

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"] B --- 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 RT-PCR 検査"] D --- F["(-)"] D --- G["(+, ±)"] F --- H["-"] G --- I["(4)①(イ)間接蛍光抗体法"] I --- J["(-)"] I --- K["(+, ±)"] J --- H K --- L["(4)②(ア)培養細胞によるウイルス分離 ((4)①(ア)と同じ)"] L --- M["(+)"] L --- N["(-)"] M --- O["(4)②(イ)間接蛍光抗体法および (4)②(ウ)遺伝子配列解析"] N --- P["-"] O --- Q["(+)"] O --- R["(-)"] Q --- H R --- H E --- S["(+, ±)"] E --- T["(-)"] S --- O T --- P </pre>
水 産 技 術 研 究 所	<pre> graph TD L --- M["(+)"] L --- N["(-)"] M --- O["(4)②(イ)間接蛍光抗体法および (4)②(ウ)遺伝子配列解析"] N --- P["-"] O --- Q["(+)"] O --- R["(-)"] Q --- H R --- H </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*)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"] --- C["(3)剖検"] B["(2)臨床検査"] --- C C --- D["(4)①RT-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：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*)、ブラウントラウト(*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["(+, ±)"] G --- H["(4)①(イ)培養上清の PCR-REA 検査"] H --- I["(-)"] H --- J["(+, ±)"] E --- K["(+, ±)"] E --- L["(-)"] </pre>
水 産 技 術 研 究 所	<pre> graph TD 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 --- O["(+)", "(-)"] </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 perca*1) (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 11～20℃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；*Pf*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（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>Pf</i> MI	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；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（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'-AAAGACCCGTTTTGCAGCAGCAAAC-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。

(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"] --- J1(()) B["(2)臨床検査"] --- J1 J1 --- C["(3)剖検"] C --- D["(4)①(ア)スタンプ標本のギムザ染色"] D --- E1["(+、±)"] D --- E2["(-)"] E1 --- F["(4)①(イ)臓器からの PCR 検査"] F --- G1["(+、±)"] F --- G2["(-)"] G1 --- H["(4)②臓器からの PCR 検査"] H --- I1["(+)"] H --- I2["(-)"] E2 --- J["(不明病として検査)"] </pre>
水産技術研究所	(4)②臓器からの PCR 検査 (+) (-) (不明病として検査)
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 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、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	(1)疫学調査 (2)臨床検査 ↓ (3)剖検 ↓ (4)①(ア)TSA培地による細菌の分離^{注1} ↓ (4)①(イ)性状検査^{注2} ↓ (+、±) ↓ (-) (4)②(ウ)分離コロニーのPCR検査 ↓ (+、±) ↓ (-)			
	(4)②分離コロニーのPCR検査 ↓ (+) ↓ (-)			
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および分離コロニーの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*)、アムールチヨウザメ (*Acipenser schrencki*)、シベリアチヨウザメ(*Acipenser baerii*)、ナマズ(*Ictalurus punctatus*)、パーチ(*Perca fluviatilis*)、ティラピア (*Oreochromis niloticus*) 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 年および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。

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および分離コロニーの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；

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。

(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 --- K1[] F --- K1 I --- K1 K1 --- L1[] </pre>
水産技術研究所	<pre> graph TD K1[] --- L2["(4)②(ア)病理組織検査"] K1 --- M2["(4)②(イ)Nested-PCR"] L2 --- N1["(-)"] L2 --- O1["(+)"] M2 --- P1["(+)"] M2 --- Q1["(-)"] N1 --- K2[] O1 --- K2 P1 --- K2 Q1 --- K2 K2 --- L3[] </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
- 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、あるいは体軀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ねし、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。
- 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"] --- B["(2)臨床検査"] A --- C["(3)剖検"] B --- C C --- D["(4)①(ア)RT-PCR 検査"] C --- E["(1)①(イ)培養細胞によるウイルス分離"] D --- F["(+, ±)"] D --- G["(-)"] E --- H["(+, ±)"] E --- I["(-)"] H --- J["(4)①(ウ)RT-PCR 検査(場合により nested)"] J --- K["(+, ±)"] J --- L["(-)"] </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["(+)"] E --- G["(-)"] </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 virus (SVC)

病原体：Carp sprivivirus (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*)、ゴールドンシャイナー(*Notemigonus crysoleucas*)及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、中国及びメキシコ
- 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*-A
CN*-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碎液
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

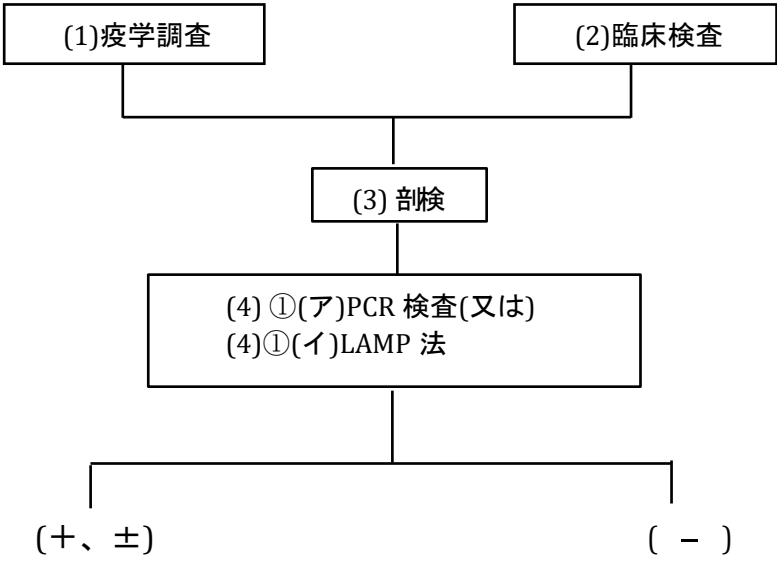
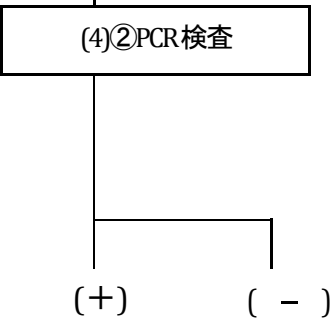
消毒するもの	有効成分	使用濃度	消毒液の更新	魚毒性	使用上の注意
手	アルキルトルエン	0.05% (30 秒)	2-3 日 汚れてきたら 早めに交換	有り	液が汚れてきたら効果なし。 エタノール、グルコン酸クロルヘキシジンはスプレーで使用すると効果的。
	グルコン酸クロルヘキシジン	0.0175% (30 秒)		ただし高濃度の液が直接池に入らない限り問題ない。	
	クレゾール	0.25% (30 秒)			
	エタノール	50% (30 秒)			
長靴	アルキルトルエン	0.05% (30 秒)	2-3 日	有り	液が汚れてきたら効果無し。
	グルコン酸クロルヘキシジン	0.0175% (30 秒)	汚れてきたら	有り	
	クレゾール	0.25% (30 秒)	早めに交換	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) もしくは 0.035% (20 分)		有り	
	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)		有り	
	クレゾール	0.25% (30 秒) もしくは 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) 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)		有り	
	クレゾール	0.25% (30 秒) もしくは 0.02% (20 分)		有り	

WOAH マニュアル (2023) 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。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则认为られる。
- ※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。

(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"] --- J1(()) B["(2)臨床検査"] --- J1 J1 --- C["(3) 剖検"] C --- D["(4) ①(ア)PCR 検査(又は) (4)①(イ)LAMP 法"] D --- E["(十、±)"] D --- F["(－)"] </pre>
水産技術研究所	 <pre> graph TD G["(4)②PCR検査"] --- H["(＋)"] G --- I["(－)"] </pre>
判定	＋ － －
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：Cyvirus cyprinidallo3 (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、日本など
- 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 μ W $\cdot$ sec/cm²

(イ)殺菌方法

- ・ 15w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 但し、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、ジョーロなどで、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※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	(1)疫学調査 (2)臨床検査 (3)剖検 (4)孢子標本の顕微鏡観察 (-) (+, ±)
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(pH 6.8)等で染色したのち観察する。長卵形(平均長径 7.9 μm×平均短径 2.9 μm)と卵形(平均長径 4.4 μm×平均短径 2.5 μm)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；964 bp

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、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。