq*<sup>®</sup> Hot Start Version を用いた時の例を示す。本キットでは  $MgCl_2$  はキットのバッファに含まれている。

(試薬)	(容量)	(終濃度)
10x PCR バッファ	2 $\mu$ L	1x
Takara Ex <i>Taq</i> <sup>®</sup>	0.1 $\mu$ L	
dNTP(4 種とも含む)	1.6 $\mu$ L	
プライマー (各 100 $\mu$ M)	各 0.2 $\mu$ L 各 1 $\mu$ M	

検体 DNA	1 $\mu$ L
蒸留水	14.9 $\mu$ L
合計	20 $\mu$ L

・使用酵素キット：Takara Ex *Taq*<sup>®</sup> Hot Start Version (Takara)

・PCR 反応条件

初期の変成	95 $^{\circ}$ C	5min.
以下、変成～伸長を	35 サイクル	
変成	95 $^{\circ}$ C	30sec.
アニーリング	65 $^{\circ}$ C	30sec.
伸長	72 $^{\circ}$ C	1min.
最後の伸長	72 $^{\circ}$ C	7min.

- ④ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 1.5% 程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。
- ⑤ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータにより塩基数 644bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。

### (3) 病理組織学的検査

- ① 固定標本をトリミングし、各部分を常法通りパラフィンに包埋する。
- ② 切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施し、検鏡する。肝臓あるいは中腸の上皮細胞の核内に四面体構造で明るい赤色に染色された包埋体が観察される(写真 2、3)。これらの核ではクロマチンの減少や核の縁辺部への濃縮も観察される。なお、グラム染色 (Brown and Brenn の組織学用) も有用である。グラム染色では包埋体の染色性が周囲と異なるため包埋体が少ない標本では観察しやすい。

## 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

- ① ウエットマウント標本で包埋体が確認あるいは疑われた個体、または、PCR 検査で陽性または疑陽性と診断された個体の試料・記録を増養殖研究所へ送付する。
- ② 送付するもの：臨床検査・剖検記録、ウエットマウント標本あるいは写真、PCR の泳動像写真、PCR 検査用組織試料 (凍結、冷蔵あるいは 70% エタノール固定)。病理組織の場合は固定後 70% エタノールに置換した試料を送付する。

## 5. 参考文献

- 1) Bell, T. A. and Lightner, D. V. (1998): A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Allen Press, Inc. Lawrence, Kansas.  
その他の記載はすべて OIE マニュアル (2016) による。

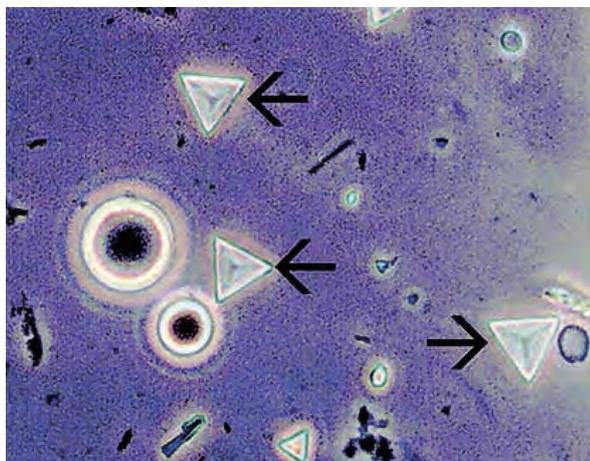


写真1 BPに冒されたホワイトレグシュリンプの排泄物のウェットマウント標本。四面体の包埋体(矢印)が観察される。(D. V. Lightner 博士提供)

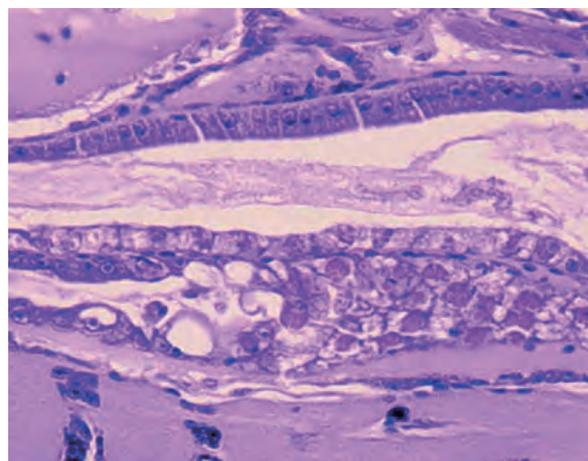


写真2 BPに冒されたホワイトレグシュリンプのポストラーバの病理組織像(HE染色、低倍)。(D. V. Lightner 博士提供)

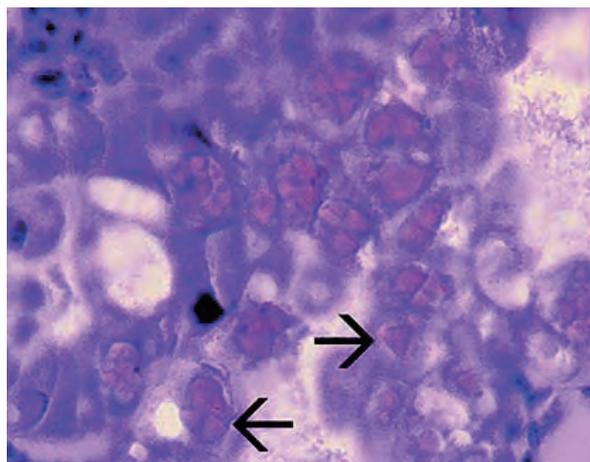


写真3 BPに冒されたホワイトレグシュリンプのポストラーバの病理組織像(HE染色、高倍)。エオシンに染まった包埋体(矢印)が観察される。(D. V. Lightner 博士提供)

# エビの潜伏死病

## Covert mortality disease of shrimp (CMD)

### 1. 疫学

#### (1) 病名と病原体

- ① 病名：エビの潜伏死病  
英名：Covert mortality disease of shrimp (CMD)
- ② 病原体：Covert mortality nodavirus (CMNV)(ノダウイルス科 (Nodaviridae) Alphanodavirus の未分類ウイルス)

#### (2) 地理的分布

- ① 初発国：中国
- ② 分布域：中国。非公式にはメキシコ、エクアドル、ベトナム、タイ、インドネシアにおいてウイルスが検出されているという情報がある。

#### (3) 宿主域

- ① 自然発病：バナメイエビ（ホワイトレグシュリンプ、シロアシエビ；*Litopenaeus vannamei*）、クルマエビ (*Marsupenaeus japonicas*)、コウライエビ (*Fenneropenaeus chinensis*)。
- ② 実験感染：(情報なし)
- ③ キャリア：(情報なし)
- ④ ベクター：(情報なし)
- ⑤ その他：注射及び経口投与による感染試験では、それぞれ 100%、85% の死亡が確認された。

#### (4) 発生の特徴

感染個体は、池の底深くに隠れ、浅瀬や表層にはほとんど現れない。池入れ後、60～80日間、毎日死亡が確認され、累積死亡率は80%に及ぶ。水温が28℃を超えると死亡率が増加する。

#### (5) 外観症状

殻の軟化、成長不良及び横紋筋の白色化。

#### (6) 剖検所見

変色（白色、赤色、灰色）を伴う肝臓の萎縮や壊死および導管の配列不整、胃や腸の空洞化、横紋筋の凝固壊死。

## (7) 消毒

文献情報はないが、塩素剤等通常の消毒剤で本ウイルスは不活化されることが考えられる。

## (8) 防除法

情報なし

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

- ① 少なくとも 10 尾の瀕死エビまたは当該疾病の外観症状を示す活エビを採取する。
- ② 被検魚の収集から採材まではできるだけ速やかに行うことが望ましく、可能であれば発生現場で臓器試料を摘出する。
- ③ 被検体を検査機関に搬入する場合は、生きたままビニール袋などに入れて酸素パッキングするか、活魚ポンプによる通気を行い、水温変動に注意して搬送する。
- ④ 活エビの搬送が困難な場合、あるいは死エビしか入手できない場合は、なるべく新鮮な個体を採取し、被検体を個体ごとに無菌の密閉容器に包装し、氷冷または冷蔵状態で、12 時間以内に搬送する。搬送の際に、被検体が凍結することのないように注意する。
- ⑤ 搬送に長時間を要する場合は、被検体の固定標本を搬送する。

### (2) 検査のための試料の採材

#### <病理診断>

病理診断用の組織の固定には検体の 10 倍量の Davidson 固定液を用いる。

#### Davidson 固定液組成 (1L)

330 mL	95% エタノール
220 mL	ホルマリン原液 (37-39% のホルムアルデヒド飽和溶液)
115 mL	氷酢酸
335 mL	滅菌海水もしくは蒸留水

- a. 幼生あるいはポストラバ (ツベルクリン用注射器を使えないサイズ)  
メッシュあるいはパスツールピペットで被検体を採取し、直接検体の 10 倍量の固定液に入れ、12 から 24 時間固定後、70%エタノールに置換する。
- b. ポストラバあるいは小型の稚エビ (ツベルクリン用注射器を使えないサイズ)  
ニードルもしくはピンセットにて検体の殻に穴をあけ、迅速に 10 倍量の固定液に入れ、12 から 24 時間固定後、50 ~ 70%エタノールに置換する。
- c. 稚エビあるいは親エビ  
被検体の 5 ~ 10% 重量の固定液を生きた状態で注射する。ニードルの径は検体のサイズによって変える (小型の稚エビであれば 27 ゲージ程度のものを用いる)。

肝臓を観察するため臓器を傷つけないように、周辺の数か所から肝臓の色が白からオレンジ色に変色するまで固定液を注射する。さらに、その周辺の部位から頭胸腔内および腹部にも注射し固定する。注射による固定直後には第六腹節から噴口部にかけて殻に切り込みを入れる。頭胸部および腹部は側面から背中線まで切開する。

d. 12g 以上のエビ

上記、注射による固定ののち、腹部を水平方向に頭胸部の付け根まで2等分する。

e. 大型のエビ

上記、注射による固定ののち、肝臓を摘出し、組織の10倍量の固定液に浸ける。室温で24から72時間固定後、70%エタノールに置換する。

< RT-PCR 検査 >

a. 全長 2cm 以下の幼エビ

頭胸部および腹部を試料とする。体表を消毒後、眼柄より前端部（眼柄含む）を除去し、頭胸部と腹部を切断し、それぞれ被検体とする。

b. 全長 2cm ～ 6cm の稚エビ

肝臓を含む頭胸部および腹部を試料とする。体表を消毒後、肝臓の前部は除去し、頭胸部と腹部を切断し、それぞれ被検体とする。サイズに従って腹部の採取量を調整する（25 mg 程度ずつ）。

c. 全長 6cm 以上のエビ

肝臓および腹部より採取した筋肉を試料とする。可能であればリンパ用器官も採取する。

RNA 抽出までは、好ましくは RNAlater、あるいは 70% ～ 100% エタノール中で保存する。これらの試薬が無い場合は冷凍（-80℃）にて保存する。

### 3. 診断手順

① 初動診断法：

(ア) 病理組織の観察

使用部位；横紋筋、肝臓およびリンパ様器官を採取する。

固定；Davidson 液で固定しヘマトキシリン・エオジン染色を行う。

病変の観察；横紋筋の凝固壊死、肝臓およびリンパ様器官の細管上皮の好酸性封入体、筋肉およびリンパ様器官の核濃縮を観察する。

(イ) RT - PCR（逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法）

(a) 材料；RT - PCR 用に採取した肝臓、横紋筋あるいはリンパ様器官から RNA

を抽出する。RNA 熱変性；65℃で 5 分変性後急冷。

(b) PCR 法使用機器（サーマルサイクラー、マイクロピペット、エッペンドルフチューブ、電気泳動装置、トランスイルミネーターなど）および試薬 (RT-PCR キット\*)

\* RT-PCR キット：SuperScript<sup>®</sup> III One-Step RT-PCR System with Platinum<sup>™</sup>Taq (インビトロジェン社) 推奨、

・プライマー

CMNV-7F1 5'- AAA TAC GGC GAT GAC G -3'  
 CMNV-7R1 5'- ACG AAG TGC CCA CAG AC -3'  
 増幅産物サイズ 619 bp

・反応液組成 (1 検体分)

2X Reaction Mix	25 μL
dDW(滅菌超純水)	20 μL
CMNV-7F1 (10pmol/ μL)	1 μL
CMNV-7R1 (10pmol/ μL)	1 μL
SuperScript <sup>™</sup> III RT/Platinum <sup>™</sup> TaqMix	2 μL
検体 (RNA)	1 μL
合 計	50 μL

・PCR 反応条件

逆転写反応	45℃	30min.
初期の変成	94℃	2min.
以下、変成～伸長を 35 サイクル		
変成	94℃	30sec.
アニーリング	45℃	30sec.
伸長	72℃	40sec.
最後の伸長	72℃	7min.
保持	4℃	∞

(c) RT-PCR 反応液 5 μL を採取し、電気泳動用サンプル緩衝液と混合後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカールとともに 1.5% 程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。

(d) 臭化エチジウム存在下、トランスイルミネーターにより分子量 619bp の増幅産物のバンドの有無を観察する。

② 最終診断法：Nested-PCR 法

i) 1st PCR；初動診断法①(イ)と同じ。

ii) 2nd PCR

材料；1st PCR の増副産物、TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> など

・プライマー；

CMNV-7F2: 5'-CAC AAC CGA GTC AAA CC -3'

CMNV-7R2: 5'-GCG TAA ACA GCG AAG G-3'

増副産物サイズ；165bp

・反応液組成 (1 検体分)

dNTPMixture	4 μL
× 10 Buffer	5 μL
dDW(滅菌超純水)	37 μL
CMNV-7F2 (10pmol/ μL)	1 μL
CMNV-7R2 (10pmol/ μL)	1 μL
Takara ExTaq <sup>®</sup>	1 μL
1st PCR 産物	1 μL
合 計	50 μL

・PCR 反応条件

初期の変成	94℃	4min.
以下、変成～伸長を	30 サイクル	
変成	94℃	20sec.
アニーリング	50℃	20sec.
伸長	72℃	20sec.
最後の伸長	72℃	7min.
保持	4℃	∞

#### 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

RT-PCR 検査で陽性または擬陽性と診断された個体の試料・記録を増養殖研へ送付する。生鮮個体を送付する場合は凍結し、冷凍便で輸送する。病理診断用の固定標本は70%エタノールに置換後、冷蔵で輸送する。遺伝子検査用の検体は、RNAlater あるいは70%エタノールに入れ、冷蔵で輸送する。

#### 5. 参考文献

World Organisation for Animal Health (OIE): Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, CHAPTER 2.3.0., GENERAL INFORMATION, [http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=chapitre\\_general\\_information\\_2\\_2.htm](http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=chapitre_general_information_2_2.htm)

Zhang Q, Liu Q, Liu S, Yang H, Liu S, Zhu L, Yang B, Jin J, Ding L, Wang X, Liang Y, Wang Q and Huang J. (2014): A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. *J Gen Virol.*, 95(12), 2700-2709.

---

Bell, T. A. and Lightner, D. V. (1998): A handbook of normal penaeid shrimp histology.  
World Aquaculture Society, Allen Press, Inc. Lawrence, Kansas.

# 鰓随伴ウイルス病 Gill-associated virus disease (GAV)

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：鰓随伴ウイルス病  
英名：Gill-associated virus disease (GAV)
- ② 病原体：Gill-associated virus (genotype 2) (ロニウイルス科 オカウイルス属)。

イエローヘッド複合ウイルス群(ロニウイルス科 オカウイルス属)には、8つの遺伝子型が知られ、gill-associated virus (GAV)はそのうちの遺伝子型2である。YHVは遺伝子型1であり、イエローヘッド病の病原体である。ウシエビにおいてYHV(遺伝子型1)は、ポストラーバ(PL)15以降のものが感染しやすい。その他4つの遺伝子型(3~6)は、東アフリカ、アジアおよびオーストラリアの健康なウシエビで一般的に検出されるが、イエローヘッド病とは関連がない。遺伝子型7および8は病気のエビから発見されたが病原性は不明である。YHVとGAVはここに記載した nested PCRにより区別できる。

### (2) 地理的分布

- ① 初発国：オーストラリア
- ② 分布域：タイ、ベトナム

### (3) 宿主域

- ① 自然発病：ウシエビ (*Penaeus monodon*)
- ② 実験感染：ブラウンタイガープローン (*P. esculentus*)、バナナエビ (*Fenneropenaeus merguensis*)、クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*)でも起こり、死亡を引き起こす。実験的に感染可能な宿主範囲は広いが、自然での発症はウシエビ(ブラックタイガー) (*P. monodon*)であるので、この種の移動には特に注意が必要である。
- ③ キャリア：自然下では、本ウイルスに感染したウシエビ (*P. monodon*)。実験下では、ブラウンタイガープローン (*P. esculentus*)、バナナエビ (*F. merguensis*)、クルマエビ (*M. japonicus*)が宿主となることが明らかになっているため、これらのエビ類もキャリアになる可能性がある。
- ④ ベクター：情報なし
- ⑤ その他：クルマエビにおいて本ウイルスは、20 g以上の大きな個体は、6～13 gの小さな個体よりも感受性が低い。感染要因について、垂直感染は雌雄どちらを介しても起こり、卵及び精子表面に病原体が付着していること及び受精卵の周りの組織が感染していることが要因であると考えられている 1)。人為感染では、病エビの組織からの抽出物を濾過し細菌を取り除いたものを注射すると感染が成立する 2)。

#### (4) 発生の特徴

- ① オーストラリアでは本病によるウシエビの死亡が報告されている。タイ、ベトナムでは発症は報告されていないが、健康なウシエビから本ウイルスが検出されている。
- ② オーストラリアでは、天然のウシエビの有病率が 100%に達するところもある<sup>3)</sup>。オーストラリアのウシエビ養殖場では本疾病の感染により、死亡率が 80%に達することがある<sup>4)</sup>。
- ③ 注射により実験感染させたウシエビ及びクルマエビの死亡率は 100%であった<sup>2)</sup>。
- ④ 実験感染を耐過したブラウンタイガープローンは、少なくとも 50 日間の慢性的な感染が続く<sup>5)</sup>。
- ⑤ 水面近くや池の端を遊泳する。摂餌しなくなる。

#### (5) 外観症状

胴体及び脚が赤くなる。

#### (6) 剖検所見

鰓のピンク色から黄色への退色が認められる。

#### (7) 消毒

情報はないが、通常の殺菌剤で不活化できるものと思われる。

#### (8) 防除法

有効な予防、治療法は知られていない。

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

- ① RT-PCR のための検体：少なくとも 10 尾の瀕死エビまたは死亡直後の個体、ないしは 1. (5) に示すような本疾病に特徴的な外観症状を示すものを選ぶ。
- ② 病理組織検査のための検体：活着している 5-10 尾の病エビないし、1. (5) に示すような本疾病に特徴的な外観症状を示すものを選ぶ。
- ③ 被検個体の採取場所、採取日時、海水温、年齢、死亡状況、他からの種苗の移入の有無など、疫学的情報を記録する。

### (2) 検査のための試料の採材

- ① RT-PCR のための採材：新鮮なリンパ様器官あるいは鰓。あるいは小さな個体であればエビ全体を材料とする。
- ② 病理組織検査のための採材：大型のエビの場合は、中腸腺前方、中腸線内部（いわゆる胃の内腔）、前方の腹節、後方の腹節それぞれに Davidson の固定液を注射する。エビ体重の 5-10% 程度の固定液を注射する。注射後ただちに尾部から解剖バサミで甲殻に切れ目を入れる。切れ目は腹節では真横に、頭胸甲では斜め上に、内部臓器を傷つけないように注意しながら眼の付け根付近まで入れる。これは固定液を浸透しや

すくするためである。12g より大型のエビでは、さらに頭胸甲と腹節の境目および腹部中央に背側から体軸と垂直に体の半分程度まで切れ目を入れる。その後速やかに固定液に投入し、1 日程度固定する。注射が不可能な小型のエビの場合は体全体を直接固定液に投入して固定する 6)。固定液はサンプリング直前まで冷蔵庫か氷中で冷やしておき、サンプルを投入したら 30 分程度はゆっくり攪拌する。その後一晩置いた後、70% エタノールで 1 時間程度洗い、さらに新しい 70% エタノールに置換して保存する。

• Davidson の固定液の組成

95% エチルアルコール	33 mL
市販のホルマリン原液	22 mL
100% 酢酸 (氷酢酸)	11.5 mL
蒸留水	33.5 mL
合 計	100 mL

なお、上記は全量を 100 に合わせるためのもので、簡便に 95% エタノール：ホルマリン原液：氷酢酸：蒸留水を体積比 3:2:1:3 の割合で混合してもよい。作製した本固定液は 4℃で保存すれば 2 ヶ月程度は使用可能である。

### 3. 診断手順

#### (1) RT-PCR (1st PCR)

- ① キットや試薬のマニュアルに従って、新鮮なエビのリンパ様器官あるいは鰓から RNA を抽出する。スピンカラムを用いたキットで十分 RNA が抽出できない場合 (特に死亡個体から抽出する場合など)、フェノール・クロロホルム法 (TRIZol (Inbitrogen)、RNAiso Plus (Takara) 等) によって十分量の RNA が抽出できる場合がある。その際、リンパ様器官あるいは鰓は約 10-20 mg を採取する。
- ② 陰性対照として、可能であれば GAV 陰性の組織を使用する。困難な場合には蒸留水やバッファを用いる。陽性対照としては可能であれば GAV 陽性の組織を用いる。困難な場合には、GAV の DNA テンプレートを陽性対照とする。
- ③ プライマーおよび反応条件

• プライマー (YHV および GAV 共通。)

GY1 : 5'-GAC-ATC-ACT-CCA-GAC-AAC-ATC-TG-3'

GY4 : 5'-GTG-AAG-TCC-ATG-TGT-GTG-AGA-CG-3'

増幅産物サイズ ; 794 bp

• 反応液組成 (1 検体分)

(試薬)	(容量)	(終濃度)
2 × reaction mix	12.5 μL	1x
(0.4 mM of each dNTP, 3.2 mM MgSO <sub>4</sub> )		

Superscript III RT/Platinum™ <i>Taq</i> mix	1.0 μL	1 unit/ μL
プライマー (各 10μM)	各 0.45 μL	各 0.18μM
テンプレート核酸 (0.005 pg-500 ng/reaction)	2.0 μL	
蒸留水	8.6 μL	
(全量 25 μL にメスアップ)		
合計	25 μL	

- 使用酵素キット：SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific)

- RT-PCR 反応条件

逆転写	50°C	30min.
初期の変成	94°C	2min.
以下、変成～伸長を	35 サイクル	
変成	95°C	30 sec.
アニーリング	66°C	30 sec.
伸長	68°C	45sec.
最後の伸長	68°C	7min.

- ④ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 1.5 % アガロースゲルで電気泳動を行う。
- ⑤ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータにより塩基数 794 bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。

## (2) Nested-PCR

- ① 使用する試料；テンプレート DNA として 3. (1) 初動診断法：RT-PCR (1st PCR) の増幅産物、対照は (1) 初動診断法：RT-PCR (1st PCR) に同じ。

- ② プライマーおよび反応条件

- プライマー (GAV 特異的。YHV は増幅しない。)

GY2：5'-CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3'

G6：5'-GTA-GTA-GAG-ACG-AGT-GAC-ACC-TAT-3'

増幅産物サイズ；406 bp

注：GY2 の 7 番目の塩基は T であるが、この位置の塩基は GAV の配列に完全に一致させるためには C にする必要がある。ただし、これまで T のままでも GAV の増幅に支障があるという報告はない。

・反応液組成（1 検体分）

（試薬）	（容量）	（終濃度）
HotStarTaq Master Mix （containing 2.5 units HotStarTaq DNA Polymerase, 1x PCR Buffer, 200 μM of each dNTP）	12.5 μL	1x
プライマー（各 10μM）	各 0.9 μL	各 0.36μM
テンプレート DNA（<500 ng/reaction）	2.0 μL	
蒸留水	8.7 μL	
合計	25.0 μL	

・使用酵素キット：HotStarTaq Master Mix Kit（Qiagen）

・RT-PCR 反応条件

初期の変成	95℃	15min.
以下、変成～伸長を	35 サイクル	
変成	95℃	30 sec.
アニーリング	66℃	30 sec.
伸長	72℃	45 sec.
最後の伸長	72℃	7 min.

- ③ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 1.5 % アガロースゲルで電気泳動を行う。
- ④ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータにより塩基数 406 bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。
- ⑤ OIE マニュアルでは、この方法で検査するときはシーケンス（配列解析）を行って、遺伝子型を確認するのが望ましい、としているため、増幅産物の配列解析を行い、遺伝子型を確認する。

### （3）病理組織学的検査

- ① 固定標本をトリミングし、各部分を常法通りパラフィンに包埋する。
- ② 切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施し、検鏡する。詳しい病理学的所見は無い。

## 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

- ① RT-PCR 検査で陽性または擬陽性と診断された個体の試料・記録を増養殖研へ送付する。
- ② 送付するもの：臨床検査・剖検記録、PCR の泳動像写真、PCR 検査用組織試料（凍結、冷蔵あるいは 70% エタノール固定）。病理組織の場合は固定後 70% エタノールに置換した試料を送付する。

## 5. 参考文献

- 1) Cowley *et al.*, (2002) Vertical transmission of gill-associated virus (GAV) in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, 50, 95–104.
- 2) Spann *et al.*, (1997) A yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, 31, 169–179.
- 3) Cowley *et al.*, (2000) Detection of Australian gill-associated virus (GAV) and lymphoid organ virus (LOV) of *Penaeus monodon* by RT-nested PCR. *Dis. Aquat. Org.*, 39, 159–167.
- 4) Oanh *et al.*, (2011) Pathogenicity of gill-associated virus and Mourilyan virus during mixed infections of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Gen. Virol.*, 92, 893–901.
- 5) Spann *et al.*, (2003) Detection of gill-associated virus (GAV) by *in situ* hybridisation during acute and chronic infections in *Penaeus monodon* and *Penaeus esculentus* shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, 56, 1–10.
- 6) Bell, T. A. and Lightner, D. V. (1998): A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Allen Press, Inc. Lawrence, Kansas.

その他の記載はすべて OIE マニュアル (2015) による。

# モノドン型バキュロウイルス感染症 Spherical Baculovirus (MBV)

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：モノドン型バキュロウイルス感染症  
英名：Spherical Baculovirus
- ② 病原体：Penaeus monodon-type baculovirus (MBV, PemoNPV)

Virus Taxonomy; 9th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses および、2015年版の同 committee ホームページに本ウイルスの記載は見つからず分類は不確定。

### (2) 地理的分布

中国・台湾を初めとする太平洋、インド洋、中近東、地中海、アフリカ、ハワイ、タヒチ、南北アメリカ諸国

### (3) 宿主域

- ① 自然発病：自然発病はウシエビ（ブラックタイガー）*Penaeus monodon*、やテンジクエビ（バナナエビ）*P. merguensis* を含む *Penaeus*、*Metapenaeus*、*Fenneropenaeus*、*Melicertus* 各亜属の1種または複数種において感染が報告されている。しかし、MBVに感染した*P. monodon*の近傍で飼育されていても*P. vannamei*、*P. stylostris* および*P. californiensis*のMBV感染は報告されていない。
- ② 実験感染：クルマエビのポストラーバは実験感染が成立しなかったという報告がある。
- ③ キャリア：生残した宿主は慢性的にウイルスを保有し、キャリアとなる。
- ④ ベクター：知られていない。

### (4) 発生の特徴

- ① 卵およびノープリウス幼生を除くすべての発生段階で、肝臓と中腸前部の上皮細胞に感染する。
- ② 幼生期（プロトゾエア・ミス）およびポストラーバ初期ステージで最も死亡が多く発生する。
- ③ 流行地域の稚エビや成エビでは、MBVの感染率が50%~100%近くあるが、重度のストレス下でない限り、通常死亡が発生することはない。
- ④ 重度に感染した個体では、成長低下し、結果的には生残率の低下、養殖成績の低下を招く。
- ⑤ 感染様式は、水平感染で、感染エビの組織・排泄物・包埋体 (occlusion body) あるいは汚染したデトライトスや水の摂取によって起こる。

## (5) 外観症状

特徴的な症状は乏しい。

## (6) 剖検所見

重度の感染個体では中腸線に白濁が見られることが多い。

## (7) 消毒

文献情報はないが、塩素剤等通常の消毒剤により本ウイルスの消毒はかろうであると思われる。

## (8) 防除法

受精卵と仔エビの消毒が効果的とされるが我が国でエビの卵稚仔を対照にして承認された消毒薬はない。垂直感染をさけるため、卵は清浄な海水でよく洗浄し、卵や幼生が親エビの糞便等による汚染を受けないようにする。

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

- ① 押しつぶし標本のための検体：10尾程度の活力が低下した病エビまたは死亡直後の個体を採取する。あるいは排泄物を採取する。
- ② RT-PCRのための検体：少なくとも10尾の病エビまたは死亡直後の個体を採取する。
- ③ 病理組織検査のための検体：5-10尾の病エビを選ぶ。死亡個体は病理組織検査には適さない。
- ④ 被検個体の症状、採取場所、採取日時、海水温、年齢、体重、死亡状況、他からの種苗の移入の有無など、疫学的情報を記録する。

### (2) 検査のための試料の採材

- ① 押しつぶし標本のための採材：肝臓や中腸。排泄物はそのまま用いる。
- ② PCRのための採材：病エビの肝臓および中腸。
- ③ 病理組織検査のための採材 1)：大型のエビの場合は、中腸腺前方、中腸線内部（いわゆる胃の内腔）、前方の腹節、後方の腹節それぞれに Davidson の固定液を注射する。エビ体重の 5-10% 程度の固定液を注射する。注射後ただちに尾部から解剖バサミで甲殻に切れ目を入れる。切れ目は腹節では真横に、頭胸甲では斜め上に、内部臓器を傷つけないように注意しながら眼の付け根付近まで入れる。これは固定液を浸透しやすくするためである。12g より大型のエビでは、さらに頭胸甲と腹節の境目および腹部中央に背側から体軸と垂直に体の半分程度まで切れ目を入れる。その後速やかに固定液に投入し、1日程度固定する。注射が不可能な小型のエビの場合は体全体を直接固定液に投入して固定する 1)。固定液はサンプリング直前まで冷蔵庫か氷中で冷やしておき、サンプルを投入したら30分程度はゆっくり攪拌する。その後一晩置いた後、70% エタノールで1時間程度洗い、さらに新しい70% エタノールに置換して保存す

る。

・Davidson の固定液の組成

95% エチルアルコール	33 mL
市販のホルマリン原液	22 mL
100% 酢酸（氷酢酸）	11.5 mL
蒸留水	33.5 mL
合計	100 mL

なお、上記は全量を 100 に合わせるためのもので、簡便に 95% エタノール：ホルマリン原液：氷酢酸：蒸留水を体積比 3:2:1:3 の割合で混合してもよい。作製した本固定液は 4℃ で保存すれば 2 ヶ月程度は使用可能である。

### 3. 診断手順

#### (1) 肝臓・中腸の観察

- ① 半海水または 1% 食塩水を用いて、エビ幼生、稚エビ・成エビの肝臓や中腸の押しつぶし標本を作成して顕微鏡で観察する。
- ② 排泄物を用いる方法は、稚エビあるいは成エビ、特に親エビの非破壊検査で有用である。検査用のエビを別の水槽に移し、数時間おいて排泄物を集め、直接ウエットマウント標本を作製して検鏡する。
- ③ 観察結果：押しつぶし標本では、肝臓、中腸の上皮細胞の核内に単独もしくは複数が固まりとなったほぼ球状の包埋体（大きさ 0.1µm 以下から 20µm 程度）を確認する（写真 1）。包埋体はわずかに屈折した緑色で、マラカイトグリーンで宿主由来の物質より濃く染まるため、区別が容易になる（写真 2）。

#### (2) PCR 方法 1

- ① 採取したエビ試料から市販の DNA 抽出キットなどにより核酸を抽出する。抽出法は使用するキットのマニュアルに従う。
- ② PCR に際して、テンプレートとして次の対照を用いる。
  - ・陰性対照：MBV 陰性エビ組織から同様な方法で抽出した DNA
  - ・陽性対照：MBV 陽性エビ組織から同様な方法で抽出した DNA（陰性のエビ組織に陽性対照 cDNA プラスミド等を加えたものから抽出してもよい）
  - ・テンプレートなし。
- ③ プライマーおよび反応条件
  - ・プライマー
    - 261F：5'-AAT-CCT-AGG-CGA-TCT-TAC-CA-3'
    - 261R：5'-CGT-TCG-TTG-ATG-AAC-ATC-TC-3'
  - 増幅産物サイズ；261bp

・反応液組成(1 検体分)：Takara Ex Taq® Hot Start Version を用いた時の例を示す。

本キットでは MgCl<sub>2</sub> はキットのバッファに含まれている。

(試薬)	(容量)	(終濃度)
10x PCR バッファ	2 μL	1x
Takara Ex <i>Taq</i> <sup>®</sup>	0.1 μL	
dNTP(4 種とも含む)	1.6 μL	
プライマー (各 50μM)	各 0.2 μL	各 0.5μM
検体 DNA	1 μL	
蒸留水	14.9 μL	
合計	20 μL	

- 使用酵素キット：Takara Ex *Taq*<sup>®</sup> Hot Start Version (Takara)
- PCR 反応条件 OIE マニュアルではビーズを使っている。

初期の変成	95℃	5min.
以下、変成～伸長を 35 サイクル		
変成	94℃	30sec.
アニーリング	60℃	30sec.
伸長	72℃	30sec.
最後の伸長	72℃	7min.

- ④ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 2% 程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。
- ⑤ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータによりサイズが 261bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。

## (2) PCR 方法 2

- ① 使用する試料や対照は (1)PCR 方法 1 に同じ。
- ② プライマーおよび反応条件

• プライマー

MBV1.4F：5'-CGA-TTC-CAT-ATC-GGC-CGA-ATA-3'

MBV1.4r：5'-TTG-GCA-TGC-ACT-CCC-TGA-GAT-3'

増幅産物サイズ；533bp

- 反応液組成 (1 検体分)：Takara Ex *Taq*<sup>®</sup> Hot Start Version を用いた時の例を示す。本キットでは MgCl<sub>2</sub> はキットのバッファに含まれている。

(試薬)	(容量)	(終濃度)
10x PCR バッファ	2 μL	1x
Takara Ex <i>Taq</i> <sup>®</sup>	0.1 μL	
dNTP(4 種とも含む)	1.6 μL	
プライマー (各 100μM)	各 0.2 μL	各 1μM
検体 DNA	1 μL	

蒸留水	14.9 $\mu$ L
合計	20 $\mu$ L

・使用酵素キット：Takara Ex Taq® Hot Start Version (Takara)

・PCR 反応条件

初期の変成	96°C	5min.
以下、変成～伸長を 40 サイクル		
変成	94°C	30sec.
アニーリング	65°C	30sec.
伸長	72°C	1min.
最後の伸長	72°C	7min.

- ④ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 1.5% 程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。
- ⑤ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータにより塩基数 533bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。

### (3) 病理組織学的検査

- ① 固定標本をトリミングし、各部分を常法通りパラフィンに包埋する。
- ② 切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施し、検鏡する。肝臓あるいは中腸の上皮細胞の核内に明るい赤色に染色された包埋体が観察される（写真 3、4）。包埋体は一つの核内にしばしば複数個観察される。包埋体はかならずしもきれいな球状には見えない。これらの核ではクロマチンの減少や核の縁辺部への濃縮も観察される。なお、グラム染色（Brown and Brenn の組織学用）では包埋体の染色性が周囲と異なるため包埋体が少ない標本では観察しやすい。

## 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

- ① ウエットマウント標本で包埋体が確認あるいは疑われた個体、または、PCR 検査で陽性または疑陽性と診断された個体の試料・記録を増養殖研究所へ送付する。
- ② 送付するもの：臨床検査・剖検記録、ウエットマウント標本あるいは写真、PCR の泳動像写真、PCR 検査用組織試料（凍結、冷蔵あるいは 70% エタノール固定）。病理組織の場合は固定後 70% エタノールに置換した試料を送付する。

## 5. 参考文献

- 1) Bell, T. A. and Lightner, D. V. (1998): A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Allen Press, Inc. Lawrence, Kansas.

その他の記載は OIE マニュアル（2016）による。

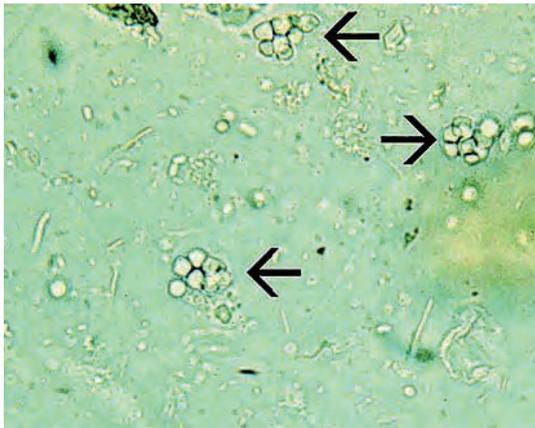


写真1 MBVに冒されたウシエビの腸内容物のウェットマウント標本。球形の包埋体の塊(矢印)が観察される。(D. V. Lightner 博士提供)

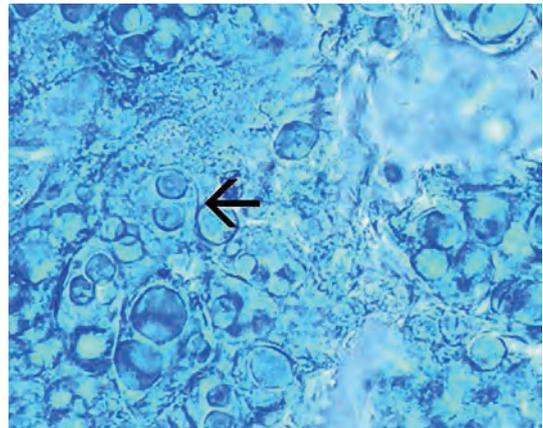


写真2 MBVに冒されたウシエビの腸内容物のウェットマウント標本(0.1% マラカイトグリーン染色)。核内に単独あるいは塊の包埋体(矢印)が観察される。(D. V. Lightner 博士提供)

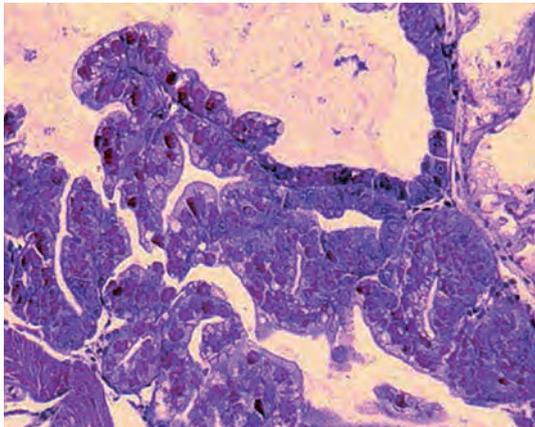


写真3 MBVに冒されたウシエビの肝臓の病理組織像(HE染色、低倍)。核内にエオシンに染まった包埋体が観察される。

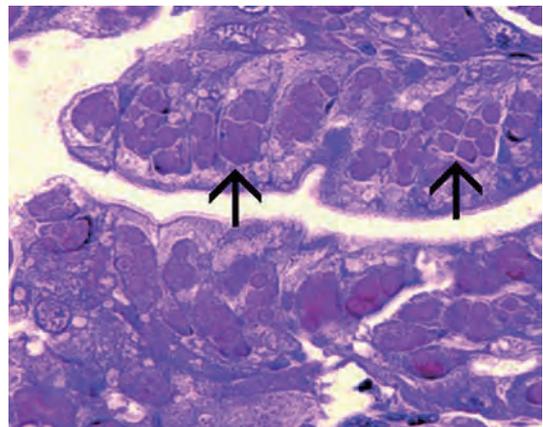


写真4 MBVに冒されたウシエビの肝臓の病理組織像(HE染色、高倍)。核内にエオシンに染まった包埋体(矢印)が観察される。

### 3. 貝類等

アワビヘルペスウイルス感染症

アワビの細菌性膿疱症

カキヘルペスウイルス  $\mu$ Var 感染症

パーキンサス・クグワディ感染症

マボヤの被囊軟化症



# アワビヘルペス性神経節炎 Abalone Viral Ganglioneuritis (AVG)

## 1. 疫 学

### (1) 病名と病原体

- ① 病 名：アワビヘルペス性神経節炎  
英 名：Abalone Viral Ganglioneuritis (AVG)
- ② 病原体：原因病原体の Abalone herpesvirus (AbHV) は、Malacoherpesviridae 科のウイルスであるとされ、正二十面体のウイルス粒子をもち、直径は 100-110 nm である。エンベロープを有する。同じ科の Ostreid Herpesvirus-1 とは塩基配列レベルで 19% - 53% の同一率を示す。台湾(AbHV Taiwan)およびオーストラリア(AbHV VIC) のウイルスについて 3 カ所の共通領域の配列を比較したところ、92.4、96.4 および 96.6% の高い同一率をしめした。全ゲノム配列解析から、オーストラリア国内のウイルスであっても多くの遺伝型が存在することがわかっているが、これがウイルスの病原性などに影響するかどうかはわかっていない。

### (2) 地理的分布

- ① 初発国：台湾
- ② 分布域：台湾、オーストラリア (ビクトリア州およびタスマニア島)

### (3) 宿主城

- ① 自然発病：台湾産のトコブシ (*Haliotis diversicolor*)、豪州産のブラックリップ・アバロニ (*Haliotis rubra* Leach) およびグリーンリップ・アバロニ (*Haliotis laevigata* Donovan)。ブラックリップ・アバロニ とグリーンリップ・アバロニのハイブリッド。日本産のクロアワビ (*Haliotis discus*) とトコブシ病貝との同居感染試験では発病は確認されなかった。

### (4) 発生の特徴

- ① オーストラリアではアワビの年齢に関係なく発生し、90 % 以上の死亡率であった。
- ② 台湾でも親貝と稚貝の両方で発生が確認され、70-80 % の死亡率であった (水温 16 - 19℃)。
- ③ 養殖池では臨床的な症状が確認されてから 3 日以内に死亡が起きることが報告されており、実験感染でも同様に死亡することが確認されている。
- ④ 3 種類の実験感染 (非接触の同居感染、病貝飼育水での飼育、および病貝ホモジネート濾液筋肉注射) では、いずれの場合も攻撃後 2 - 5 日以内に 100% が死亡した。

### (5) 外観症状

罹病貝には、外套膜や腹足の萎縮、不規則な腹足縁辺部の巻き上がりと硬

直化、粘液の過剰分泌、口球の膨張と突出、歯舌のめくれ上がりなどの症状が認められる。また、光からの逃避行動がない、基板への付着力の低下などの症状が認められることがある。異常な産卵行動が認められることもある。

## (6) 剖検所見

顕微鏡下での病理組織観察では、炎症反応や神経組織の壊死が認められる。

## (7) 消毒

情報は少ないが、本ウイルスはヘルペスウイルスであり、KHV などと同様の方法で不活化されると考えられる。

## (8) 防除法

本感染症に対する具体的な防除法は無い。発生した場合には、飼育貝の廃棄、飼育水・施設の消毒を行う。飼育再開前には無病貝の試験飼育を行い発病しないことを確認する。

## 2. 検体採取

### (1) 検体の収集

瀕死個体や新鮮な死亡個体を取り上げる。不可能な場合は健常個体を取り上げるが、この場合、飼育設備全体にわたり全ての年齢群を取り上げの対象とする。

### (2) 検査のための試料の採材

組織を外科的に採材し検査用試料とする。この際、脳神経節、足部神経節または口球神経節が含まれるように組織片を回収する。摘出した組織は年齢、飼育池、採集した場所ごとに分けて保存する。採材した組織は直ちに固定液（80% エタノール；19.75% グリセロール；0.25%  $\beta$ -メルカプトエタノール）、または95% エタノールに浸し固定する。これらの処理が不可能な場合には氷上で保管し、24時間以内に処理が可能な施設に持ち込む。腐敗が進んでいない組織サンプルであれば直接凍結保存したものであっても検査に使用することができる。

## 3. 診断手順

### (1) PCR 検査

#### ① 準備

機器類：サーマルサイクラー、マイクロピペット、エッペンドルフチューブ、PCR チューブ、電気泳動装置、トランスイルミネーター

試薬類：DNA 抽出キット、PCR 用試薬（キアゲン社 HotStarTaq Master Mix kit を推奨）、電気泳動用アガロースゲル

プライマー：

AbHV-16 (Fwd.) 5'-GGC TCG TTC GGT CGT AGA ATG-3'

AbHV-17 (Rev.) 5'-TCA GCG TGT ACA GAT CCA TGT-C-3  
増副産物のサイズ；522 – 558 bp

## ②手 技

20 mg 程度の組織から、市販の DNA 抽出キット (QIAmp DNA Mini Kit、MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit または AB MagMAX Express-96 Magnetic Particle Processor など) を用いて DNA を抽出し、~ 100 ng/  $\mu\text{L}$  の濃度に DNA を溶出する。次いで、抽出した核酸および対照 DNA をテンプレートとして、上記のプライマーを用いて PCR 反応を行う。

### 反応液組成 (1 検体分)

	(試薬)	(容量)	(終濃度)
	HotStar <i>Taq</i> Master Mix (2x)	12.5 $\mu\text{L}$	1x
	dDW(滅菌超純水)	9.5 $\mu\text{L}$	
	Fwd. AbHV-16 (18 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{L}$	0.36 $\mu\text{M}$
	Rev. AbHV-17 (18 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{L}$	0.36 $\mu\text{M}$
	検体	2.0 $\mu\text{L}$	
合 計		25.0 $\mu\text{L}$	

### PCR 反応条件

#### 通常の PCR の場合

初期の変成	95°C	15min.
以下、変成~伸長を		40 サイクル
変成	94°C	30sec.
アニーリング	52°C	30sec.
伸長	74°C	45min.
最後の伸長	74°C	7min.
保持	4°C	$\infty$

注) PCR に際しては次の対照が必要である

- 1) AbHV 感染陰性貝の組織から抽出した陰性対照 DNA
- 2) AbHV 感染陰性貝の DNA に陽性対照 DNA プラスミドを加えた陽性対照 DNA
- 3) テンプレートを何も含まない陰性対照

## ③PCR 結果の判定

- (a) PCR 反応物を DNA 分子量マーカーとともに 1.5% アガロースゲルにアプライし電気泳動を行う。泳動後にトランスイルミネーターを用いて 522 – 558 bp の増幅産物の有無を確認する。

## (2) 遺伝子配列解析

### ① 準備

試料：PCR 反応物

使用機器類：サーマルサイクラー、マイクロピペット、エッペンドルフチューブ、PCR チューブ、キャピラリーシークエンサー

試薬類：PCR 反応物精製試薬、BigDye Terminator などの市販のシークエンス試薬

プライマー：

AbHV-16 (Fwd.) 5'-GGC TCG TTC GGT CGT AGA ATG-3'

AbHV-17 (Rev.) 5'-TCA GCG TGT ACA GAT CCA TGT-C-3'

### ② 手 技

1) アガロースゲル電気泳動で、単一の増幅産物が得られたことが分った場合には、市販の精製キット（QIAquick PCR Purification Kit など）で精製を行う。2 種類以上の増幅断片が認められた場合には、目的サイズの増幅断片をアガロースゲル電気泳動後に切り出し、精製を行う。切り出し精製には市販の精製キット（Wizard SV Gel and PCR Clene-Up System など）を用いる。いずれの精製キットも添付説明書のプロトコールに従う。

2) 精製した増幅断片をテンプレートに、上記の PCR プライマーを使用してシークエンス反応を行う。フォワード（Fwd.）側とリバース（Rev.）の両方からシークエンスを行う。シークエンス反応は使用する試薬の説明書に従う。

3) 精製したシークエンス反応液をシークエンサーにかけ、増幅産物の塩基配列情報を取得する。

4) 得られた塩基配列情報を、ジーンバンクに登録されている AbHV の遺伝子配列（GenBank accession No. HM631981）と比較し、高いレベルで相同性を示すことを確認する。この作業には NCBI の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を使用する。標的領域の配列には多型性が存在し、522bp から 588bp までの異なるサイズの増幅産物が得られることが分っている（別紙参照）。

## (3) その他

病性鑑定指針は疾病を発症した動物の診断を行うことを目的としており、本病を発症したアワビから原因ウイルスを検出するためには、ここに記載した通常の PCR で十分であるが、不顕性感染状態にあって外観的に健康なアワビからの検出には通常の PCR はしばしば不十分である。したがって、サーベイランスやモニタリング等の目的で本ウイルスの検出を試みる時には、OIE マニュアル（2015）に記載されているような定量 PCR（TaqMan<sup>®</sup>）を用いる必要がある。

## 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

大型個体の場合には脳神経節、足部神経節または口球神経節が含まれるように組織を採材し試料とする。生鮮試料は凍結後に冷凍便で送付する。指定の固

---

定液（80 % エタノール；19.75 % グリセロール；0.25 %  $\beta$  -メルカプトエタノール）、または 95% エタノールで固定した試料については常温で送付する。

## 5. 参考文献

- Chang, P.H., S.T. Kuo, S.H. Lai, H.S. Yang, Y.Y. Ting, C.L. Hsu and H.C. Chen (2005): Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Haliotis diversicolor supertexta* in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, 65, 23–27.
- Corbeil S., A. Colling, L.M. Williams, F.Y.K. Wong, K. Savin, S. Warner, B. Murdoch, N.O.I. Cogan, T.I. Sawbridge, M. Fegan, I. Mohammad, A. Sunarto, J. Handler, S. Pyecroft, M. Douglas, P.H. Chang and M.ST.J. Crane (2010): Development and validation of a TaqMan<sup>®</sup> PCR assay for the Australian abalone herpes-like virus. *Dis. Aquat. Org.*, 92, 1–10.
- Corbeil S, L.M. Williams, S. Warner, M. Fegan, N.J. Moody, I. Mohammad, K. Ellard, C. Caraguel, M. Deveney, J. Cowley and M.ST.J. Crane (2014): Aquatic animal Health Subprogram: Characterization of abalone herpes-like virus infections in abalone. FRDC project no. 2009/032. Fisheries Research and Development Corporation, CSIRO-AAHL, DEPI Victoria, SARDI, DPIPWE Tasmania.
- Cowley J.A., S. Corbeil, H. Chen, F. Wong, N.J. Moody, K. Ellard, M. Fegan, K. Savin, S. Warner and M.ST.J. Crane (2011): Sequence variations amongst abalone herpes-like virus (AbHV) strains provide insights into its origins in Victoria and Tasmania. Proceedings of the First FRDC Australasian Scientific Conference on Aquatic Animal Health, Cairns, Australia, 5–8 July 2011.
- Crane M.ST.J., S. Corbeil, M. Fegan and S. Warner (2009): Aquatic Animal Health Subprogram: Development of molecular diagnostic procedures for the detection and identification of herpes-like virus of abalone (*Haliotis* spp.). ISBN 978 0 643 09835 0., 79 pp
- Ellard K., S. Pyecroft, J. Handler and R. Andrewartha (2009): Findings of disease investigations following the recent detection of AVG in Tasmania. Proceedings of the Fourth National FRDC Aquatic Animal Health Scientific Conference, Cairns, Australia, 22–24 July 2009.
- Hooper C., P. Hardy-Smith and J. Handler (2007): Ganglioneuritis causing high mortalities in farmed Australian abalone (*Haliotis laevigata* and *Haliotis rubra*). *Aus. Vet. J.*, 85, 188–193.

Tan J., M. Lancaster, A. Hyatt, R. Van Driel, F. Wong and S. Warner (2008): Purification of a herpes-like virus from abalone (*Haliotis* spp.) with ganglioneuritis and detection by transmission electron microscopy. *J. Virol. Methods*, 149, 338–341

Wang J., Z. Guo, J. Feng, G. Liu, L. Xu, B. Chen & J. Pan (2004): Virus infection in cultured abalone, *Haliotis diversicolor* Reeve in Guangdong Province. China. *J. Shellfish Res.*, 23, 1163–1168.

World Organisation for Animal Health (OIE)(2015): Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, Chapter 2.4.1.; [http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmlfile=chapitre\\_abalone\\_herpesvirus.htm](http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmlfile=chapitre_abalone_herpesvirus.htm).

```

Victoria/AUS/2007      GGCTCGTTCGGTCGTAGAATGAAAATCTATCTGGAAGTAATCTACTTTATACTCTCGTGA 60
Taiwan/2004_TC08     GGCTCGTTCGGTCGTAGAATGAAAATCTATCTGGAAGTAATCTACTTTATACTCTCGTGA 60
*****

Victoria/AUS/2007      GTTACAAGTCCTTGTTCAATCGAGTTACAAGACCTTGTTCAATCGAGTTACAAGACCTTG 120
Taiwan/2004_TC08     GTTACAAGACCTTGTTCAATCGAGTTACAAGACCTTGTTCA   GAGTTACAAGACCTTG 117
*****

Victoria/AUS/2007      TTCAATCGAGGTACAAGACCTTGTTCAATTGAGTTACAAGACCTTGTTCAATCGAGTTAC 180
Taiwan/2004_TC08     TTCAATCGAGGTACAAGACCTTGTT-----ACTTT-----CGAGGTAC 155
*****

Victoria/AUS/2007      AAGACCTTGTTCCCTTTCGTACCACACCTCTATCATCATGCAAAGAAGACAAGAAAAAAT 740
Taiwan/2004_TC08     AAGACCTTGTTCCCTTTCGTACCACACCTCTATCATCATGCAAAGAAGACAAGAAAAACA-T 214
*****

Victoria/AUS/2007      AATAAAATTTACATTCACTTTTATTTTCAATTTTTCACCTTCGCTTCCTTCCACCAA 300
Taiwan/2004_TC08     AATAAAATTTACATTCACTTTTATTTTCAATTTTFTA-ACCTTCGCTTCCTTCCCCAA 273
*****

Victoria/AUS/2007      CAAGCCCTTCTTCTCGTCATTGGCCTCTTCCATGTAAGCCTTCTGAGCGTTCCACACCT 360
Taiwan/2004_TC08     CAAGCCCTTCTTCTCGTCATTGGCCTCTTCCATGTAAGCCTTCTGAGCGTTCCACACCT 333
*****

Victoria/AUS/2007      CTACCGTCTGCCCGTCCATCTCGCGCATAATCGTCGCGATTTCATCAACCCGCTTTATGT 420
Taiwan/2004_TC08     CTACCGTCTGCCCGTCCATCTCGCGCATAATCGTCGCGATTTCATCAACCCGCTTTATGT 393
*****

Victoria/AUS/2007      CGATAAAGTTCTGCATGTACTCCACCTCAAAGECTCCACGAACATGGTAGAATTGACAC 480
Taiwan/2004_TC08     CGATAAAGTTCTGCATGTACTCCACCTCAAAGECTCCACGAACATGGTAGAATTGACAC 453
*****

Victoria/AUS/2007      AAGCGAAGGCTTGCATGAGTCCGTCCTTGTCACCTGGCCAGCATCAGATCTTGTTTGACA 540
Taiwan/2004_TC08     AAGCGAAGGCTTGCATGAGTCCGTCCTTGTCACCTGGCCAGCATCAGATCTTGTTTGACA 513
*****

Victoria/AUS/2007      TGGATCTGTACACGCTGA 558
Taiwan/2004_TC08     TGGATCTGTACACGCTGA 531
*****
    
```

図 -1 異なる株から増幅した本ウイルスの PCR 増幅産物の塩基配列比較

(Victoria/AUS/2007 の増幅産物 (558 bp) および Taiwan/2004 TC08 の増幅産物 (531 bp) の比較)

# アワビの細菌性膿疱症 Pustule disease of abalone/Blister disease of abalone

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：アワビの細菌性膿疱症  
英名： Pustule disease of abalone / Blister disease of abalone
- ② 病原体：*Vibrio furnissii* (= *V. fluvialis* biotype II とシノニムである) もともと *V. fluvialis* のうち、糖を分解した際にガス産生がある株が *V. fluvialis* II とされていた。よって *V. furnissii* は性状試験においてガス産生能以外は *V. fluvialis* と一致する。

### (2) 地理的分布

- ① 初発国： 中国（大連）
- ② 分布域： 中国の大連の養殖場で確認されたが、この地域以外からの報告はない。しかし、原因細菌である *Vibrio furnissii* (= *V. fluvialis* biotype II) は世界的に河口等で確認される常在菌である。

### (3) 宿主域

- ① 自然発病：エゾアワビ
- ② 実験感染：エゾアワビ以外のアワビ種に対しては感染実験の結果がなく、不明である。エゾアワビでは筋肉注射法で感染が成立することが知られている。浸漬による感染実験では創傷がなければ、感染しなかったという。また経口的に細菌を投与しても感染しない。
- ③ その他：ヒトの糞便からも検出されるほかに、世界中の河口等で確認される常在菌である。

### (4) 発生の特徴

1993年9月に中国大連市周辺のエゾアワビ養殖場で天然貝および養成した稚貝に本疾病が確認され、死亡率は60%を超えた。1994年から1995年にかけて、大連市沿岸のアワビ養殖場では次々に本疾病が発生した。アワビの大きさや水質、飼育法に関連性はなく、発症死亡した。実験感染(20℃)では、高濃度の細菌を注射すると、水疱を生じずに7日程度で死亡するが、低濃度(2 cells/個体)の細菌を注射した場合や傷をつけて浸漬した場合、臨床症状(水疱)が足部に観察されるまでに6ヶ月を有する。なお、実験感染における死亡率は50-100%に達する。

### (5) 外観症状

- ① 足部に白色の膿を含む膿疱ないし水疱状の病変を形成する。*Vibrio campbellii*,

*Vibrio harveyi* (= *V. carchariae* とシノニムである) が同様の疾病を起こすという報告がある。また、膿疱や水疱は生じないが、足部からは、これらの菌以外の細菌が検出されることがある。さらに、細菌ではないが、*Perkinsus* sp. による感染が足部に黄色い膿疱ないし膿瘍を形成することが知られている。

- ② 細菌が外套膜、消化管、消化盲嚢、生殖巣、体液等で増殖し、ほとんどの器官で細菌が見られるようになると摂食を停止し、やがて死亡する。よって、重篤になると、膿疱が足部以外にも出現する可能性がある。

## (6) 剖検所見

足部に白色の膿を含む膿疱ないし水疱状の病変を形成する。

## (7) 消毒

使用器具及び手指の消毒は、通常の細菌を対象とした消毒法を用いる。簡便で有効性の高いやり方としては、臓器から菌分離をする際に用いる器具や手などの指先は 70%エタノールを使用し、用いた器具や被検貝はオートクレーブで滅菌する。輸送用コンテナおよび水は次亜塩素酸ソーダなどで消毒する。

## (8) 防除法

- ① UV 照射した海水で飼育する。
- ② アワビを移動させる際、アワビに傷を付けないように、アワビを剥離する。
- ③ 発病群の移動、感染耐過群の親貝としての飼育は疾病蔓延のおそれがあるので行わない。
- ④ 発病池の消毒を行う。
- ⑤ 各種抗生物質の有効性は認められているが、食用アワビに対して認可された薬剤はないので適さない。

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

- ① 当該疾病の外観症状を示す貝を 5 個体以上採取する。
- ② 被検貝の収集から採材まではできるだけ速やかに行うことが望ましい。

### (2) 検査のための試料の採材

- ① 被検貝を検査機関まで搬送する場合は、生きたままビニール袋などに入れて酸素パッキングし、水温変動に注意して搬送するか、個体ごとに無菌の密閉可能な容器に収容し、氷冷または冷蔵状態でできるだけ速やかに (数時間以内が望ましい) 検査機関に到着するように搬送する。
- ② 試料には採取場所および日時を明記したラベルを添付する。

### 3. 診断手順

#### (1) 本症の診断法の注意点

上述したように *V. furnissii* は海水中に存在している可能性があるため、病気の原因となっている菌を釣菌し、検査する必要がある。従って、膿疱患部から菌を分離する必要がある。症状が認められない、あるいは症状が認められても細菌が観察されない個体から菌を分離すると、常在の *V. furnissii* を分離・同定してしまう可能性がある。

#### (2) 剖検観察

腹足あるいは軟体部に膿疱状病変を肉眼で確認する。

#### (3) スタンプ（スミア）標本の観察（原因菌の確認）

- ① 生きている病員の膿疱表面をアルコール綿でよく拭き、注射針等を用いて内部の膿ないし体液を採取する。採取した膿ないし体液をスライドグラスに少量なすりつけるか、スライドグラス上に伸ばしてスミア標本を作製して風乾する。膿疱の液量が少なければ、病変部含む組織を丸ごと大きく切り取り、新しいカミソリやメス等を用いて膿疱の中心を切断し、露出させた膿疱の切断面をスライドグラスに押し当てて、スタンプする。1 個体から複数の標本を作製すると観察に適した標本が得られる確率が上がる。
- ② スタンプあるいはスミア標本にギムザ染色（ディフクイック、メチレンブルー、グラム染色等で代替してもよい）を施し、光学顕微鏡で、短桿菌を探索する（接眼レンズ 10x、対物レンズは 100x を使うことが望ましい）。作成した標本に短桿菌が観察されれば、陽性と判断し、細菌分離を行う。どの標本においても、細菌がほとんど観察されない、あるいは菌が観察されるが、短桿菌以外の場合は陰性とする。

#### (4) 細菌分離

- ① 生きている病員の膿疱表面をアルコール綿でよく拭き、注射針等を用いて内部の膿ないし体液を採取する。雑菌の混入を避けるため潰瘍化している（外部に開いた病変）部分からの釣菌は避ける。膿瘍を解剖バサミやメスを用いて無菌的に切開し、そこから菌分離を行ってもよい。
- ② 採取した膿または体液を TSA（Tryptic Soy Agar、NaCl 濃度 2-3%）、BHI Agar（Brain Heart Infusion Agar、NaCl 濃度 2-3%）、Marine Agar、TCBS Agar（Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar、NaCl 濃度 2-3%）などの寒天培地上に塗抹し、24-37℃で 2 - 4 日間培養する。このうち、TCBS はビブリオ属の菌だけを選択的に釣菌する培地であるので便利ではあるが、主原因（優勢種）がビブリオ属以外の菌の場合、主原因は分離されないで、ビブリオ属の雑菌が分離されてしまうことがあるので、TCBS を使用する場合はやや注意を必要とする。
- ③ 菌分離した大部分の組織から 1 種類と思われる優勢種のコロニーが寒天培地に観察されれば、菌の形態を観察する。コロニーがみられない、あるいは極端に少ない、

あるいは複数のコロニーが多数みられ、優勢種が決定できない場合はスタンプで観察された菌は用いた培地に生育しづらい菌あるいは細菌症ではない可能性がある。いずれの場合も、*V. furnissii* 以外を原因とする膿疱であり、細菌分離は陰性となる。

- ④ 優勢種のコロニーを滅菌した NaCl 溶液 (濃度 2-3%) をスライドグラスに 1 滴のせて、そこに白金線を用いて、菌を懸濁させ (菌は少ない方が観察しやすい)、火炎固定し、分離菌の固定標本を作製し、ギムザ染色液等で染色し、菌の形態を観察し、組織のスタンプ標本で観察した菌と概ね一致することを確認し、陽性と判断する。

## (5) 分離菌の性状 (I)

正しい性状試験を行うためには、各試験において、被試験菌だけでなく、陽性対照の細菌および陰性対照の細菌を準備し、試験の精度を上げることが望ましい。

- ① 寒天培地の優勢種のコロニーから細菌を新しい寒天培地に継代培養し、これを性状試験の材料とする。継代培養していないと、雑菌が混入して正しい性状試験ができない可能性がある。
- ② 運動性を確認する。滅菌した NaCl 溶液 (濃度 2-3%) をスライドグラスに 1 滴のせて、そこに白金線を用いて、細菌を懸濁させ、ウェットマウント標本を作製し、光学顕微鏡で接眼 10x、対物 40x (油浸レンズは使いづらい) で観察し、菌が活発に運動することを確認する (菌が多すぎると観察しづらい)。菌の運動は振動するようなブラウン運動とは異なり、不規則である。
- ③ グラム陰性菌であることを確認する。グラム染色あるいは 3% KOH 水溶液を用いた劉の簡易識別法により、グラム陰性菌であることを確認する。
- ④ オキシダーゼ試験・カタラーゼ試験によってオキシダーゼとカタラーゼが陽性であることを確認する。

## (6) 分離菌の性状 (II)

菌株によって性状試験の結果は異なるが、標準株 (B3215, ATCC35016) を含む主な菌株 7 株の詳細な性状試験結果を表に示す。本菌 (*V. furnissii*) の性状試験結果はガス産生能を有することを除くと、*V. fluvialis* のそれと一致する。性状試験は一般的な細菌の分類試験を行う。また、多数の性状試験項目を一度にできる API20E キットを用いてもよい。API20E キットの場合、試験結果の項目に本菌が登録されていないので、*V. fluvialis* に同定される。ガス産生能試験はグルコース (ブドウ糖) を基質としガス産生能試験を行い、ガス産生すれば本菌に分類される。ガス産生能を調べる試験は TSI 寒天培地 (Triple Sugar Iron Agar) に穿刺培養し、ガス産生により生じる培地の亀裂や気泡の有無により判定する (亀裂・気泡が確認されればガス産生陽性と判断する)。あるいは、ダーラム管や、より簡便なガストラップチップ (GTT:gas trap tip) を用いた試験を実施する。

試験項目	判定結果
3% KOH <sup>1</sup>	粘性 (グラム陰性菌)
TCBS 培地	+
運動性	+
チトクローム・オキシダーゼ (1%NaCl) * <sup>1</sup>	+
カタラーゼ *2	+
インドール産生 (1%NaCl) * <sup>2</sup>	-または+
メチルレッド (1%NaCl) * <sup>2</sup>	+
VP テスト (1%NaCl) * <sup>2</sup>	-
クエン酸 (シモンズ)	+
TSI 培養時の H <sub>2</sub> S 産生能	-
PIA 培養時の H <sub>2</sub> S 産生能	-
尿素	-
フェニルアラニン	-
L-リジン (1%NaCl)	-
L-アルギニン (1%NaCl)	+
L-オルニチン (1%NaCl)	-
ゼラチン (22℃) (1%NaCl)	+
KCN 下における増殖試験	+
マロン酸	-または+
D-グルコース	
	酸の産生
	+
	ガス産生
	+
酸の産生	
	アドニトール
	-
	L-アラビノース
	+
	D-アラビトール
	+
	セロビオース
	-または+
	ズルシトール
	-
	エリトリトール
	-
	D-ガラクトース
	+
	グリセロール
	+
	i-イノシトール
	-
	ラクトース
	-または+
	マルトース
	+
	D-マンニトール
	+
	D-マンノース
	+
	メリビオース
	-
	α-CH <sub>3</sub> -グルコシド
	-
	ラフィノース
	-
	L-ラムノース
	-または+
	サリシン
	-
	D-ソルビトール
	-
	サッカロース
	+
	トレハロース
	+
	D-キシロース
	-
エスクリン (1% NaCl)	-
ムケート	-
酒石酸塩 (ジョーダン)	-または+
硝酸塩	-または+
リパーゼ (コーン油)	-または+

試験項目	判定結果
Dnase	
25℃	+
36℃	+
NO <sub>3</sub> → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (1%NaCl) *1	+
ONPG	-または+
クエン酸 (クリステンセン)	-または+
チロシンクリーニング	-または+
ストリングテスト *1	+
NaCl 添加における増殖試験	
0%	-
1%	+
6%	+
8%	-または+
10%	-または+
12%	-
O/129 感受性試験 *1,3	-または+

試験項目のうち\* 1、\* 2 以外は培養 7 日後の結果を示している。

\* 1 : 培養 1 日目の結果を示している。

\* 2 : 培養 2 日目の結果を示している。

\* 3 : O/129 ディスクにおいては、アワビから分離した病原性株は 150µg のディスクに対しては感受性がある (阻止円を形成) が、10µg に対してはない。また、本菌の多くの株は O/129 ディスクに対して感受性がない。

### (7) 分離菌遺伝子のシーケンス

寒天培地に継代した分離菌を試料とし、熱抽出法により DNA を抽出し、抽出された DNA をテンプレートとして PCR 法により、*V. furnissii* の rod shaping protein MreB (mreB) 遺伝子を増幅する。増幅された DNA の塩基配列を決定し *V. furnissii* の mreB 遺伝子の塩基配列 (GenBank accession No. DQ907418.1) と高いレベルで相同性を示すことを確認する。用いるプライマーは (a) の通りである。(b) に、Takara EX Taq® HS を用いた反応プロトコルの例を示す。

#### (a) プライマー

プライマーの配列

F-primer : 5'-ACT-CTT-ATT-TAC-GTC-AAA-GGA-CAG-3'

R-primer : 5'-TCT-TGC-AGC-GCT-TCA-AGA-ATT-TC-3'

増幅産物サイズ ; 722bp

#### (b) 反応液組成

10x EX Taq buffer 5.0 µL

2.5mM dNTP mixture 4.0 µL

dDW (滅菌超純水) 30.75 µL

SVCV nest F primer (10pmol/ µL) 5.0 µL

SVCV nest R primer (10pmol/ µL) 5.0 µL

Takara EX <i>Taq</i> <sup>®</sup> HS	0.25 μL
合 計	50 μL

- ① コロニーを滅菌爪楊枝もしくは滅菌チップの先について（菌塊が見えなくてもコロニーに接すればよい）、それを PCR 反応液 (b) に漬けて混ぜ、菌を反応液に加える。
- ② サーマルサイクラーが 94℃ に達したところで一時停止し、チューブをセットして再スタートさせる。
- ③ PCR のプログラムは以下の通りである。

初期の変性	95℃	4min.
以下、変成～伸長を 30 サイクル		
変性	95℃	1min.
アニーリング	55℃	30sec.
伸長	72℃	1min.
最後の伸長	72℃	7min.
保持	4℃	∞

- ③の初期変性 (95℃ 4min) で細菌から DNA が抽出され反応液に混ざる (DNA の熱抽出法)。
- ④ 臭化エチジウム存在下、トランスイルミネーターにより分子量 722bp のバンドの有無を観察する。
- ⑤ DNA 増副産物 (722bp) の塩基配列を決定する。

#### 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

寒天培地に継代培養した分離菌をプレートごと冷蔵 (4℃) で増養殖研究に送付する。その際、蓋がおちないように、またコンタミや蒸発を防ぐために、蓋をビニールテープ等でとめる。また、使用した培地がわかるように、明記する。

#### 5. 参考文献

- Brenner, D. J., F. W. Hickman, J. V. Lee, A. G. Steigerwalt, G. R. Fanning, D. G. Hollis, J. Farmer, R. E. Weaver, S. W. Joseph and R. J. Seidler (1938): *Vibrio furnissii* (formerly aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new species isolated from human feces and the environment. *J. Clin. Microbiol.*, 18, 816-824.
- Li, T., M. Ding, J. Zhang, J. Xiang and R. Liu (1998): Studies on the pustule disease of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) on the Dalian coast. *J. Shellfish Res.*, 17, 707-711.
- Nie, L.P., J. P. Liu and T. W. Li (1995): Physiological and biochemical characteristics of the pathogen of pustule disease of *Haliotis discus*. *Chin. J. Microecol.*, 7, 33-36.
- Nie, Z. and S. Wang (2004): The status of abalone culture in China. *J. Shellfish Res.*, 23,

941-945.

Nishimori, E., O. Hasegawa, T. Numata and H. Wadabayashi (1998): *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. *Fish Pathol.*, 33, 495-502.

# カキヘルペスウイルス $\mu$ Var 感染症 Ostreid herpesvirus 1 $\mu$ Var (OsHV-1 $\mu$ Var)

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：カキヘルペスウイルス  $\mu$ Var 感染症  
英名：Ostreid herpesvirus 1  $\mu$ Var (略称) OsHV-1  $\mu$ Var
- ② 病原体：ヘルペスウイルス目、マラコヘルペスウイルス科に属する 1)Ostreid herpesvirus 1  $\mu$ Var。遺伝学的に  $\mu$ Var と類似する OsHV-1 変異型は世界各地のカキ類から検出されており、日本でも存在が確認されている 2)。OsHV-1 変異型は ORF4 上流や ORF4、ORF42/43 に変異を有するウイルスを指し、その一つが  $\mu$ Var である。ORF4 上流や OFR4、ORF42/43 を含む  $\mu$ Var の塩基配列は Segarra et al.3) に記載されており、これと一致するものを  $\mu$ Var と呼ぶ。

### (2) 地理的分布

- ① 初発国：2008 年にフランスで最初に報告された。
- ② 分布域：フランスおよびフランスから種苗を導入したアイルランド。

### (3) 宿主域

- ① 自然発病：主な自然感染宿主はマガキ (*Crassostrea gigas*) とポルトガルガキ (*C. angulate*) であるがイワガキ (*C. nippona*) も感受性がある可能性がある。。
- ② 実験感染：情報なし。
- ③ キャリア：成貝がキャリアとなる可能性が指摘されている。
- ④ ベクター：水平感染が成立するためベクターは必要でないと考えられているが、プランクトンがベクターとなる可能性も指摘されている。
- ⑤ その他：全ての生育段階でウイルスが検出されているが、死亡は主に稚貝で発生する。

### (4) 発生の特徴

4 月頃から死亡が始まり、夏に大量死する。急激に発症し、数日間で死に至ることが多い。死亡率は 40% から 100%、18 ヶ月未満の稚貝が死亡する。

### (5) 外観症状

特徴的な外観症状は乏しく、死亡して初めて発見される。殻を閉じる動きが緩慢になる例もあるが、本疾病特有のものではない。

### (6) 剖検所見

特徴的な所見はない。

## (7) 消毒

情報は無いが、本ウイルスは塩素剤等通常の消毒剤で不活化されると考えられる。

## (8) 防除法

種苗生産施設では、海水のろ過や UV 処理 (3 ~ 30mJ/cm) などの対策が有効であると考えられる。衰弱貝や死亡貝は速やかに取り除いて廃棄し、発生地域で使用した器具は適当な消毒処理を施さない限り未発生地域では使用すべきではない。フランスでは本疾病に対する抵抗性のある家系が作成され、養殖場における実証試験も行われている。

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

- ① PCR のための検体：少なくとも 10 個体の衰弱貝もしくは死亡直後の個体。死亡貝や衰弱貝の収集が難しい場合は、死亡貝と同じ垂下連で飼育されている個体や同じ容器に収容されている個体から無作為に採取する。
- ② 病理組織検査のための検体：生きている 5-10 個体の衰弱貝もしくは死亡貝と同じ垂下連や容器で飼育されている個体。
- ③ 被検個体の採取場所、採取日時、海水温、年齢、死亡状況、他からの種苗の移入の有無など、疫学的情報を記録する。

### (2) 検査のための試料の採材

- ① PCR のための採材：外套膜、鰓、神経節等の軟体部組織。小さな個体は軟体部全てを材料とする。
- ② 病理組織検査のための採材：外套膜、鰓、中腸腺を含む軟体部。

## 3. 診断手順

### (1) PCR 方法 1

- ① 適当な DNA 抽出キットにより軟体部から抽出した DNA を用いる。1  $\mu$ L をテンプレートとして使用する。なお、抽出方法などについては、使用するキットのマニュアルに従うこと。
- ② 陰性対照として、可能であれば OsHV-1  $\mu$ Var 陰性の組織を使用する。困難な場合には蒸留水やバッファを用いる。陽性対照としては可能であれば OsHV-1  $\mu$ Var 陽性の組織を用いる。困難な場合には、OsHV-1  $\mu$ Var の DNA テンプレートを陽性対照とする。
- ③ プライマー及び反応条件

・プライマー

C2 : 5'- CTC-TTT-ACC-ATG-AAG-ATA-CCC-ACC-3'

C6 : 5'- GTG-CAC-GGC-TTA-CCA-TTT-TT-3'

・反応液組成（1 検体分）

（試薬）

TaKaRa Ex <i>Taq</i> HS (5U/ $\mu$ L)	0.1 $\mu$ L
dNTP Mixture (2.5mM each)	1.6 $\mu$ L
10 $\times$ Ex <i>Taq</i> Buffer	2.0 $\mu$ L
dDW(滅菌超純水)	14.9 $\mu$ L
Fwd.C2(100pmol/ $\mu$ L)	0.2 $\mu$ L
Rev.C6(100pmol/ $\mu$ L)	0.2 $\mu$ L
検体	1.0 $\mu$ L
合 計	20 $\mu$ L

・使用酵素キット：TaKaRa Ex *Taq* Hot Start Version

・PCR 反応条件

初期の変成	94 $^{\circ}$ C	10min.
以下、変成～伸長を 40 サイクル		
変成	94 $^{\circ}$ C	30sec.
アニーリング	63 $^{\circ}$ C	30sec.
伸長	72 $^{\circ}$ C	30sec.
最後の伸長	72 $^{\circ}$ C	7min.

- ④ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 2.0% アガロースゲルで電気泳動を行う。
- ⑤ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータにより塩基数約 700bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。
- ⑥ 増副産物が確認できた場合、PCR 産物を制限酵素 Mfe I で消化する。

Mfe I-HF	1 $\mu$ L
10 $\times$ Buffer	5 $\mu$ L
dDW(滅菌超純水)	39 $\mu$ L
PCR 産物	5 $\mu$ L
合 計	50 $\mu$ L

- ・使用した制限酵素：Mfe I-HF (New England BioLabs)
- ・反応条件：37 $^{\circ}$ C、15 分～一晩

- ⑦ 制限酵素消化した PCR 産物を 2.0% アガロースゲルで電気泳動する。制限酵素 Mfe

I は OsHV-1  $\mu$ Var の有する非同義置換を切断する。OsHV-1  $\mu$ Var の制限酵素切断断片長は約 200bp と約 500bp。 $\mu$ Var 以外の変異型は切断されない。

- ⑧ 適当な精製キットを用いて PCR 産物を精製し、ダイレクトシーケンスにより増幅産物の塩基配列を決定する。データベース GenBank accession No. HQ842610 に登録されている OsHV-1  $\mu$ Var C2/C6 領域の塩基配列との相同性を確認する。(最終診断)

## (2) PCR 方法 2

- ① 使用する試料や対照は (1) PCR 方法 1 に同じ。

- ② プライマー及び反応条件

・プライマー

IA2: 5'- AAT-CCC-CAT-GTT-TCT-TGC-TG-3'

IA1: 5'- CGC-GGT-TCA-TAT-CCA-AAG-TT-3'

・反応液組成 (1 検体分)

(試薬)

TaKaRa Ex <i>Taq</i> HS (5U/ $\mu$ L)	0.1 $\mu$ L
dNTP Mixture (2.5mM each)	1.6 $\mu$ L
10 $\times$ Ex <i>Taq</i> Buffer	2.0 $\mu$ L
dDW(滅菌超純水)	14.9 $\mu$ L
Fwd.IA2(100pmol/ $\mu$ L)	0.2 $\mu$ L
Rev.IA1(100pmol/ $\mu$ L)	0.2 $\mu$ L
検体	1.0 $\mu$ L
合 計	20 $\mu$ L

・使用酵素キット：TaKaRa Ex *Taq* Hot Start Version

・PCR 反応条件

初期の変成	94 $^{\circ}$ C	10min.
以下、変成～伸長を 40 サイクル		
変成	94 $^{\circ}$ C	30sec.
アニーリング	63 $^{\circ}$ C	30sec.
伸長	72 $^{\circ}$ C	30sec.
最後の伸長	72 $^{\circ}$ C	7min.

- ③ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 2.0% アガロースゲルで電気泳動を行う。

- ④ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータにより塩基数約 600bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。

⑤ 適当な精製キットを用いて PCR 産物を精製し、ダイレクトシーケンスにより増幅産物の塩基配列を決定する。OsHV-1  $\mu$ Var IA2/IA1 領域の塩基配列 2) との相同性を確認する。

### (3) 病理組織学的検査

- ① 固定標本をトリミングし、各部分を常法通りパラフィンに包埋する。
- ② 切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、検鏡する。OsHV-1 感染の特徴的な病変として、核の肥大化、核酸の偏在化や核濃縮などの核の変化が概ね共通している。稚貝の病変部は主に結合組織にみられ、線維芽細胞様細胞の核が肥大し、核酸が辺縁部に偏在化する。その他の細胞として、血球とおもわれる細胞がアポトーシスのように核が顕著に濃縮するという報告もある。病変部に顕著な細胞浸潤は見られない。

組織学的検査は、ヘルペスウイルス感染と診断できるほどの精度はない。カウドリー A 型 (Cowdry type A) の封入体 (核内部がエオジン陽性になり核の辺縁部に核酸が偏在化する) は多くのヘルペス感染の典型であるが、カキのヘルペスウイルス感染においては、カウドリー A 型として特定できない。フランスのマガキにおける病貝の組織検査から、カウドリー A 型封入体は報告されていない。さらに、メキシコあるいはアメリカ合衆国 (カリフォルニア) におけるカキの OsHV-1 感染に関して、核内封入体は観察されないが、細胞や核の病理学的変化はある。

## 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

- ① PCR 検査で陽性または擬陽性と診断された個体の抽出 DNA・記録を増養殖研へ送付する。
- ② 送付するもの：臨床検査・剖検記録、PCR の泳動像写真、PCR 検査用組織試料 (凍結、冷蔵)。病理組織の場合は固定後 70% エタノールに置換した試料を送付する。

## 5. 参考文献

- 1) Davison, A.J., B.L. Trus, N. Cheng, A.C. Steven, M.S. Satson, C. Cunningham, R.M. Le Deuff, and T. Renault (2005): A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J. Gen. Virol.* 86, 41-53.
- 2) Shimahara, Y., J. Kurita, I. Kiryu, T. Nishioka, K. Yuasa, M. Kawana, T. Kamaishi, and N. Oseko (2012): Surveillance of Type 1 Ostreid Herpesvirus (OsHV-1) variants in Japan. *Fish Pathol.* 47, 129-136.
- 3) Segarra, A., J. F. Pepin, I. Azul, B. Morga, N. Faury and T. Renault (2010): Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res.*, 153, 92-99.

その他の記載はすべて OIE マニュアル（2015）による。

# パーキンサス・クグワディ感染症 Infection with *P. qugwadi*

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：パーキンサス・クグワディ感染症  
英名：Infection with *P. qugwadi*
- ② 病原体：Alveolata 上門 Perkinsozoa 門 *Perkinsus qugwadi*

### (2) 地理的分布

- ① 初発国：カナダ・ブリティッシュコロンビア州バンクーバー島周辺海域
- ② 分布域：カナダ・ブリティッシュコロンビア州バンクーバー島周辺海域

### (3) 宿主域

- ① 自然発病：ホタテガイ (*Mizuhopecten* (= *Patinopecten*) *yessoensis*)、ホタテガイ (*M. yessoensis*) とアラスカホタテガイ (weathervane scallop: *P. caurinus*) の交雑種 (Pacific scallop と称される)
- ② 実験感染：モモイロニシキ (*Chlamys rubida*)
- ③ キャリア：情報無し
- ④ ベクター：情報無し
- ⑤ その他：組織切片観察で虫体は確認されていないが、感染海域に生息するイガイ類、ベッコウガキおよびカナダアサリは PCR 検査で陽性を示した。

### (4) 発生の特徴

カナダ西岸ブリティッシュコロンビア州では新たにホタテガイ養殖を開始するため、1983年に日本よりホタテガイを移入し種苗生産を開始した。養殖試験実施中の1988年5月、Broughton島の養殖施設において幼貝(殻高3.5 mm)の生殖腺および中腸腺に白色の結節が初めて認められ、その秋には60%の成貝が死亡した。病理組織学的検査により病巣から *Perkinsus qugwadi* の虫体が認められ、その後の感染実験等により死亡は *P. qugwadi* の感染によるものであることが明らかになった。本寄生虫による疾病は1997年までに同州のホタテガイ養殖海域14箇所のうち5箇所で確認されている。1995年以降、本疾病の発生は減少し1997年を最後に報告が途絶えたが、2011年に実施した再調査では感染は継続しており20%程度の死亡を引き起こしていることがわかった。

他の *Perkinsus* 感染症と比較すると本症は低い温度でも発生し、10℃程度の水温でも疾病は進行する。発症に明確な季節性は認められない。

殻径9 cmを超える2歳以上の大型個体での死亡率は高くても60%であるが、殻径5 cm未満の1歳以下の個体では100%の死亡が起こることもある。

### (5) 外観症状

閉殻筋、鰓、生殖腺および中腸腺において白色の結節様構造が観察されることがある。しかし、結節様構造は血球浸潤に由来するものであり、*Perkinsus qugwadi* 感染症に特徴的なものではない。

### (6) 剖検所見

組織切片では閉殻筋、鰓、生殖腺、中腸腺、外套膜に直径 10 ~ 20  $\mu\text{m}$  の栄養体が観察される。栄養体周囲には激しい血球浸潤が見られる。組織崩壊が起こる重篤感染部位では、直径 2.0  $\times$  4.5  $\mu\text{m}$  の遊走子が観察されることもある。一方、腎臓で虫体が観察されることは稀である。

### (7) 消毒

他の *Perkinsus* 属原虫では、N-ハラミン、淡水処理、紫外線処理が原虫細胞の不活化に有効であったとの報告があるが、*P. qugwadi* に関する情報はない。

### (8) 防除法

有効な防除法は知られていない。

ホタテガイと比べてホタテガイとアラスカホタテガイの交雑種は本寄生虫に対する感受性が低いとされており、発生海域であるバンクーバー島周囲のホタテガイ養殖場では人工種苗生産した交雑種を養殖に用いている。

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

成貝よりも幼貝の方が本疾病に対する感受性が高いことが知られているため、診断には 1 歳未満の幼貝（殻高 5 cm 未満）を検体とすることが望ましい。

### (2) 検査のための試料の採材

これまでの組織学的観察より、虫体周囲には宿主血球が遊走し激しい血球浸潤の起こることが知られる。重篤な場合、炎症反応は肉眼的に白色～黄白色の結節や白濁として観察可能となるため、このような組織は検査対象となる。病巣が観察できない場合、感染強度が高くなる鰓や中腸腺、生殖腺を検査対象とするのがよい。したがって、PCR 検査用試料は、エラ、中腸腺、生殖腺を少量ずつ切り取って使用する。

一方、腎臓には重篤感染個体であっても寄生虫細胞は見られないことがあるため、検査として用いるには不適であると考えられる。

## 3. 診断手順

他の *Perkinsus* 属原虫の診断に用いられる流動チオグリコレート培地による培養で、本虫はルゴール液で呈色する前遊走子嚢へと発達しないことが知られて

いる。そのため、以下の顕微鏡観察および PCR 法による診断が推奨される。

### ① スタンプ標本の顕微鏡観察

結節部位などの病巣からスタンプ標本を作成し、ギムザ染色することで *Perkinsus qugwadi* の遊走子が観察されることがある（写真1）。しかし、遊走子は重篤感染個体であっても稀にしか見られないことから、この方法で感染を確認することは難しい。

### ② 病理組織検査

病理組織切片観察用試料は Davidson 固定液で 3 日程度固定する。固定に際して速やかな固定液の浸透が望ましいので、ゆるやかに浸透しながら固定すること、また大きな組織であれば感染部位周囲に切れ目を入れるとよい。また、自己融解による組織の崩壊を防ぐため、低温下での固定が推奨される。固定後は常法に従いパラフィン切片を作成する。すぐにパラフィン包埋を行わない場合は 70% エタノール中で保存可能である。

虫体周囲には宿主血球が遊走することが多いため、血球浸潤部位を中心に観察を行う。*Perkinsus* 属で特徴的なリングセル(写真2)を含む栄養体ステージ(写真3、4)の他、重篤感染組織では稀に遊走子も観察される(写真5)。

### ③ PCR 法

PqguF7TC 5'-CCA CTC TGG TAG TCT TGT CTT C-3'  
PQ3R 5'-AGA ATG GCG ACG CTG ATG AA-3'  
増幅産物サイズ 281 bp

#### PCR 反応液組成 (1 検体分)

Platinum <i>Taq</i> DNA polymerase	0.08 $\mu$ L
dNTPMixture (10 mM)	0.4 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0.6 $\mu$ L
10X PCR Bufferr (no MgCl <sub>2</sub> )	2.0 $\mu$ L
dDW(滅菌超純水)	15.32 $\mu$ L
Fwd. PqguF7TC (20 pmol/ $\mu$ L)	0.3 $\mu$ L
Rev. PQ3R (20 pmol/ $\mu$ L)	0.3 $\mu$ L
検体	1.0 $\mu$ L
合 計	20.0 $\mu$ L

#### PCR 反応条件

初期の変成	94 °C	3 min.
以下、変成～伸長を		40 サイクル
変成	94 °C	30 sec.
アニーリング	54 °C	30 sec.

伸長	72 °C	30 min.
最後の伸長	72 °C	10 min.
保持	12 °C	∞

④遺伝子配列解析

SSU rRNA 領域

SSU rRNA 領域 (1,796 bp) は長いため、以下の二つのプライマーセットによる増幅産物を解析し、結合させて得られる配列を参照配列 (GenBank accession No. AB716689) と比較する。

Primer set 1:

Pm18S-1098F : 5'-AGG AAT TGA CGG AAG GG CA-3

PqITS-22R : 5'-CGC AGT TTA AAT GAA TCG GT-3'

増幅産物のサイズ : 685 bp

PCR 反応液組成 (1 検体分)

Titanium <i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/μL)	0.2 μL
dNTP Mixture (10 mM)	0.4 μL
10 × Titanium <i>Taq</i> Bufferr	2.0 μL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.2 μL
dDW(滅菌超純水)	14.4 μL
Fwd. PqugITS1-F (10 pmol/μL)	0.4 μL
Rev. PqugIS-R (10 pmol/μL)	0.4 μL
検体	1.0 μL
合 計	20.0 μL

PCR 反応条件

初期の変成	94 °C	5 min.
以下、変成～伸長を	30 サイクル	
変成	94 °C	30 sec.
アニーリング	54 °C	30 sec.
伸長	72 °C	45 sec.
最後の伸長	72 °C	7 min.
保持	12 °C	∞

Primer set 2:

Pq18S-1198R : 5'-TCC TTC CCA TGT CTG GAC CT-3'

Puniv18S-F : 5'-CCT GGT TGA TCC TGC CAG T-3'

増幅産物サイズ 1243 bp

PCR 反応液組成：プライマーの種類以外は Primer set 1 での組成と同じ。

#### PCR 反応条件

初期の変成	94℃	5 min.
以下、変成～伸長を		35 サイクル
変成	94℃	30 sec.
アニーリング	57℃	30 sec.
伸長	72℃	90 sec.
最後の伸長	72℃	7 min.
保持	12℃	∞

説明 Primer set 2 で増幅した PCR 産物を、内部に設計した以下のプライマーでシーケンス反応を行う。

Pm18S-582F：5'-ACG AGT ATC AAT TGG AGG GC-3'

Pm18S-710R：5'-GGC AGA AAT CCA ACT ACG AGC-3'

Primer set 1 と Primer set 2 による増幅産物の配列を結合し、最終的に得られた配列情報を参照配列（GenBank accession No. AB716689）と比較する。

## 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

ホタテガイは殻内に水を密閉しておくことが構造上できないため、カキのように水から上げた後、長期間維持することは難しい。従って、採集後は解剖し病変部位を確認後、組織切片用には Davidson 固定液に浸漬、PCR 検査用には 70～90% エタノールに浸漬して送ることが望ましい。

ホタテガイをそのまま宅急便等で送付する際には死亡することが考えられるため、死後の組織崩壊がなるべく進行しないようクール便等を利用して送る。

## 5. 参考文献

- Bower, S. M., J. Blackbourn, G. R. Meyer and D. J. H. Nishimura (1999): Diseases of cultured Japanese scallops (*Patinopecten yessoensis*) in British Columbia, Canada. *Aquaculture*, 107, 201-210.
- Blackbourn, J., S. M. Bower and G. R. Meyer (1998): *Perkinsus qugwadi* sp. nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Can. J. Zool.*, 76, 942-953.
- Bower, S. M., J. Blackbourn and G. R. Meyer (1998): Distribution, prevalence, and pathogenicity of the protozoan *Perkinsus qugwadi* in Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Can. J. Zool.*, 76, 954-959.
- Bower, S. M., J. Blackbourn, G. R. Meyer and D. W. Weich (1999): Effect of *Perkinsus qugwadi* on various species and strains of scallops. *Dis. Aquat. Org.*, 36, 143-151.

Itoh, N., G. R. Meyer, A. Tabata, G. Lowe, C. L. Abbott and S. C. Johnson (2013): Rediscovery of the Yesso scallop Pathogen *Perkinsus qugwadi* in Canada, and development of PCR tests. *Dis. Aquat. Org.*, 104, 83-91.

Bower, S. M. and G. R. Meyer (1993): Causes of mortalities among cultured Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, in British Columbia, Canada. In *Can Tech Rep Fish Aquat Sci.* ed by Bourne NF, Bunting BL, Townsend LD. Pp. 85-94.

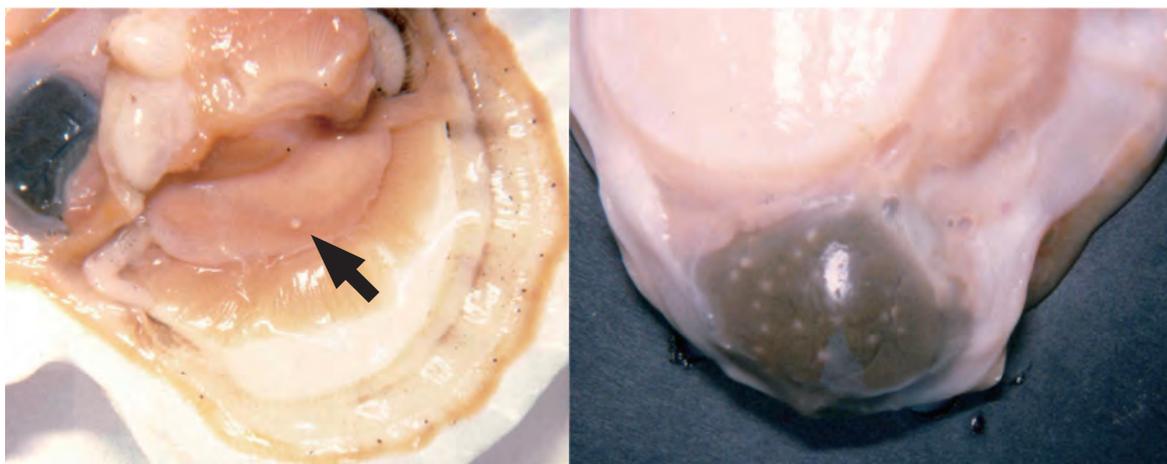


図1：白い結節・膿瘍の見えるホタテガイの生殖腺（左）と中腸腺（右）。（Gary Meyer氏：Pacific Biological Station 提供）。

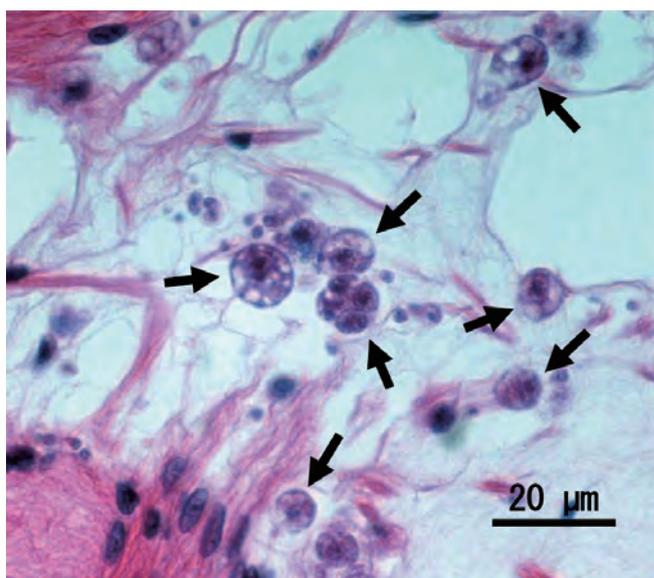


図2：中腸腺で観察される *Perkinsus qugwadi* の栄養体ステージ（矢印）。（伊藤直樹博士提供）

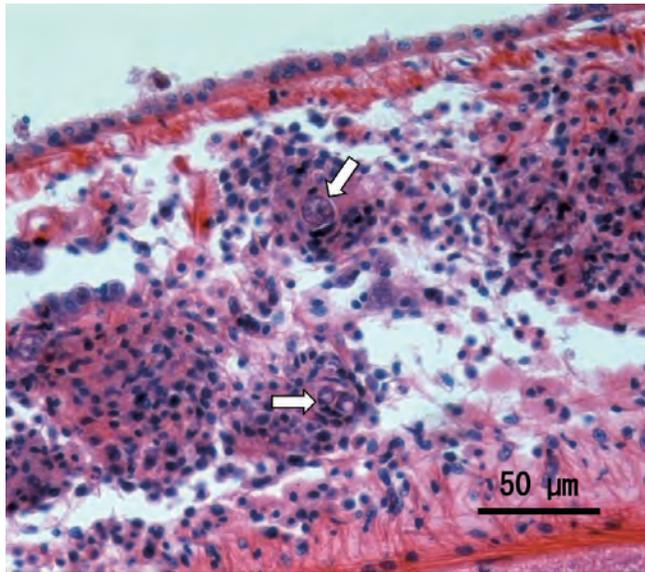


図3 : *Perkinsus qugwadi* の栄養体 (矢印) の周囲に見られる激しい血球浸潤。(伊藤直樹博士提供)

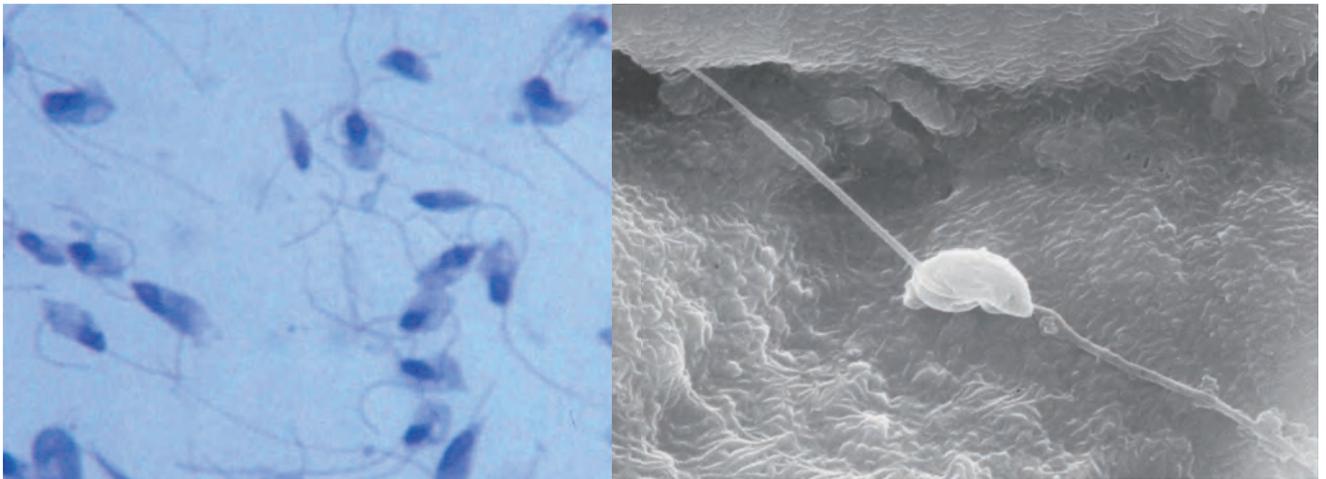


図4 : *Perkinsus qugwadi* の遊走子。ギムザ染色像 (左) と走査型電子顕微鏡像 (右)。(Gary Meyer 氏 : Pacific Biological Station 提供)

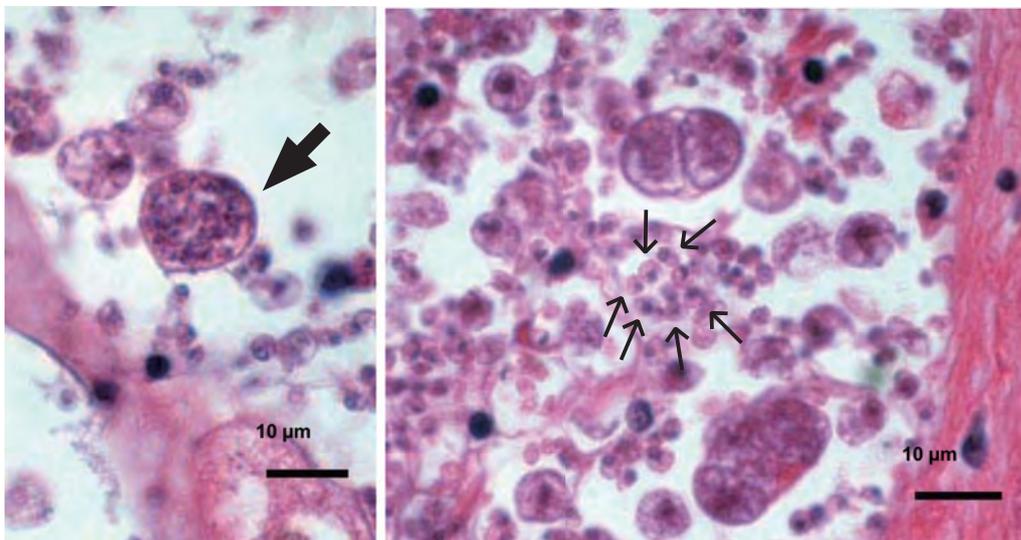


図5 : 組織切片上で観察される *Perkinsus qugwadi* の遊走子嚢 (左 : 矢印) と放出された多数の遊走子 (右 : 矢印)。(伊藤直樹博士提供)



# マボヤの被囊軟化症 Soft tunic syndrome

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

- ① 病名：マボヤの被囊軟化症  
英名：Soft tunic syndrome
- ② 病原体：*Azumiobodo hoyamushi*  
ユーグレノゾア門、キネトプラスト綱、ネオボド目

### (2) 地理的分布

- ① 初発国：韓国
- ② 分布域：韓国、日本（国内では宮城県牡鹿半島以北から岩手県）

### (3) 宿主域

- ① 自然発病：マボヤ (*Halocynthia roretzi*) およびエボヤ (*Styela clava*)
- ② 実験感染：上記以外の宿主は報告されていない。
- ③ キャリア：感染したマボヤおよびエボヤがキャリアとなり得る。
- ④ ベクター：知られていない。

### (4) 発生の特徴

本疾病は 1995 年ころから韓国で発生が確認され<sup>2)</sup>、そのため同国におけるマボヤの生産量は 2004 年には発生前の 1/10 に落ち込んだ。日本では韓国からの種苗の導入にとともに病原体が侵入したと考えられている。2007 年に初めて宮城県において本疾病の発生が確認され<sup>3)</sup>、その後発生地域が拡大し、大被害をもたらした。我が国においては本疾病は満 1 歳以上の個体に認められ、死亡率は 30～100%に達するが、水温が 20℃を超える夏期には病勢が収束する<sup>3)</sup>。これは、原因鞭毛虫 *A. hoyamushi* が 20℃を超える水温では増殖できないことに起因すると思われる<sup>4)</sup>。

### (5) 外観症状

発症の初期には水管周辺から被囊の軟化が始まり、側面の被囊が硬く健康でも水管部分が軟化する。重篤になると被囊全体が柔らかく、かつ薄くなる（写真 1）。ホヤの被囊はセルロースであり、通常死亡しても被囊が直ちに軟化することはない。現在のところこのような臨床症状が認められるのは本疾病のみであり、したがって、被囊の軟化が明らかであれば、本疾病であることはかなり確実である。

## (6) 剖検所見

健康な被囊は硬くハサミやメスで切り裂くのが困難であるが、本疾病に罹患したホヤの被囊は簡単に切断することができる。重症個体の被囊は手で簡単に裂ける。しかし、内部の軟組織には特に異常は認められないのが普通である。

## ホヤの被囊軟化症

## (7) 消毒

Park ら<sup>5)</sup>の報告によると、原因鞭毛虫をそれぞれ24時間および1時間浸漬したときの薬剤の50%効果濃度(EC50mg/L)は、ホルマリンで0.73および10.0、過酸化水素で0.32および7.8、ビチオノール(Bithionol)で7.4(1時間のデータなし)、二酸化塩素で3.76および13.3、ブロナポールで1.24および18.8である。

## (8) 防除法<sup>6)</sup>

本疾病に対して認可された薬剤はない。疾病の未発生海域においては他からの種苗の持ち込みを避け、未発生海域で生産された種苗のみを使用する。また、定期的に調査を行い、発病個体が見つかった場合は発病個体とともに感染している可能性のあるグループを速やかに取り除く。

既発生海域においては、低密度での養殖、発症個体あるいは感染の可能性のある群の速やかな陸上での処分、8m以深の深場での養殖、病原体の増殖を防ぐため、満2歳での全数の出荷などが推奨される。

## 2 検体採取

### (1) 検体の収集

- ① 発症した個体を調べるには被囊の軟化した個体を選んで採集する。PCRによる診断には被囊が明らかに軟化していれば1～3個体程度で十分であるが、病理組織学的診断のためには被囊が軟化した個体を3～5個体程度収集するのが望ましい。
- ② 被検個体は活きたまま海水とともにビニール袋などに入れ、検査機関に搬入する。このとき、水温には特に注意し、10～15℃を保つようにする。5℃以下、20℃以上では病原体である*A. hoyamushi*が死滅する恐れがある。
- ③ 被検個体の採取場所、採取日時、海水温、年齢、死亡状況、他からの種苗の移入の有無など、疫学的情報を記録する。

### (2) 検査のための試料の採材

一次診断、確定診断とも、PCRあるいは病理組織のいずれかを行えばよい。発症初期のマボヤでは、被囊の軟化は水管部分から始まるため、その部分を採取する。

#### ① PCRのための採材

ハサミでおおざっぱに被囊を切除し、さらになるべく新しいメスやカミソリで個体毎に軟化した被囊約10gを幅約1cm程度の短冊状に細切し、海水を満たした小型の容器に入れ、15℃で一晩浸漬する(写真2)。このとき温度が5℃以

下あるいは 20℃以上では原因生物が死滅する可能性があるので注意する。一晩たったら、海水をスライドグラスに載せ、被嚢から遊走してきた、運動する鞭毛虫を顕微鏡で観察する（写真 3、4）<sup>6)</sup>。この段階で鞭毛虫が観察できたにもかかわらず、この後の PCR が陰性になったときは、PCR がうまくいかなかった可能性があるため、原因を考えてやり直すか、病理組織による診断を試みる。軟化した被嚢は比較的簡単にハサミやメスで切断することができる。短冊状に細切するときハサミを用いると切断面を押しつぶして鞭毛虫の遊走を阻害する可能性があるため新しいメスやカミソリの使用を推奨する。

診断を急ぐとき、あるいは凍結サンプルしか入手できない時は軟化した被嚢をできる限り小片に細切し、直ちに PCR 検査に用いてもよい<sup>7)</sup>。

## ② 病理組織検査のための採材

軟化した被嚢の数カ所から 1～2cm 角の被嚢片を切り取り、10～20 倍量の Davidson の固定液に浸漬する。鞭毛虫の感染密度は被嚢の部分によって異なっており、バッチ状に分布していることが多いため、同一個体から場所を変えて 3 カ所程度から被嚢片をサンプルする。固定液はサンプリング直前まで冷蔵庫か水中で冷やしておき、サンプルを投入したら 30 分程度はゆっくり攪拌する。その後一晩置いた後、70% エタノールで 1 時間程度洗い、さらに新しい 70% エタノールに置換して保存する。

### ・Davidson の固定液の組成

95% エチルアルコール	33 mL
市販のホルマリン原液	22 mL
100% 酢酸（氷酢酸）	11.5 mL
<u>蒸留水</u>	<u>33.5 mL</u>
合計	100 mL

なお、上記は全量を 100 に合わせるためのもので、簡便に

95% エタノール：ホルマリン原液：氷酢酸：蒸留水を体積比 3:2:1:3 の割合で混合してもよい。作製した本固定液は 4℃で保存すれば 2 ヶ月程度は使用可能である。

## 3. 診断手順

### (1) PCR 検査（一次診断および確定診断共通）

- ① 軟化被嚢を一晩浸漬し、鞭毛虫を遊走させた海水（2. (2) ①参照）1mL を 1.5mL チューブに入れて遠心分離する（10,000rpm 15 分）。
- ② 遠心分離後、上清を捨て、チューブに残った沈渣を材料として、DNeasy Blood & Tissue kit（キアゲン）等の市販の DNA 抽出キットを使い、DNA を抽出する<sup>6)</sup>。抽出方法はキットのマニュアルに従う。被嚢を直接使用する場合は、細切した被嚢から直接キットを用いて DNA を抽出する<sup>7)</sup>。
- ③ 陰性対照として、可能であれば健康な被嚢を同様に処理したものを準備する。困難

な場合には蒸留水やバッファ等を用いる。陽性対照には *A. hoyamushi* から抽出した DNA、あるいは PCR により増幅した DNA 断片を用いる。

④ プライマーおよび反応条件<sup>7)</sup>

・プライマー

ProtoHoya 18S-145 : 5'-AAG GGG TGC TTC CGA TCC GTG G-3'

ProtoHoya 18S-679r : 5'-AAG GAT GGG ACG GAA CCG ACT GC-3'

増幅産物サイズ ; 535bp

・反応液組成 (1 検体分)

(試薬)	(容量)	(終濃度)
Phusion Polymerase	0.2 μL	0.02U/ μL
dNTPMixture (10mM each)	0.4 μL	200μM each
5x Phusion HF Buffer	4.0 μL	1x
dDW(滅菌蒸留水)	13.0 μL	
ProtoHoya 18S-145 (10μM)	0.2 μL	0.1μM
ProtoHoya 18S-679r (10μM)	0.2 μL	0.1μM
テンプレート DNA	2.0 μL	
合 計	20 μL	

・使用酵素 : Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific)

・PCR 反応条件

初期の変成	98°C	30sec.
以下、変成～伸長を	40 サイクル	
変成	98°C	10sec.
アニーリングと伸長	72°C	30sec.
最後の伸長	72°C	5min.

⑤ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 1.5% 程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。

⑥ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータにより塩基数 535 bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。

(2) PCR 検査 (確定診断)

① 軟化被囊を一晚浸漬し、鞭毛虫を遊走させた海水 (2. (2) ①参照) 1 mL を 1.5 mL チューブに入れて遠心分離する (10,000rpm 15 分)。

② 遠心分離後、上清を捨て、チューブに残った沈渣を材料として、DNeasy Blood & Tissue kit (キアゲン) 等の市販の DNA 抽出キットを使い、DNA を抽出する<sup>6)</sup>。抽出方法はキットのマニュアルに従う。被囊を直接使用する場合は、細切した被囊から直接キットを用いて DNA を抽出する<sup>7)</sup>。

③ 陰性対照として、可能であれば健康な被囊を同様に処理したものを準備する。困難

な場合には蒸留水やバッファ等を用いる。陽性対照には *A. hoyamushi* から抽出した DNA、あるいは PCR により増幅した DNA 断片を用いる。

④ プライマーおよび反応条件 4)

・プライマー

AhF : 5'-GCC TCT GTG GTT TGC TCC TTC GTG T -3'

AhR : 5'-TAC TGG GCG GCT TGG ATC TCG T-3'

増幅産物サイズ ; 642bp

・反応液組成 (1 検体分) の例

(試薬)	(容量)	(終濃度)
TaKaRa Ex <i>Taq</i> (5units/ $\mu$ L)	0.25 $\mu$ L	0.025units/ $\mu$ L
dNTPMixture(2.5mM each)	4.0 $\mu$ L	200 $\mu$ M each
10x Ex <i>Taq</i> Buffer	5.0 $\mu$ L	1x
dDW(滅菌蒸留水)	37.25 $\mu$ L	
AhF (100 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ M
AhR (100 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ M
テンプレート DNA	2.5 $\mu$ L	
合 計	50 $\mu$ L	

・使用酵素 : TaKaRa Ex *Taq* HS (タカラバイオバイオ)

・PCR 反応条件

初期の変成	95 $^{\circ}$ C	3min.
以下、変成～伸長を	40 サイクル	
変成	95 $^{\circ}$ C	1min.
アニーリング	64 $^{\circ}$ C	34sec.
伸長	72 $^{\circ}$ C	1min.
最後の伸長	72 $^{\circ}$ C	5min.

⑤ PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 1.5% 程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。

⑥ 臭化エチジウム存在下でトランスイルミネータにより塩基数 642bp に相当する位置に増幅産物のバンドの有無を確認する。

(3) 病理組織学的検査 (一次診断および確定診断共通)

① 2 (2) ②のサンプルを常法によりパラフィン包埋する。このとき、切片は被囊の表面に対し垂直な断面を観察できるように、包埋の方向を考慮する。

② 通常通り 3 ~ 4 $\mu$ m (できれば 3 $\mu$ m) の厚さで切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、被囊中にヘマトキシリンに染まる鞭毛虫 *A. hoyamushi* を観察する (写真 5 ~ 7)。原因鞭毛虫の大きさは鞭毛を除いて長径 10-14mm, 短径 2-3mm であり、体前後に 2 本の鞭毛を持つが、病理組織では通常虫体の片側が細く

なりそこから伸びた1本の鞭毛しか観察されない。HE染色に加えてMay Grunwald-Giemsa (MG)染色を施した切片を作製してもよい。後者の染色では被囊繊維が強く紫に染まり、繊維の走行状態がよくわかる。また、鞭毛虫も十分染色される。HE染色は簡単だが、比較的退色しやすい。MGは退色しにくく、染色が長期間保たれる。

#### 4. 確定診断のための増養殖研究所への試料の送付方法

##### (1) PCR用試料:

PCR用の標本は軟化した被囊あるいは一次診断のため抽出したDNAのいずれかを送付する。

- ① 被囊片を送付する場合は、1個体あたり2～3箇所から軟化した被囊を数センチ角に切り取ってビニール袋等に入れ、凍結ないし冷蔵で送付する。週末等をはさみ、送付に時間がかかるときは凍結で送付する。
- ② 抽出DNAを送付する場合は凍結して送付する。

##### (2) 病理組織用試料

2(2)②に従って固定後70%エタノール中に保存した被囊片を送付する。送付は冷蔵便、室温のどちらでもかまわない。

#### 5. 参考文献

- 1) Hirose, E., A. Nozawa, A. Kumagai, and S. Kitamura (2012): *Azumiobodo hoyamushi* gen. nov. et sp. nov. (Euglenozoa, Kinetoplastea, Neobodonida): a pathogenic kinetoplastid causing the soft tunic syndrome in ascidian aquaculture. *Dis. Aquatic. Org.*, 97, 227-235.
- 2) Jung, S. J., Oh, M. J., Date, T. and Suzuki, S. (2001): Isolation of marine birnavirus from sea squirts *Halocynthia roretzi*. In "The biology of ascidians" (ed. by Sawada, H., Yokosawa, H. and Lambert, C. C.) Springer-Verlag, Tokyo, pp. 436-411.
- 3) Kumagai, A., S. Atsushi, I. Ito, T. Tanabe, K. Takahashi, T. Kamaishi, and S. Miwa (2010): Mass mortality of cultured ascidians *Halocynthia roretzi* associated with softening of the tunic and flagellate-like cells. *Dis. Aquat. Org.*, 90, 229-240.
- 4) Kim, H-J., Park, J. S., Park, K. H., Shin, Y-K. and Park K-I. (2014): The kinetoplastid parasite *Azumiobodo hoyamushi*, the causative agent of soft tunic syndrome of the sea squirt *Halocynthia roretzi*, resides in the East Sea of Korea. *J. Invert. Pathol.*, 116, 36-42.
- 5) Park, K. H., Zeon, S-R., Lee, J-G., Choi, S-H., Shin, Y. K. and Park, K-I. (2014): In vitro and in vivo efficacy of drugs against the protozoan parasite *Azumiobodo*

*hoyamushi* that causes soft tunic syndrome in the edible ascidian *Halocynthia roretzi* (Drasche). *J. Dish. Dis.*, 37, 309-317.

6) 熊谷 明 (2012) 魚類防疫技術書：マボヤの被囊軟化症 診断・防疫マニュアル。(農林水産省委託事業による) 養殖衛生対策推進協議会

7) Kumagai, A. and Kamaishi, T. (2013): Development of polymerase chain reaction assays for detection of the kinetoplastid *Azumiobodo hoyamushi*, the causative agent for soft tunic syndrome in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Fish. Pathol.*, 48, 42-47.



写真1 健康なマボヤ个体 (左) と被囊軟化症を重篤に発症した个体 (右)。発症した个体は被囊に張りが無く萎縮しているように見える。発症初期には水管部分のみが軟化する。(熊谷明博士提供)



写真2 滅菌海水中に浸漬した細切した被囊片。(熊谷明博士提供)

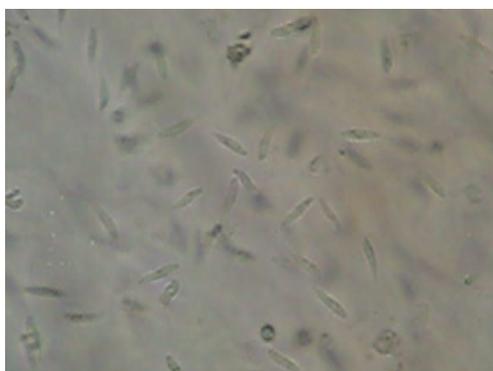


写真3 海水中に遊走してきた鞭毛虫 *A. hoyamushi*。(熊谷明博士提供)

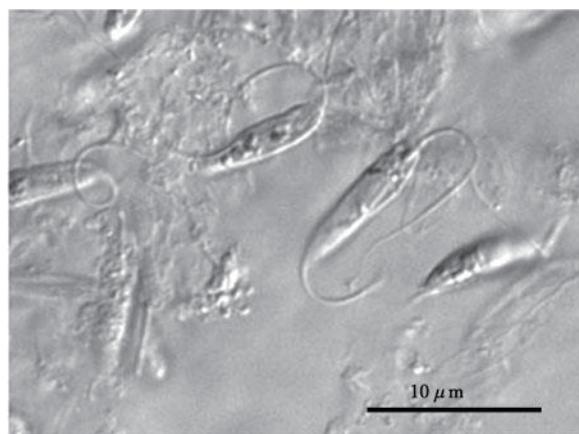


写真4 *A. hoyamushi* の微分干渉顕微鏡による強拡大写真。鞭毛が2本あることが明らか。(熊谷明博士提供)

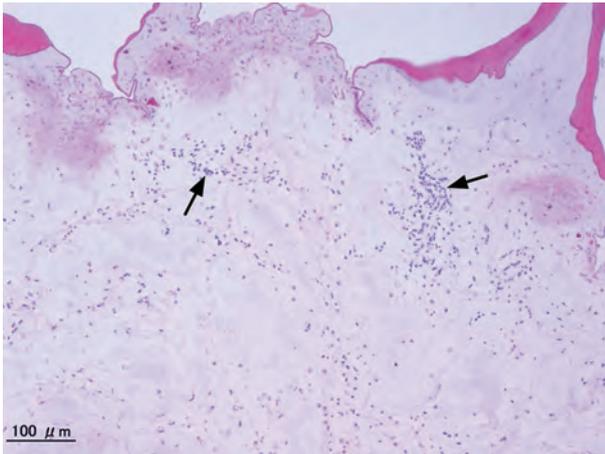


写真5 軟化した水管周辺の被嚢の病理組織写真 (HE 染色)。A. hoyamushi が青紫に点々と染まって見える (矢印)。必ずしも紡錘形には見えない。(三輪 理博士提供)

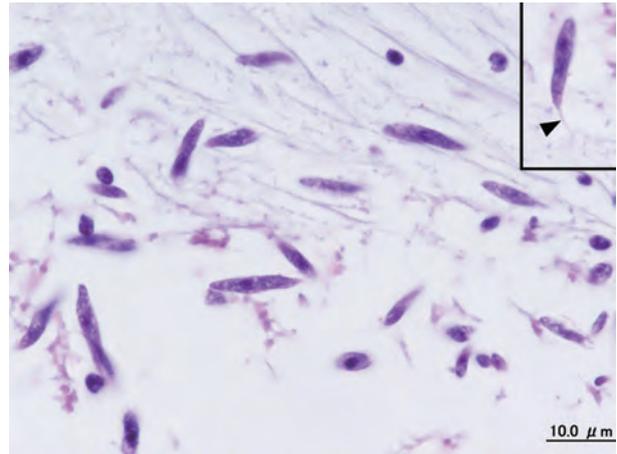


写真6 被嚢中の原因鞭毛虫 A. hoyamushi の強拡大 (HE 染色)。この写真の中の細胞はすべて鞭毛虫である。断面が切れているものは丸く小さく見える。また、鞭毛虫は変形するため、しばしば不定形に固定され、この写真のようにきれいに紡錘形に見えるケースのほうが少ない。細長くすじ状に見えるのは被嚢の繊維。挿入図は鞭毛を示す (矢頭)。通常病理組織では鞭毛は2本あるうちの1本しか観察されない。(三輪 理博士提供)

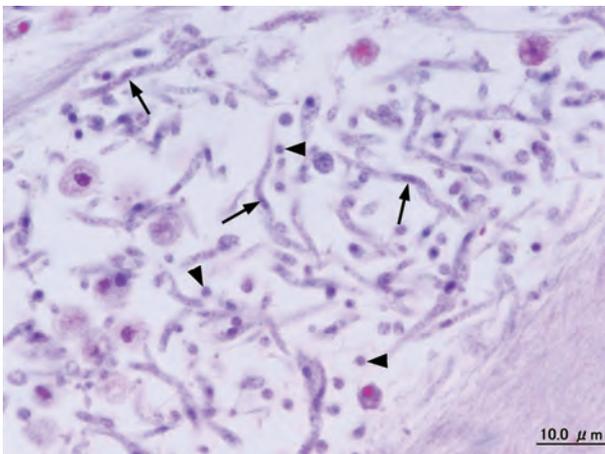


写真7 まれに、ここに示すように被嚢中に他の原虫が観察されることがある (矢印) (HE 染色)。矢頭で示すのは断面が切れている。この原虫は同倍率の写真6と比較して A. hoyamushi より明瞭に細長く、形態的にはっきり区別できる。(三輪 理博士提供)



## 特定疾病診断マニュアル 病性鑑定資料 執筆者

国立研究開発法人水産研究・教育機構 増養殖研究所

伊東尚史 稲田真理	ウイルス性出血性敗血症 (IV a 型を除く。) イエローヘッド病 伝染性筋壊死症 鰓随伴ウイルス病
河東康彦 桐生郁也	サケ科魚類のアルファウイルス感染症 コイ春ウイルス血症 アワビの細菌性膿疱症
栗田 潤 坂井貴光	流行性造血器壊死症 ピシリケッチア症 レッドマウス病
嶋原佳子 高野倫一 松山知正 三輪 理	カキヘルペスウイルス $\mu$ Var 感染症 アワビヘルペスウイルス感染症 アワビの細菌性膿疱症 タウラ症候群 伝染性皮下造血器壊死症 バキュロウイルス・ペナエイ感染症 モノドン型バキュロウイルス感染症 マボヤの被囊軟化症
米加田徹 湯浅 啓 山崎雅俊	エビの潜伏死病 コイヘルペスウイルス病 壊死性肝臓炎

国立大学法人東京大学大学院農学生命科学研究科

伊藤直樹 横山 博	ホタテガイのパーキンサス・クグワディ感染症 旋回病 マダイのガルゲア症
--------------	---

国立大学法人東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科

廣野育生	急性肝すい臓壊死病
------	-----------

(敬称略)

注：本書に掲載した文章ならびに写真の権利は執筆者および写真提供者・機関に帰属します。許可なく転載することを固く禁じます。

## 特定疾病診断マニュアル

発行：平成 28 年 10 月

編集：公益社団法人日本水産資源保護協会

〒104-0044 東京都中央区明石町 1-1 東和明石ビル 5F

本マニュアルは農林水産省委託事業 平成 28 年度水産防疫対策委託事業「養殖衛生管理技術者の養成」事業において作成いたしました。