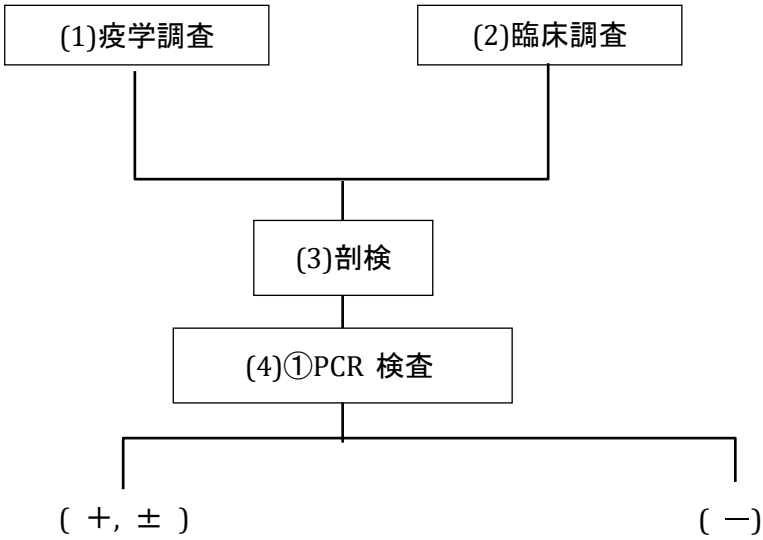
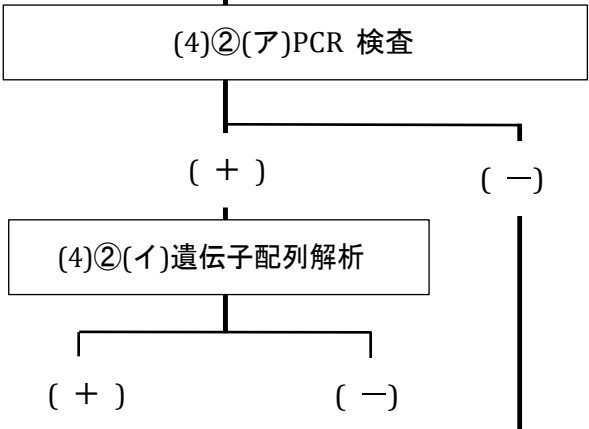


3 貝 類

(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)臨床調査"] --- 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 H["(4)②(ア)PCR 検査"] --- I["(+)"] H --- J["(-)"] I --- K["(4)②(イ)遺伝子配列解析"] K --- L["(+)"] K --- M["(-)"] </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また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：Abalone herpesvirus (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*)とトコブシ病員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% 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。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、~100 ng/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 - 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 - 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	<pre> graph TD A["(1)疫学調査"] --- C["(3)剖検"] B["(2)臨床検査"] --- C C --- D["(4)①臓器からの PCR-REA 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["(4)②(イ)PCR 検査"] H --- I["(4)②(ウ)遺伝子配列解析"] I --- J["(+)"] I --- K["(-)"] </pre>
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、ポルトガルガキ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 μ 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	(1)疫学調査 (2)臨床検査 (3)剖検 (4)①(ア)スタンプ標本の顕微鏡観察 (4)①(イ)PCR 検査 (+, ±) (-)
水産技術研究所	(4)②(ア)PCR 検査 (+) (-) (4)②(イ)遺伝子配列解析 (+) (-)
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：スライドグラスにスタンプ標本を作製し、定法どおりライト・ギムザ染色もしく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；

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。

(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 A1["(1)疫学調査"] --> C3["(3)剖検"] A2["(2)臨床検査"] --> C3 C3 --> B1["(4)①(ア)PCR 検査"] C3 --> B2["(4)①(イ)組織検査"] B1 -- "(-)" --> F1["-"] B1 -- "(+, ±)" --> B3["(4)②(ア)PCR 検査"] B2 -- "(+, ±)" --> B4["(4)②(イ)組織検査"] B2 -- "(-)" --> F2["-"] B3 -- "(+)" --> F3["+"] B3 -- "(-)" --> F4["-"] B4 -- "(+)" --> F5["+"] B4 -- "(-)" --> F6["-"] </pre>
水産技術研究所	<pre> graph TD B3 -- "(+)" --> F3["+"] B3 -- "(-)" --> F4["-"] B4 -- "(+)" --> F5["+"] B4 -- "(-)" --> F6["-"] </pre>
判定	- + - + - -
その他	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。

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：感染マボヤがキャリアーとなる。本鞭毛虫の海水中での生存期間は長い。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 (10-14 x 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5ppm 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800ppm 60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5ppmあるいは有効塩素 5ppm 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5ppm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、ピチオノール、二酸化塩素、およびプロノ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。