

II 病性鑑定指針

1 魚 類

(1) 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>
水 産 技 術 研 究 所	<pre> graph TD M["(4) ② (ア)培養細胞によるウイルス分離 ((4) ① (ア)と同じ)"] --- N["(+)"] M --- O["(-)"] N --- P["(4) ② (イ)間接蛍光抗体法及び (4) ② (ウ)遺伝子配列解析"] P --- Q["(+)"] P --- R["(-)"] </pre>
判 定	--+---
その他	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。

疾病名：ウイルス性出血性敗血症（IVa 型を除く。）

Viral haemorrhagic septicaemia (excluding Genotype IVa) : VHS

病原体：Novirhabdovirus piscine（ラブドウイルス科ノビラブドウイルス属）

※国際ウイルス分類委員会では上記の学名となっているが、論文等ではこれまでに用いられてきた Viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) と記載されている場合が多い。

（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*)、ノーザンパイク (*Esox Lucius*)、ターボット (*Scophthalmus aquosus*)、カラスガレイ (*Reinhardtius hippoglossoides*)、マスキーパイク (*E. masquinongy*)、ブルーギル (*Lepomis macrochirus*)、コクチバス (*Micropterus dolomieu*) 等 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種苗は上記の地域から輸入した、又はその種苗と接触した可能性がある。

④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腎臓及び肝臓に充血、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 細胞又は 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 細胞又は 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（WOAH））及び遺伝子型 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合せにより、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 IP 5 B11 及び 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、脳又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又は腎臓、脾臓、心臓、脳若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 ウイルス特異抗体及び遺伝子型 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初動診断を実施することができる。

(7) 消毒

①30%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)
- ②2.5%フェノールで5分間の消毒 (PBS (-)、人工海水)
 - ③0.1%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できる。
- ③初動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。

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

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) ① RT-PCR 検査"] D --- E["(+, ±)"] D --- F["(-)"] </pre>
水産技術研究所	<pre> graph TD E["(+, ±)"] --- G["(4) ② (ア) RT-PCR 検査 ((4) ①に同じ)"] G --- H["(+)"] G --- I["(-)"] H --- J["(4) ② (イ) 遺伝子配列解析"] J --- K["(+)"] J --- L["(-)"] I --- M["-"] L --- N["-"] </pre>
判定	+ - - -
その他	

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：Alphavirus salmon（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*）及び
ブラウントラウト（*S. trutta*）（人為感染）。

注：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；

E 2 F：5' -CCG-TTG-CGG-CCA-CAC-TGG-ATG- 3'

E 2 R：5' -CCT-CAT-AGG-TGA-TCG-ACG-GCA-G- 3'

増幅産物サイズ；516bp

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 E 2 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脾臓分泌腺組織の激しい変性（急性）が認められる。

②脾臓分泌腺組織の消失及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化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化が認められる。

(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。

(3) 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	<pre> graph TD A["(1) 疫学調査"] --- J1(()) B["(2) 臨床検査"] --- J1 J1 --- C["(3) 剖検"] 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 PCR-REA 検査"] D --- F["(-)"] D --- G["(+, ±)"] F --- H["(4) ② (イ) 培養上清の PCR-REA 検査 (又は) (4) ② (ウ) 培養上清の PCR-遺伝子配列解析"] G --- H H --- I["(+)"] H --- J["(-)"] E --- K["(+, ±)"] E --- L["(-)"] K --- M["(4) ② (ア) 培養細胞によるウイルス分離"] M --- N["(4) ② (イ) 培養上清の PCR-REA 検査 (又は) (4) ② (ウ) 培養上清の PCR-遺伝子配列解析"] N --- I N --- J </pre>
水 産 技 術 研 究 所	<pre> graph TD M["(4) ② (ア) 培養細胞によるウイルス分離"] --- N["(4) ② (イ) 培養上清の PCR-REA 検査 (又は) (4) ② (ウ) 培養上清の PCR-遺伝子配列解析"] N --- I["(+)"] N --- J["(-)"] </pre>
判 定	— — + — —
その他	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。

疾病名：流行性造血器壊死症

Epizootic haematopoietic necrosis : EHN

病原体：Epizootic haematopoietic necrosis virus (*Ranavirus perca1*) (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*) 等も感受性を示す。
- ②発生地域：オーストラリア。
- ③種苗は上記の地域から輸入したものである。
- ④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 11～20℃であるが、レッドフィンパーチ成魚は 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。
 - ③0才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、腎臓若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；*Pfi* I

反応；添付バッファーを用いて 37℃、2 時間。

判定；WOAH 診断マニュアルにある切断パターン（表 1）と一致することを確認する。

表 1 PCR 増幅産物の制限酵素切断パターン（切断後のバンドサイズ）

プライマー	制限酵素	切断後の断片のサイズ	判定
MCP-1 セット (M151、M152)	<i>Pfi</i> I	321 131、190	陽性 陰性

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；WOAH 診断マニュアルにある各制限酵素による切断パターン（表 2）と一致することを確認する。

表 2 PCR 増幅産物の制限酵素切断パターン（切断後のバンドサイズ）

プライマー	制限酵素	切断後の断片のサイズ	判定
MCP-2 セット (M153、M154)	<i>Hinc</i> II	100、138、387	陽性
		100、525	陰性
		100、240、285	陰性
	<i>Acc</i> I	238、387	陽性
		625	陰性
		164、461	陰性
	<i>Fnu</i> 4H I	33、38、44、239、271	陽性
		3、33、44、108、399	陰性
		1、38、44、108、432	陰性
		3、9、44、108、151、272	陰性
		3、44、71、108、399	陰性

(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'-CGCAGTCAAGGCCTTGATGT-3'

Reverse primer：5'-AAAGACCCGTTTGCAGCAGCAAAC-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 EHN 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。

(4) ピシリケッチア症
Piscirickettsiosis

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) スタンブ標本のギムザ染色"] D -- "(+、±)" --> E["(4) ① (イ) 臓器からの PCR 検査"] D -- "(-)" --> F["(-)"] E -- "(+、±)" --> G["(4) ② 臓器からの PCR 検査"] E -- "(-)" --> H["(-)"] F --> I["(-)"] </pre>
水産技術研究所	<pre> graph TD G["(4) ② 臓器からの PCR 検査"] -- "(+)" --> J["+"] G -- "(-)" --> K["(-)"] F["(-)"] -- "(不明病として検査)" --> K </pre>
判定	+ - -
その他	国内で発生が確認された場合、既知のピシリケッチア株との比較のため、別途、培養細胞等を用いて分離培養を行うことが望ましい。

疾病名：ピシリケッチア症

Piscirickettsiosis

病原体：*Piscirickettsia salmonis* (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*) 等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、ヨーロピアンシーバス (*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・大西洋沿岸及びアメリカ太平洋側 (ヨーロピアンシーバス)。
- ③種苗は上記の地域から輸入したものである。
- ④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

肝臓及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；

RTS 1：5'-TGA-TTT-TAT-TGT-TTA-GTG-AGA-ATG-A-3'

RTS 4：5'-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、培養細胞や寒天培地を用いて分離培養を行うことが望ましい。

(5) レッドマウス病
Enteric redmouth disease

担 当	検 査 チ ャ ー ト
都 道 府 県	<pre> graph TD A["(1) 疫学調査"] --- J1(()) B["(2) 臨床検査"] --- J1 J1 --- C["(3) 剖検"] C --- D["(4) ① (ア) TSA培地による細菌の分離^{注1}"] D --- E["(4) ① (イ) 性状検査^{注2}"] E --- J2(()) J2 -- "(+、±)" --> F["(4) ① (ウ) 分離コロニーのPCR検査"] J2 -- "(-)" --> G[] F --- J3(()) J3 -- "(+、±)" --> H[] J3 -- "(-)" --> I[] G --- I style G fill:none,stroke:none style I fill:none,stroke:none </pre>
水 産 技 術 研 究 所	<pre> graph TD J4(()) --- K["(4) ② 分離コロニーのPCR検査"] K --- L(()) L -- "(+)" --> M[] L -- "(-)" --> N[] style M fill:none,stroke:none style N fill:none,stroke:none </pre>
判 定	+ - - -
その他	注 1：分離培地はTSA培地を原則とするが、他の培地で分離されたコロニーでも性状検査及び分離コロニーのPCR検査でレッドマウス病が疑われた場合は初動診断を陽性とする。 注 2：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。

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 schrenckii*）、シベリアチョウザメ（*Acipenser baerii*）、ナマズ（*Ictalurus punctatus*）、パーチ（*Perca fluviatilis*）、ティラピア（*Oreochromis niloticus*）等からも分離される。
- 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、トルコ及び日本。
（日本では、2015年及び2025年に種苗生産施設で2度確認されたのみ。）
- ③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、腸後部等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。
なお、分離培地はTSA培地を原則とするが、他の培地で分離されたコロニーでも性状検査及び分離コロニーのPCR検査でレッドマウス病が疑われた場合は初動診断を陽性とする。
（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；
YER 3：5'-CGA-GGA-GGA-AGG-GTT-AAG-T-3'
YER 4：5'-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；

Ruck 1 : 5' -CAG-CGG-AAA-GTA-GCT-TG- 3'

Ruck 2 : 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、脾臓腫大等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。

(6) 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"] --- J1(()) B["(2) 臨床検査"] --- J1 J1 --- C["(3) 剖検"] 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["(-)"] G --- J2(()) H --- J2 J2 --- K["(4) ② (ア) 病理組織検査"] J2 --- L["(4) ② (イ) Nested-PCR"] </pre>
水産技術研究所	<pre> graph TD K["(4) ② (ア) 病理組織検査"] --- M["(-)"] K --- N["(+)"] L["(4) ② (イ) Nested-PCR"] --- O["(+)"] L --- P["(-)"] </pre>
判定	— — + + — —
その他	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。

疾病名：旋回病

Whirling disease

病原体：*Myxobolus 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、ブラウントラウト（*Salmo trutta*）は比較的感受性が低い。
- ②発生地域：ヨーロッパ諸国、ロシア及び南北アメリカ。
- 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頭骨の変形、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℃pH 4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～一晚）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ね、1200g30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等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；

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

Tr 3-16 : 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 ;

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

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

増幅産物サイズ ; 415bp

反応 ; (4)②(イ) 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。
- ②90℃以上の温度で10分間の処理。
- ③24時間以上の乾燥。天日干しが理想的。
- ④500ppm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。

(7) 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"] --- J1(()) B["(2) 臨床検査"] --- J1 J1 --- C["(3) 剖検"] C --- D["(4) ① (ア) RT-PCR検査"] C --- E["(4) ① (イ) 細胞培養によるウイルス分離"] D --- F["(+, ±)"] D --- G["(-)"] F --- H["(4) ① (ウ) RT-PCR検査 (場合によりnested)"] H --- I["(+, ±)"] H --- J["(-)"] G --- E E --- K["(+, ±)"] E --- L["(-)"] K --- H L --- JUDG1["判定"] I --- JUDG2["判定"] J --- JUDG3["判定"] </pre>
水 産 技 術 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["(+)", "(-)"] F --- JUDG4["判定"] D --- JUDG5["判定"] </pre>
判 定	+ - - - -
その他	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。

疾病名：コイ春ウイルス血症

Spring viraemia of carp: SVC

病原体：Sprivivirus cyprinus (ラブドウイルス科スプリビウイルス属)

※通称：Spring viraemia of carp virus (SVCV)

(1) 疫学調査

- ①宿主域：コイ (*Cyprinus carpio*)、キンギョ (*Carassius auratus*)、ソウギョ (*Ctenopharyngodon idella*)、コクレン (*Aristichthys nobilis*)、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)、ゴールデンシャイナー (*Notemigonus crysoleucas*)、ヨーロッパオオナマズ (*Silurus glanis*) 等が知られている。
- ②発生地域：ヨーロッパ諸国、旧ソ連、ブラジル、米国、カナダ、中国及びメキシコ。
- ③種苗は上記の地域から輸入したものである。
- ④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、腹部脂肪組織等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更に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；

SVCVF 1：5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR*-R*TC-3'

SVCVR 2 : 5' -AGA-TGG-TAT-GGA-CCC-CAA-TAC-ATH*-A
CN*-CAY*- 3'

R* : A又はG

H* : A、C又はT

N* : A、C、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、C、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) 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又は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)		有り	
	クレゾール	0.25% (30秒)		有り	
	有効塩素 (サラシ粉など)	540ppm (30秒)	室内では2日 屋外では毎日	極めて強い	※1
池 (泥底)	有効塩素 (サラシ粉など)	540ppm (20分)	使用の都度	極めて強い	※2
池 (コンクリート)	有効塩素 (サラシ粉など)	540ppm (20分)	使用の都度	極めて強い	※3
池水	有効塩素 (サラシ粉など)	540ppm (20分)	使用の都度	極めて強い	※4
器具, 器材, 網 類, 衣類	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) 又は0.035% (20分)		有り	
	グルコン酸クロルヘキシジン	0.0175% (30秒) 又は0.01% (20分)		有り	
	クレゾール	0.25% (30秒) 又は0.02% (20分)		有り	
	熱湯	56℃以上 (30分)			
車	アルキルトルエン	0.05% (30秒) 又は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) 又は0.01% (20分)		有り	
	クレゾール	0.25% (30秒) 又は0.02% (20分)		有り	

WOAHマニュアル (2023) 及び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。WOAH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实际的でない。7.6ppm20分で99-99.9%のウイルスが不活化されるというデータ（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場合には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：池を排水してジョウ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。屋内の場合はサラシ粉の2倍量の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。

(8) 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>
水 産 技 術 研 究 所	<pre> graph TD H["(4) ②PCR検査"] --- I["(+)", style I, fill:none,stroke:none"] H --- J["(-)", style J, fill:none,stroke:none"] </pre>
判 定	<pre> graph TD K["+"] L["-"] M["-"] </pre>
その他	国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術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の検査を水産技術研究所に代わって行うことができるものとする。

疾病名：コイヘルペスウイルス病

Koi herpesvirus disease：KHVD

病原体：Cyprinus cyprinid herpesvirus 3（アロヘルペスウイルス科サイウイルス属）

※国際ウイルス分類委員会では上記の学名となっているが、論文等ではこれまでに用いられてきたCyprinid herpesvirus 3（CyHV-3）またはKoi herpesvirus（KHV）と記載されている場合が多い。

（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、日本等。
- ③水温20～25℃程度で発生する。
- ④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、平衡感覚失調等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、眼球の落ち込み等が認められる。
- 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、カラムナリス菌等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

- ・15wの紫外線ランプ一灯で、毎秒1L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5cm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の消毒液をジョウ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3ppm（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则効果的である。
- ・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。

コイヘルペスウイルス病対策のための消毒方法早見表

消毒する物	有効成分	使用濃度	消毒液の更新	魚毒性	使用上の注意
手	塩化ベンザルコニウム (逆性石けんなど)	0.1%	2～3日 汚れてきたら 早めに交換	有り ただし、濃厚液 が直接池に入ら ない限りなし。	手あかなどで液が汚れてきたら効果なし。 エタノールはスプレーで使用する则効果的。
	エタノール	70%			
長靴 器具、器材	塩化ベンザルコニウム (逆性石けんなど)	0.1%	2～3日 汚れてきたら 早めに交換	有り	手あかなどで液が汚れてきたら効果なし。
	有効塩素 (サラシ粉など)	200ppm			
池 (泥底)	有効塩素 (サラシ粉など)	200ppm		極めて強い	底面の泥がかぶるように水を張り、その水の有効塩素を200ppmにする。 数日で、残留塩素はなくなるが、排水の前に残留塩素がないことを確認する。
池 (コンクリート)	有効塩素 (サラシ粉など)	200ppm	使用の都度	極めて強い	池の水を排して、ジョウロなどで、まんべんなく散布する。 下流の流出には厳重に注意する (残留塩素がないことを確認する)。 雨天には消毒しない。
池水	有効塩素 (サラシ粉など)	3ppm		強い	消毒液を所定の濃度になるように池に入れ、よく攪拌する。 塩素濃度を測定しながら、30分以上、所定の濃度を保つ。 数日で、残留塩素はなくなるが、排水の前に残留塩素がないことを確認する。
網類・衣類	塩化ベンザルコニウム (逆性石けんなど)	0.1%	1回の使用で 捨てる	有り	網類は消毒後水洗いして使う。
	熱湯	60～100℃			
車	塩化ベンザルコニウム (逆性石けんなど)	0.1%	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。

農林水産技術会議先端技術を活用した農林水産研究高度化事業成果 (魚病研究、第40巻第3号、137-138に発表) を基に作成

(9) 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	<pre> graph TD A["(1) 疫学調査"] --- C["(3) 剖検"] B["(2) 臨床検査"] --- C C --- D["(4) 孢子標本の顕微鏡観察"] D -- "(-)" --> E["—"] D -- "(+、±)" --> F["(5) 遺伝子配列解析"] F -- "(+)" --> G["+"] F -- "(-)" --> H["—"] </pre>
水 産 技 術 研 究 所	(5) 遺伝子配列解析 (+) (-)
判 定	— + —
その他	初動診断法の孢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。

疾病名：マダイのグルゲア症

Glugeosis of red sea bream

病原体：*Glugea pagri* (微孢子虫門グルゲア科グルゲア属)

(1) 疫学調査

宿主域：マダイ (*Pagrus major*)。微孢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。

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

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 (pH6.8) 等で染色したのち観察する。長卵形 (平均長径 $7.9\mu\text{m}$ ×平均短径 $2.9\mu\text{m}$) と卵形 (平均長径 $4.4\mu\text{m}$ ×平均短径 $2.5\mu\text{m}$) 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%)。

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シーケンサーを用いて、PCR産物のダイレクトシーケンスによるか、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みられる。

(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ほか、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

(1) イエローヘッド病
Yellow head disease (YHD)

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) ①RT-PCR検査"] D --- E["(-)"] D --- F["(+、±)"] E --- G["判定: -"] F --- H["(4) ②Nested-PCR検査 及び配列解析"] H --- I["(+)", "(-)"] I --- J["判定: +, -"] </pre>
水 産 技 術 研 究 所	(4) ②Nested-PCR検査 及び配列解析 (+) (-)
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は、別途、病理組織の観察を行うことが望ましい。

疾病名：イエローヘッド病

Yellow head disease : YHD

病原体：*Okavirus flavicapitis* (ロニウイルス科オカウイルス属)

(1) 疫学調査

- ①病原体：本疾病は*Okavirus flavicapitis* (以下、YHV)に起因する。
- ②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 (*P. japonicus*)、テンジクエビ (バナナエビ) (*P. 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 (ホワイトレッグシュリンプ、バナメイエビ) (*P. vannamei*)、ブルーシュリンプ (*P. stylirostris*)、ブラウンシュリンプ (*P. aztecus*) 等の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、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、タイ及びベトナム。
- ④感染ステージ：YHVは、ポストラーバ (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；

GY 1 : 5' -GAC-ATC-ACT-CCA-GAC-AAC-ATC-TG- 3'

GY 4 : 5' -GTG-AAG-TCC-ATG-TGT-GTG-AGA-CG- 3'

増幅産物サイズ；794bp

PCR反応；抽出した核酸及び対照RNAをテンプレートとして、上記のプライマーセット (GY 1 /GY 4) 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) ②i) 1st PCRの増幅産物プライマー；

GY 2 : 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及び
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 2 μ m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。

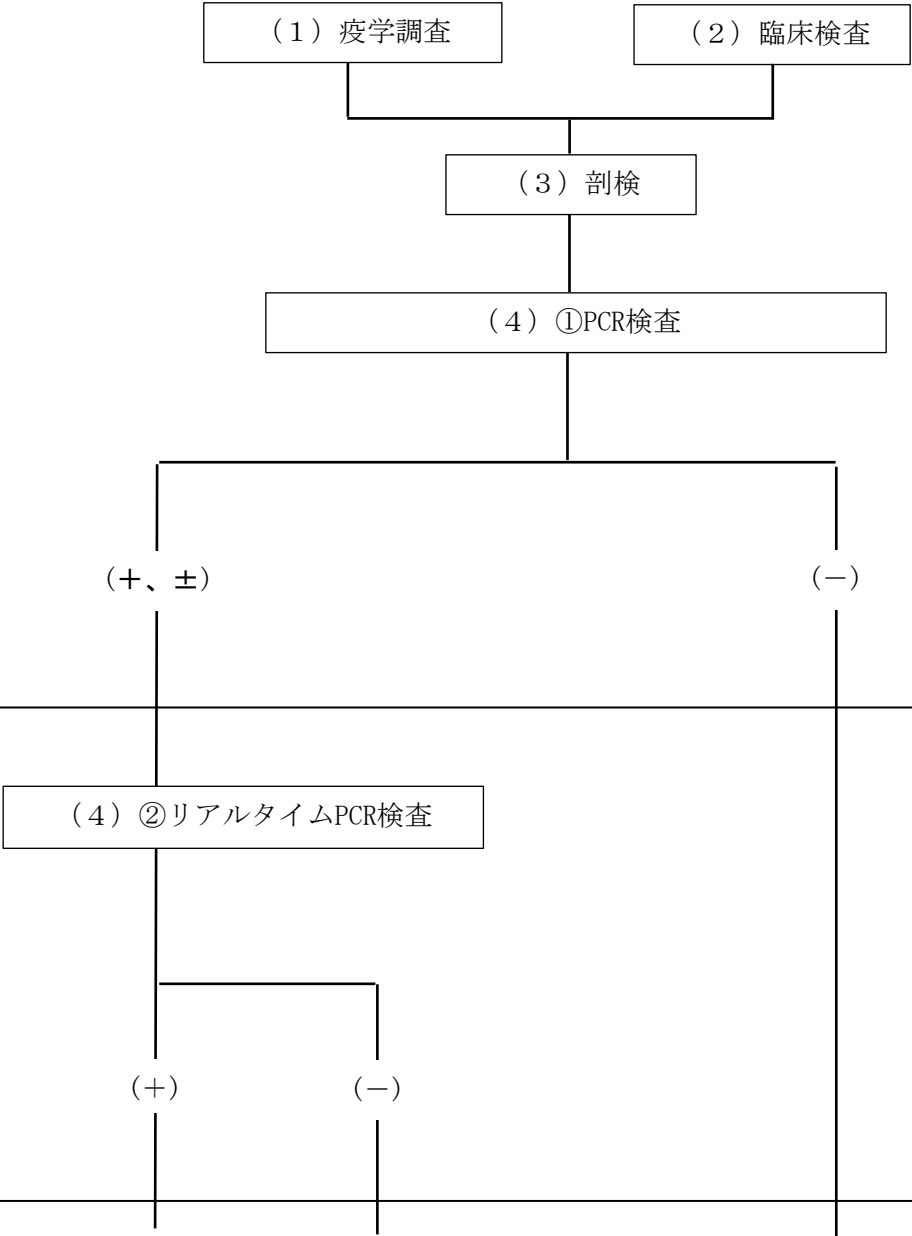
(7) 消毒

- ①60℃15分の加熱処理で不活化される。
- ②30ppt (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。

(2) 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 C["(2) 臨床検査"] --- B B --- D["(3) 剖検"] D --- E["(4) ①PCR検査"] E --- F["(+、±)"] E --- G["(-)"] F --- H["(4) ②リアルタイムPCR検査"] H --- I["(+)"] H --- J["(-)"] I --- K["+"] J --- L["-"] G --- L </pre>		
水 産 技 術 研 究 所			
判 定	+	-	-
その他			

疾病名：壊死性肝膵炎

Necrotising hepatopancreatitis : NHP

病原体：*Hepatobacter penaei*、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病原体：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*Penaeus*属のエビは宿主になると思われるが、当該細菌に感受性
が高いのは、シロアシエビ (ホワイトレグシュリンプ、バナメイエビ)
(*P. vannamei*) である。その他に、ブルーシュリンプ (*P. stylirostris*) ノースブ
ラウンシュリンプ (*P. aztecus*)、ノーザンホワイト (*P. Setiferus*)、
P. marginatus、バナナエビ (*P. merguensis*)、ウシエビ (*P. monodon*)、ノーザ
ンピンク (*P. duorarum*) についても感受性があると思われる。アメリカンロブスタ
ー (*Homarus americanus*) においては感染の確認はされていないが、PCRで陽性を示
すことがある。

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、ニカラグア、パナマ、
ペルー及びアメリカ合衆国。

④バナメイエビでは稚エビ、親エビの感染が報告されている。

⑤塩分濃度の上昇 (約40ppt) 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、摂餌量の減少、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、消化管は空で摂餌物がみられない。

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；

NHPF 2：5' -CGT-TGG-AGG-TTC-GTC-CTT-CAG-T- 3'

NHPR 2：5' -GCC-ATG-AGG-ACC-TGA-CAT-CAT-C- 3'

増幅産物サイズ；379bp

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。

または

プライマー；

FlgE1143F: 5' -AGG-CAA-ACA-AAC-CCT-TG- 3'

FlgE1475R: 5' -GCG-TTG-TTG-TTG-GGA-AAG-TT- 3'

増幅産物サイズ；333bp

PCR反応；最初に95℃で5分、次に95℃で30秒、62℃で30秒、72℃で30秒を35サイクル、最後に72℃で5分間。

②最終診断法：リアルタイムPCR検査

材料；肝脾臓組織の抽出DNA。

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'

TaqManプローブ；

NHP: 5' -FAM-CCG-CCC-GTC-AAG-CCA-TGG-AA-TAMRA- 3'

増幅産物サイズ；67bp

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

または

プライマー；

NHPF 2 gE 3 qF: 5' -AAC-ACC-CTG-TCT-CCC-CAA-TTC- 3'

NHPF 1 gE 3 qR: 5' -CCA-GCC-TTG-GAC-AAA-CAC-CTT- 3'

TaqManプローブ；

NHP: 5' -FAM-CGC-CCC-AAA-GCA-TGC-CGC-TAMRA- 3'

増幅産物サイズ；63bp

リアルタイムPCR反応；最初に95℃で20秒、次に95℃で1秒、60℃で20秒を40サイクル。

(5) 病理組織学的所見

病気の進行により、発症期、急性期、移行期、慢性期の4つに分類される。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。標的臓器は肝脾臓である。

(感染初期)

感染初期では、PCRなど分子学的検索を用いた検出が診断には必要となる。

(急性期)

盲嚢管を構成する肝脾臓上皮細胞はやや萎縮し、肝脾臓上皮の壊死や管腔への脱落がみられる。上皮細胞内に細菌塊がみられ、盲嚢管を覆う結合組織に無数の浸潤細胞が集積し盲嚢管を蝟集する。蝟集像は多数みられ、多巣性を呈する。しかし、肝脾臓上皮内の脂肪滴の減少はない。

(移行期)

盲嚢管を覆う結合組織は無数の浸潤細胞で埋まり、肝脾臓全体が水腫状を呈して、肝脾臓上皮細胞に壊死や脱落がみられ、盲嚢上皮は萎縮し、上皮細胞内の脂肪滴は著しく減少、上皮細胞高が低くなる。無数の細菌塊を持った肝脾臓上皮が高率で観察され、しばしば浸潤細胞が集積し、結節状を呈し、結節の中心にも細

菌塊がみられる。

(慢性期)

肝脾臓は浸潤細胞の集積に置き換わり、水腫や多巣性の病巣は減る。細菌塊を含む細胞は顕著に減少し、線維化やメラニンの沈着が見られる。

(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と考えられる。

(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。

(3) タウラ症候群
Taura syndrome (TS)

担 当	検査チャート		
都 道 府 県	(1) 疫学調査 (2) 臨床検査 (3) 剖検 (4) ①RT-PCR検査 (+, ±) (-)		
水 産 技 術 研 究 所	(4) ②RT-PCR検査 (+) (-)		
判 定	+ - -		
その他	発症している場合は組織学的検査も併せて行うことが望ましい。		

疾病名：タウラ症候群

Taura syndrome：TS

病原体：Aparavirus tauraense（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）（*Penaeus vannamei*）である。ブルーシュリンプ（*P. 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）（*P. monodon*）、クルマエビ（*P. japonicus*）とコウライエビ（*P. 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、中国及び台湾。
- ③種苗は上記の地域から輸入したものである。
- ④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ポストラーバ、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ま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、鰓、リンパ様器官の抽出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；231bp

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、鰓、リンパ様器官の抽出RNA。

プライマー；

TSV55P 1 : 5'-GGC-GTA-GTG-AGT-AAT-GTA-GC-3'

TSV55P 2 : 5'-CTT-CAG-TGA-CCA-CGG-TAT-AG-3'

増幅産物サイズ:1303bp

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 1～20 μm ）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と考えられる。

(8) その他

垂直感染を避けるため、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。

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

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) ①PCR検査"] E --- F["(+、±)"] E --- G["(-)"] </pre>
水 産 技 術 研 究 所	<pre> graph TD F["(+、±)"] --- H["(4) ②PCR検査"] H --- I["(+)"] H --- J["(-)"] </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。

疾病名：伝染性皮下造血器壊死症（IHHN）

Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis:IHHN

病原体：*Penstylnhamaparvovirus decapod1*（パルボウイルス科ペンスティルハマ
パルボウイルス属）

（１）疫学調査

- ①病原体：本疾病は*Penstylnhamaparvovirus decapod1*(以下、IHHNV)に起因する。
- ②宿主域：ブルーシュリンプ (*Penaeus stylirostris*)、シロアシエビ（ホワイ
テッドシュリンプ、バナメイエビ） (*P. vannamei*)、ウシエビ（ブラックタイガ
ー） (*P. monodon*)、イエローシュリンプ (*P. californiensis*) 及びノーザンホ
ワイトシュリンプ (*P. setiferus*) が感受性宿主である。可能性があるものとし
て、ノーザンブラウンシュリンプ (*P. aztecus*) が挙げられる。
- ③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、イラン及びオーストラリア。
- ④種苗は上記の地域から輸入したものである。
- ⑤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。
- ⑥稚エビで発病しやすい。
- ⑦ウシエビには、内因性ウイルス因子（endogenous viral element:EVE）呼ばれる
感染性のないIHHNVのゲノムが挿入されている場合がある。PCR検査でも偽陽性と
なるため注意が必要である。

（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

- ①高い死亡率は稀で慢性疾病を引き起こす。
- ②RDS (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。
- ③RDS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

PCR反応；94℃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。

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、60℃で30秒間、72℃で30秒間を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。

(5) 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 C["(2) 臨床検査"] --- B B --- D["(3) 剖検"] D --- E["(4) ①Nested-PCR検査"] E --- F["(-)"] E --- G["(+、±)"] </pre>
水 産 技 術 研 究 所	<pre> graph TD H["(4) ②Nested-PCR検査 及び配列解析"] --- I["(+)"] H --- J["(-)"] </pre>
判 定	— + —
その他	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、分離菌の性状試験及び病理組織の観察を行うことが望ましい。

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病原体：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 (ホワイトレグシュリンプ、バナメイエビ) (*Penaeus vannamei*)、ウシエビ (*P. monodon*) 及びコウライエビ (*P. chinensis*)。
- ③発生地域：中国、マレーシア、タイ王国、ベトナム、フィリピン、バングラディシュ、韓国、台湾、オーストラリア、メキシコ及びアメリカ合衆国。
- 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みられない、又は認められない。
- 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；

AP 4-F 1：5' -ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC- 3'

AP 4-R 1：5' -ACGATTTTCGACGTTCCCCAA- 3'

増幅産物サイズ；1269bp

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；

AP 4-F 2：5' -TTGAGAATACGGGACGTGGG- 3'

AP 4-R 2：5' -GTTAGTCATGTGAGCACCTTC- 3'

増幅産物サイズ；230bp

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。

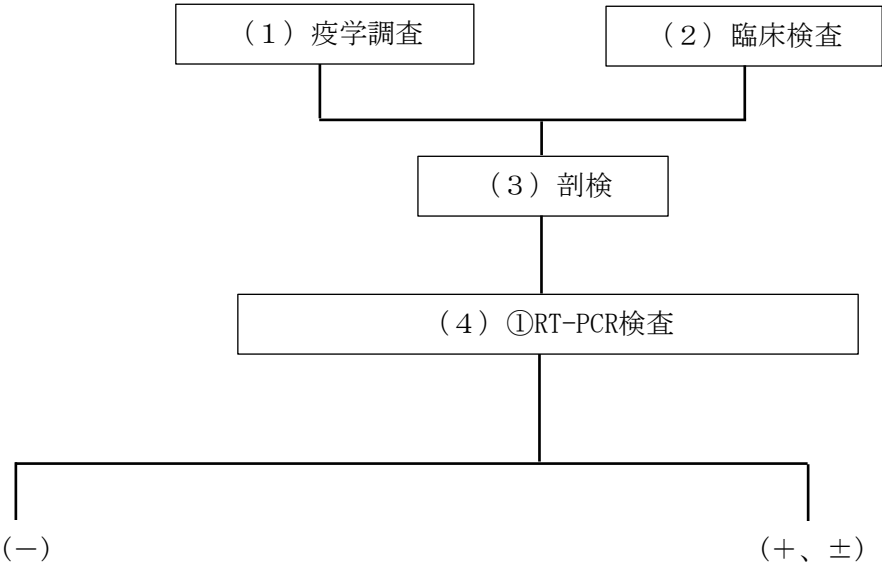
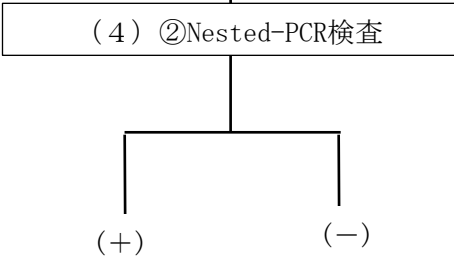
(5) 病理組織学的所見

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肝膵臓の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、肝脾臓細管粘膜細胞の顕著な核肥大を示し、肝脾臓細管内腔で包囲化され崩壊する。
 - ③崩壊した肝脾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。末期には肝脾臓は完全に崩壊する。
 - ④肝脾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脾臓細管の包囲化あるいは肝脾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。
 - ②15分の酸性処理（pH5）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["(2) 臨床検査"] A --- B B --- C["(3) 剖検"] C --- D["(4) ①RT-PCR検査"] D --- E["(-)"] D --- F["(+, ±)"] </pre>
水 産 技 術 研 究 所	 <pre> graph TD G["(4) ②Nested-PCR検査"] --- H["(+)"] G --- I["(-)"] </pre>
判 定	— + —
その他	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。

疾病名：伝染性筋壊死症（IMN）

Infectious myonecrosis:IMN

病原体：Artivirus ichi（アルティウイルス科アルティウイルス属）

（１）疫学調査

- ①病原体：本疾病はArtivirus ichi(以下、IMNV)に起因する。
- ②宿主域：シロアシエビ（ホワイトレグシュリンプ、バナメイエビ）（*Penaeus vannamei*）、オーストラリアタイガー（*P. esculentus*）及びバナナエビ（*P. merguensis*）の３種。ウシエビ（ブラックタイガー）（*P. monodon*）、ブルーシュリンプ（*P. stylirostris*）は死亡がないが、感受性を示すとされ、サザンブラウンエビ（*P. subtilis*）はPCRで陽性を示す。
- ③発生地域：ブラジル東北部、インド、インドネシア、東南アジア、マレーシア及びエジプト。
- ④ステージ：シロアシエビの稚エビ、未成エビで重篤。

（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（シロアシエビ）。
- 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（特に末端節腹部及び尾扇部）。

（３）剖検所見

体側筋の点状あるいは広範囲な壊死による白濁（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

逆転写反応；55℃で30分、95℃で2分間処理

PCR反応；95℃で15秒、60℃で30秒、68℃45秒を39サイクル行い、最後に60℃で2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）②i) 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体側筋組織に壊死、細胞浸潤、線維化がみられる。
- 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鰓、心臓、触角腺、腹部神経索等にも認められる。

(6) 類似病検査

腹節の筋肉は本疾病以外の様々な原因で白濁する。クルマエビ類やオニテナガエビ (*Macrobrachium rosenbergii*) のホワイトテー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

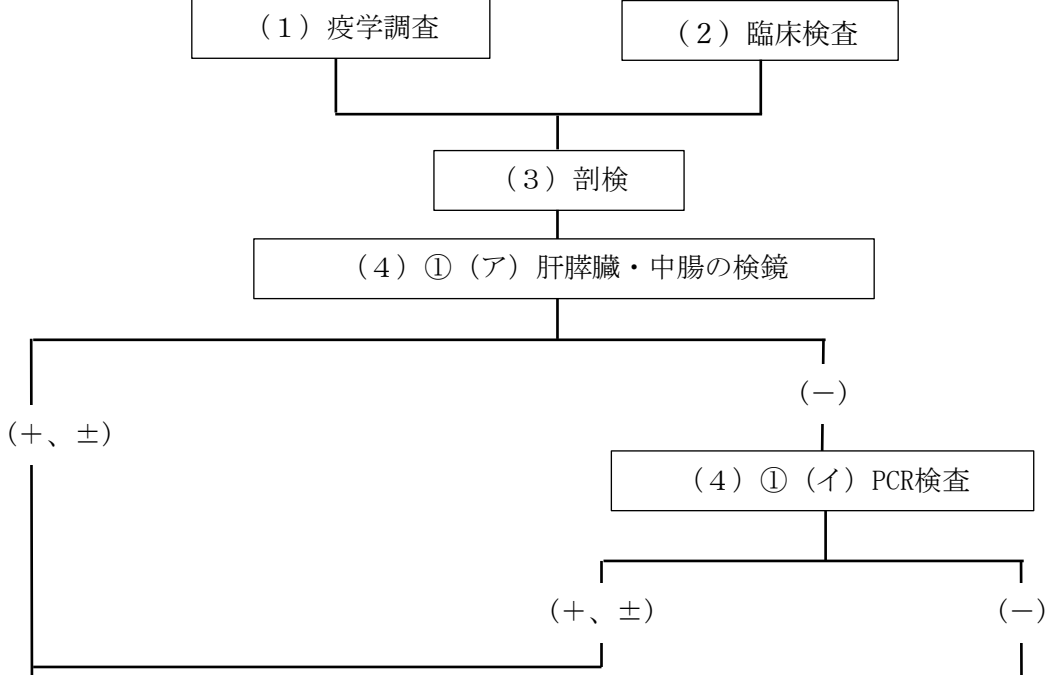
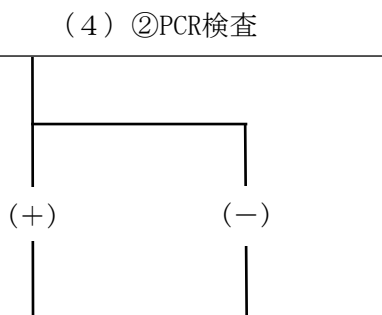
不顕性感染しているエビから本ウイルスを検出するためには、活エビから採取した血リンパをサンプルに用い、かつ、初動診断のRT-PCRのプロトコルを以下のように変更して行うとよい場合がある。

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。

(7) 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"] --- C["(3) 剖検"] B["(2) 臨床検査"] --- C C --- D["(4) ① (ア) 肝脾臓・中腸の検鏡"] D -- "(+、±)" --> E["(4) ②PCR検査"] D -- "(-)" --> F["(4) ① (イ) PCR検査"] F -- "(+、±)" --> E F -- "(-)" --> G["(-)"] E -- "(+)" --> H["(+)"] E -- "(-)" --> I["(-)"] H --> J["+"] I --> K["-"] G --> L["-"] </pre>
水 産 技 術 研 究 所	 <pre> graph TD E -- "(+)" --> H["(+)"] E -- "(-)" --> I["(-)"] H --> J["+"] I --> K["-"] </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は、別途、病理組織の観察を行うことが望ましい。

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*（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病原体：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種苗は上記の地域から輸入したものである。
- ⑤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認める。

（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 Mid-gut 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と考えられる。また、低pH (pH 3 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。

(8) エビの潜伏死病

Covert mortality disease of shrimp (CMD)

担当	検査チャート
都道府県	<pre> graph TD A["(1) 疫学調査"] --- J1(()) B["(2) 臨床検査"] --- J1 J1 --- C["(3) 剖検"] C --- J2(()) J2 --- D["(4) ① (ア) 病理組織の観察"] J2 --- E["(4) ② (イ) RT-PCR検査"] D --- F1["(-)"] D --- F2["(+, ±)"] E --- G1["(+, ±)"] E --- G2["(-)"] F2 --- H["(4) ③ Nested-PCR検査"] G1 --- H F1 --- I1["-"] G2 --- I2["-"] H --- J3(()) J3 --- I3["(+)"] J3 --- I4["(-)"] I3 --- I5["+"] I4 --- I6["-"] </pre>
水産技術研究所	<pre> graph TD H["(4) ③ Nested-PCR検査"] --- J3(()) J3 --- I3["(+)"] J3 --- I4["(-)"] I3 --- I5["+"] I4 --- I6["-"] </pre>
判定	
その他	初動診断法は病理組織検査あるいは RT-PCRのいずれかを行う。最終診断法は Nested-PCRを行う。

疾病名：エビの潜伏死病

Covert mortality disease of shrimp:CMD

病原体：Covert mortality nodavirus（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इटレッグシュリンプ、パナメイエビ）（*Penaeus vannamei*）、クルマエビ（*P. japonicas*）、コウライエビ（*P. chinensis*）、ウシエビ（ブラックタイガー）（*P. monodon*）、オニテナガエビ（*Macrobrachium rosenbergii*）。近年では、中国のエビ池や沿岸水域でよくみられるキグチ（*Larimichthys polyactis*）やヒラメ（*Paralichthys olivaceus*）等の魚種で Covert mortality nodavirus（以下、CMNV）の自然感染が報告され、脊椎動物が本ウイルスを媒介する可能性も指摘されている。
- ②発生地域：中国のエビ養殖場で初めて発生が確認された。現在では、アジア南部、ラテンアメリカにも分布が拡大している。

（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、肝臓及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、肝臓及びリンパ様器官の細管上皮の好酸性封入体、筋肉及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-7 F 1：5' -AAA-TAC-GGC-GAT-GAC-G- 3'

CMNV-7 R 1：5' -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-7 F 2 : 5' -CAC-AAC-CGA-GTC-AAA-CC-3'
CMNV-7 R 2 : 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、肝臓及びリンパ様器官の細管上皮の好酸性封入体、筋肉及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

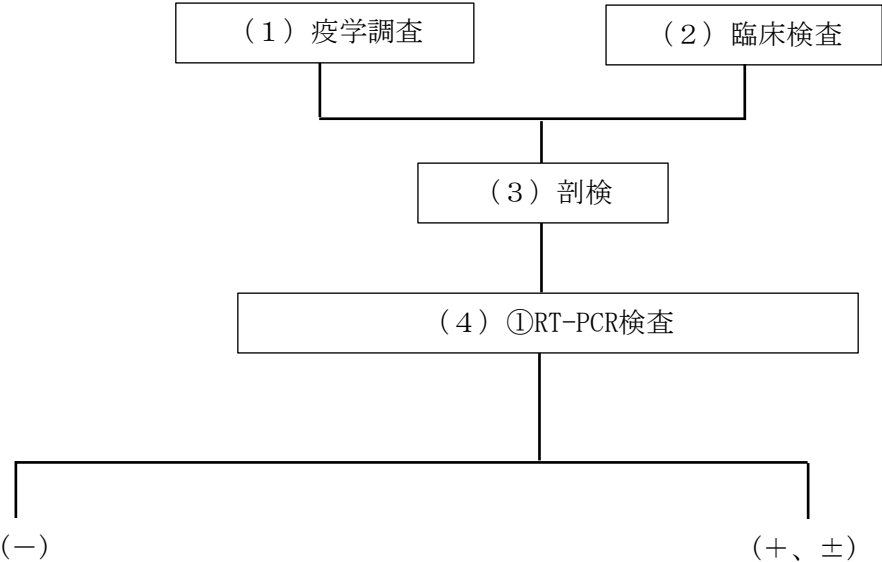
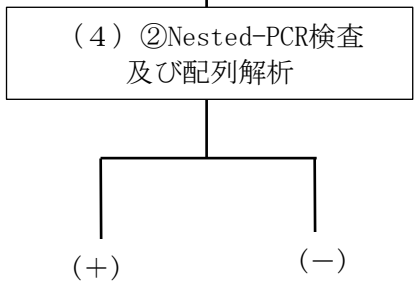
電子顕微鏡観察で肝臓にエンベロープを持たない直径25nmのウイルス様粒子が認められる。

CMNV-7 Probe-F : 5' -GGC-GAT-GAC-GGC-TTG-A-3' と CMNV-7 Probe-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。

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

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) ①RT-PCR検査"] E --- F["(-)"] E --- G["(+、±)"] </pre>
水 産 技 術 研 究 所	 <pre> graph TD H["(4) ②Nested-PCR検査 及び配列解析"] --- I["(+)"] H --- J["(-)"] </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は、別途、病理組織の観察を行うことが望ましい。

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 (*P. merguensis*)、クルマエビ (*P. 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キャリアー：自然下では、本ウイルスに感染したウシエビ。実験下では、ブラウンタイガープローン、バナナエビ、クルマエビ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及びGAV共通。増幅産物サイズ；794bp)

PCR反応；抽出した核酸及び対照RNAをテンプレートとして、上記のプライマーセット (GY 1 /GY 4) 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) ②i) 1st PCRの増幅産物プライマー；

GY 2 : 5' -CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA- 3'

G 6 : 5' -GTA-GTA-GAG-ACG-AGT-GAC-ACC-TAT- 3'

増幅産物サイズ；406bp

注：GY 2 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。

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、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、東アジア、アジア及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については他（EMS/AHPNS）の感染症に罹患したエビより検出された。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。

(10) モノドン型バキュロウイルス感染症
Spherical 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"] A --- C["(3) 剖検"] B --- C C --- D["(4) ① (ア) 肝臓・中腸の検鏡"] D -- "(+, ±)" --> E["(4) ② PCR検査"] D -- "(-)" --> F["(4) ① (イ) PCR検査"] F -- "(+, ±)" --> E F -- "(-)" --> G["-"] E -- "(+)" --> H["+"] E -- "(-)" --> I["-"] </pre>
水 産 技 術 研 究 所	(4) ②PCR検査 (+) (-)
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。

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 (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病原体：本疾病は*Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV、PmNV又はPemoPNV) 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種苗は上記の地域から輸入したものである。
- ⑤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；

MBV 1.4F：5'-CGA-TTC-CAT-ATC-GGC-CGA-ATA-3' MBV

1.4r：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 Mid-gut Gland Necrosis) と比

較すると光顕観察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。

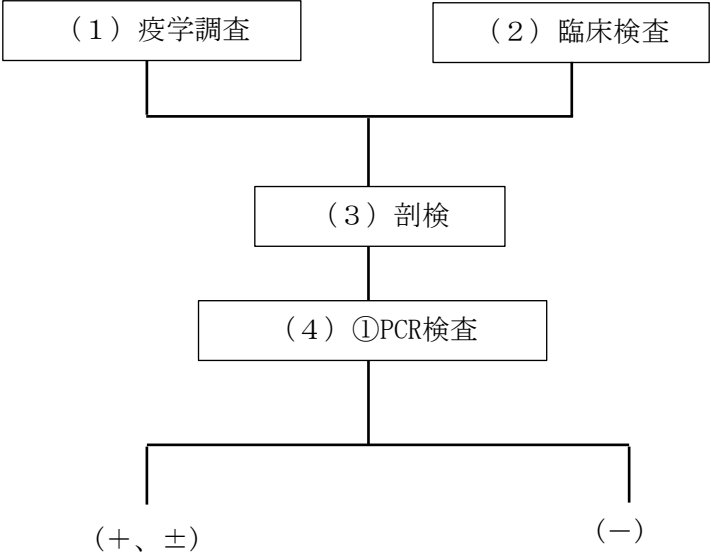
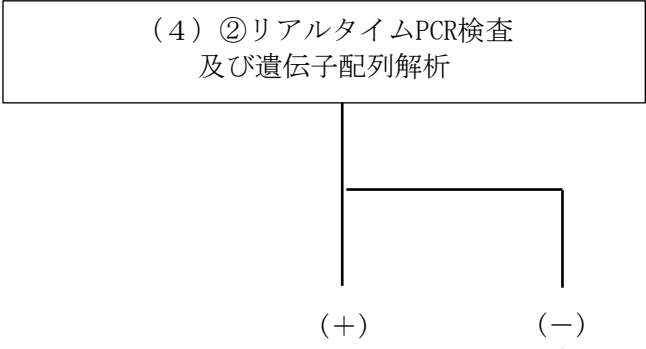
(7) 消毒

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と考えられる。

(8) その他

垂直感染を避けるため、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。

(11) 十脚目イリドウイルス病
Infection with Decapod iridescent virus 1 (DIV1)

担 当	検査チャート
都 道 府 県	 <pre> graph TD A["(1) 疫学調査"] --- J1(()) B["(2) 臨床検査"] --- J1 J1 --- C["(3) 剖検"] C --- D["(4) ①PCR検査"] D --- E(()) E --- F["(+、±)"] E --- G["(-)"] </pre>
水 産 技 術 研 究 所	 <pre> graph TD F["(+、±)"] --- H["(4) ②リアルタイムPCR検査 及び遺伝子配列解析"] G["(-)"] --- H H --- I(()) I --- J["(+)"] I --- K["(-)"] </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。

疾病名：十脚目イリドウイルス病

Infection with Decapod iridescent virus 1 : DIV1

病原体：*Decapodiridovirus litopenaeus1*

(イリドウイルス科ベータイリドウイルス亜科デカポドイリドウイルス属)

(1) 疫学調査

①病原体：本疾病は*Decapodiridovirus litopenaeus1* (以下、DIV1)に起因する。

②宿主域：WOAHのaquatic code 1.5. 章の感受性宿主の基準を満たす種。

アメリカザリガニ (*Procambarus clarkii*)、テナガエビ (*Macrobrachium nipponense*)、オニテナガエビ (*M. rosenbergii*)、レッドクロー (*Cherax quadricarinatus*)、クルマエビ (*Penaeus japonicus*)、シロアシエビ (ホワイトレッグシュリンプ、バナメイエビ) (*P. vannamei*)、ガザミ (*Portunus trituberculatus*)。

③発生地域：アジア太平洋地域。

④死亡率：100%に達する場合がある。

⑤感染例：シロアシエビの感染実験では幼生から若齢エビまで発症と死亡がみられた。2017～2018年の中国での調査では全ての体長のエビ、ザリガニでウイルスが検出され、検出率が高かったのは体長4～7cmであったが、成長段階と死亡率の関係は不明である。クルマエビにおいても注射による感染試験が成立し、空の胃や腸、黄変を伴う肝臓の萎縮、赤身、柔らかい殻など、典型的な臨床症状及び100%に達する死亡率を示した。

(2) 臨床検査

①感染個体の体は赤みを帯びる。

②殻の軟化、摂餌不良、活力の低下を引き起こす。

③オニテナガエビにおいては、額角の付け根の甲殻の下に白い三角形の領域が観察される。

(3) 剖検所見

肝臓の退色と萎縮が認められる。

(4) 診断法

①初動診断法：PCR検査

材料；鰓、リンパ様器官、肝臓のいずれかの臓器（検体が体長7cm未満あるいは臓器の採取が難しい場合は頭胸部）の抽出DNA。

プライマー；

SHIV-F 1 : 5'-GGG-CGG-GAG-ATG-GTG-TTA-GAT-3'

SHIV-R 1 : 5'-TCG-TTT-CGG-TAC-GAA-GAT-GTA-3'

反応；95℃で3分間、続いて95℃で30秒間、59℃で30秒間、72℃で30秒間を35サイクル、最後に72℃で30秒間。

増幅産物サイズ；457bp

判定；目的サイズのバンドが検出された個体（サンプル）を陽性、されなかった個

体（サンプル）を陰性と判定する。

②最終診断法：リアルタイムPCR検査及び遺伝子配列解析

材料；鰓、リンパ様器官、肝臓のいずれかの臓器（検体が体長7 cm未満あるいは臓器の採取が難しい場合は頭胸部）の抽出DNA。

プライマー；

SHIV-F：5'-AGG-AGA-GGG-AAA-TAA-CGG-GAA-AAC-3'

SHIV-R：5'-CGT-CAG-CAT-TTG-GTT-CAT-CCA-TG-3'

TaqManプローブ

[FAM]-CTG-CCC-ATC-TAA-CAC-CAT-CTC-CCG-CCC-[TAMRA]

増幅産物サイズ；188bp

反応；最初に95℃で10分間、次に95℃で10秒間^注、60℃で30秒間を40サイクル。

注：なお、100秒間という文献もあるが、水産技術研究所による再現性試験の結果、10秒間が適当と判断としている。

方法および判定；検査個体（サンプル）がリアルタイムPCR検査により陽性と判定された場合、別途①PCR検査を実施し、その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DIV1の塩基配列（GenBank accession No. MF599468.1）を参考に判定する。

（5）病理組織学的所見

造血組織、上皮、リンパ様器官、鰓の血球、胸脚、肝臓洞の細胞において核濃縮が見られ、細胞質に好塩性部分に囲まれた、あるいは好塩性部分と混ざった、暗い好酸性封入体が見られる。

（6）類似疾病検査

なし。

（7）消毒

① 3 mol/L NaCl溶液への1時間の暴露、pH3.1未満あるいはpH9.6以上への1時間の暴露により感染力が失われる。

② 1 %TritonX-100や1 %ホルムアルデヒドによっても不活化する。

③ 次亜塩素酸カルシウム16.25～130ppm、過酸化水素8.75～70ppm、ポビドンヨウド3～24ppm、塩化ベンザルコニウム20～160ppm、ホルマリン25～200ppmを24時間の処理で失活する。

（8）その他

なし。

3 貝 類 等

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

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["(3) 剖検"] --- D["(4) ①PCR検査"] D --- E["(+, ±)"] D --- F["(-)"] </pre>
水 産 技 術 研 究 所	<pre> graph TD G["(4) ② (ア) PCR検査"] --- H["(+)"] G --- I["(-)"] H --- J["(4) ② (イ) 遺伝子配列解析"] J --- K["(+)"] J --- L["(-)"] I --- M["-"] L --- N["-"] </pre>
判 定	+ - - -
その他	PCR増幅産物は、検体 (isolate) 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。これは、標的領域の塩基配列に欠損又は挿入が存在するためであり、最終診断ではシーケンスによってPCR増幅産物がAbHVから由来するものであることを確認する必要がある。

疾病名：アワビヘルペスウイルス感染症

Infection with abalone herpesvirus

病原体：*Aurivirus haliotidmalaco1* (AbHV) (マラコヘルペスウイルス科オーリウイルス属)

(1) 疫学調査

①病原体：本疾病は*Aurivirus haliotidmalaco1*(以下、AbHV)に起因する。

②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。

③発生地域：台湾（東北部）、オーストラリア（ビクトリア州及びタスマニア島）。

④種苗は上記の地域から輸入したものである。

⑤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。

⑥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%β-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。20mg程度の組織から、市販のキット等を用いてDNAを抽出し、～100ng/μl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;522～558bp*

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℃保持する。

注：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、エンベロープを持ち、電子密度の高い核を持つ六角形のウイルス（直径100～110nm）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と考えられる。

（8）その他

①AbHV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。

③WOAHでは、移動制限やしっ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。

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

担 当	検査チャート		
都 道 府 県	(1) 疫学調査 (2) 臨床検査 ↓ (3) 剖検 ↓ (4) ①臓器からのPCR-REA検査 ↓ ↓ (+、±) (-)		
水 産 技 術 研 究 所	(4) ② (ア) PCR検査 ↓ (4) ② (イ) PCR検査 ↓ (4) ② (ウ) 遺伝子配列解析 ↓ ↓ (+) (-)		
判 定	+	-	-
その他			

疾病名：カキヘルペスウイルス1型変異株感染症（ μ varに限る。）

Infection with ostreid herpesvirus 1 microvariants (limited to OsHV-1 μ var)

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

(1) 疫学調査

- ①宿主域：マガキ (*Crassostrea gigas*)、ポルトガルガキ (*C. angulate*) 等のまがき属かき類。
- ②発生地域：ヨーロッパ諸国。
- ③夏の高水温期によくみられる。

(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；

C 2 : 5' -CTC-TTT-ACC-ATG-AAG-ATA-CCC-ACC- 3'

C 6 : 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；

IA 2 : 5' -AAT-CCC-CAT-GTT-TCT-TGC-TG- 3'

IA 1 : 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)及び(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 μ Varの塩基配列との相同性を確認する。なおC2C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と考えられる。

(8) その他

なし。

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

担 当	検査チャート
都 道 府 県	<pre> graph TD A["(1) 疫学調査"] --- C["(3) 剖検"] B["(2) 臨床検査"] --- C C --- D["(4)① (ア) スタンプ標本の顕微鏡観察"] D --- E["(4)① (イ) PCR 検査"] E -- "(+, ±)" --> F["(4)②(ア) PCR 検査"] E -- "(－)" --> G["－"] </pre>
水 産 技 術 研 究 所	<pre> graph TD F["(4)②(ア) PCR 検査"] -- "(+)" --> H["(4)② (イ) 遺伝子配列解析"] F -- "(－)" --> I["－"] H -- "(+)" --> J["＋"] H -- "(－)" --> K["－"] </pre>
判 定	＋ － － －
その他	遺伝子配列解析では、適宜内部プライマーを合成し、全長の塩基配列の決定を進める。

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：生殖腺あるいは消化腺の病変部。

虫体の観察：スライドガラスにスタンプ標本を作製し、定法どおりライト-ギムザ染色又はそれと同等の染色法で遊走子あるいは栄養体を観察する。

(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；

PqguF 7 TC: 5' -CCA CTC TGG TAG TCT TGT CTT C -3'

PQ 3 R: 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；1,796bp

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、鰓組織等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、遊走子等が観察される。

(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。

(4) 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 --- B B --- C["(3) 剖検"] C --- D["(4) ① (ア) PCR検査"] C --- E["(4) ① (イ) 組織検査"] D --- F["(-)"] D --- G["(+、±)"] F --- H["-"] G --- I["(4) ② (ア) PCR検査"] E --- J["(+、±)"] E --- K["(-)"] J --- L["(4) ② (イ) 組織検査"] I --- M["(+)"] I --- N["(-)"] M --- O["+"] N --- P["-"] L --- Q["+"] L --- R["-"] K --- S["-"] </pre>
水 産 技 術 研 究 所	<pre> graph TD I["(4) ② (ア) PCR検査"] --- M["(+)"] I --- N["(-)"] M --- O["+"] N --- P["-"] L["(4) ② (イ) 組織検査"] --- Q["+"] L --- R["(-)"] Q --- S["+"] R --- T["-"] </pre>
判 定	- + - + - -
その他	初動診断では(4)①の(ア)又は(イ)のいずれかを行う。 最終診断では(4)②の(ア)又は(イ)のいずれかを行う。

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*) 及びエボヤ (*Styela clava*)。
- ②発生地域：韓国及び日本 (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 歳以上の個体で発病。0 歳の個体は発症せず、感染試験も成立しない。
- ④キャリアー：感染マボヤ (*H. roretzi*) がキャリアーとなる。本鞭毛虫の海水中で生存期間は長い。水を介して容易に水平感染がおこる。養殖機材に付着している可能性もある。環境によってはシストとなり休眠することもある。
- ⑤発生時期：水温が20℃以下となる11月～8月に発生。

(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。New England Biolabs 社のPhusion DNA ポリメラーゼを用いる。KOD FX (東洋紡) 等、主に古細菌起源で耐熱性の高い酵素 (98℃で熱変性可能) なら上記条件で使用可能。

(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 (10～14x 2～3 μm) 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、頻繁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

- ・本鞭毛虫は5 ppm 1 分のヨード剤処理で不活化する。マボヤ種苗（8ヶ月齢体重約0.1g）は800ppm60分の処理でも生存に影響はない。受精卵については、有効ヨウ素5 ppmあるいは有効塩素5 ppmで1 分間の卵消毒を行うことにより、受精卵の発生に影響を与えることなく、病原体を消毒できる。
- ・ヨード剤等の濃度を上げ処理時間を延長する場合、50ppmのポビドンヨードに15分間または5 ppmの次亜塩素酸ナトリウムで15分間消毒しても、マボヤの胚発生には影響しなかった。
- ・その他、ホルマリン、過酸化水素、ビチオノール、二酸化塩素及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。
- ・飼育水中の病原体は35℃以上の高水温で1 分間、38℃以上であれば10秒間処理で死滅する。マボヤ種苗は、30℃の海水に30分浸漬することにより、種苗の生残性を低下させることなく水平感染が成立しなくなるレベルまで被囊内部に寄生している病原体を減少あるいは死滅させることができる。

(8) その他

- ・韓国では1995年から、日本では2007年から大量死の報告がある。