

アユ疾病に関する防疫指針

平成 23 年12月

アユ疾病対策協議会

はじめに

冷水病は、本来、北米のサケ・マス類に発生する病気として知られていた。低水温期に発生することから、冷水病と呼ばれたものである。我が国のアユでは昭和 62 年に養殖場において初めて発生が確認され、その後、全国的に養殖場や河川において発生が確認されるようになった。

このため、平成 6 年度から関係都府県の研究機関や全国内水面漁業協同組合連合会等を構成員とし、アユ冷水病に関する検討会や協議会を開催し、共同研究及びまん延防止対策を実施するとともに、平成 20 年 3 月に「アユ冷水病防疫に関する指針」を策定した。

さらに、平成 20 年度からは「アユ疾病対策協議会」として対象疾病を拡大し、冷水病に加え、平成 19 年に日本では初めて天然河川において発生したエドワジェラ・イクタルリ感染症や、養殖場において問題となっていた異型細胞性鰓病にも取り組み、その診断法や予防法等の研究成果について、「アユ冷水病防疫に関する指針」を改定し、今般、「アユ疾病に関する防疫指針」として取りまとめを行った。

アユ疾病対策を効果的に推進するためには、アユ養殖関係者、輸送関係者、漁業協同組合等の放流者、釣り人や漁業者、オトリ販売者等の関係者の理解と協力が不可欠である。本指針が、これら関係者によるアユ疾病対策の普及・啓発資料として活用され、現場におけるアユ疾病の発生予防及び発生時の適切な対応のための手引きとなることを期待する。

平成 23 年 12 月
アユ疾病対策協議会

アユ疾病に関する防疫指針

I. アユの疾病

1. 概要

アユは内水面の代表的な魚種（2009年生産量9,462(漁業3,625、養殖5,837)トン）であり、食用向け成魚養殖と放流用や食用養殖用の種苗養殖が各地で行われている。アユの疾病については、細菌、真菌、寄生虫等を原因とする様々な疾病が発生しているが、アユの疾病に関する研究も試験研究機関ならびに関係者の努力により格段と進み、病原体の解明や治療・予防法や防除対策が開発され、過去に大きな問題となったビブリオ病のように、近年では被害が減少したものもある。

養殖環境下で発生する疾病の概要について、資料1「主要なアユの病気」に示す。

アユの疾病で最も被害量が多い冷水病は、1987年の初発時から被害は減少傾向にあるものの、依然として発生・発症を抑え込むまでには至っていない。また、2007年には新たに北米のナマズ類の病原体であるエドワジエラ・イクタルリによる河川のアユでの死亡が初めて確認され、2008年以降も河川のアユ等における保菌魚が確認されている。養殖場での発生は今のところほとんど見られないが、本病の養殖環境下への侵入が懸念される。さらに、従来から養殖環境下で問題となっている原因不明の不活発な遊泳を特徴とする通称“ボケ病”は、ポックスウイルス（PaPV）感染により鰓弁上での異型細胞の形成を主徴とする「異型細胞性鰓病」に整理され、早期診断により迅速かつ適切な対処が被害軽減につながるようになってきた。

これらの疾病はアユの養殖、漁業生産において大きな脅威であり、最近の調査・研究の成果も含め、種苗生産、飼育、放流の現場における指導に際しての冷水病、エドワジエラ・イクタルリ感染症および異型細胞性鰓病に関する防疫指針を示す。

2. 現在問題となっている代表的な疾病

1) 天然の河川・湖沼や養殖場において注意すべき疾病

(1) アユの冷水病

- ・1987年に徳島県に搬入したアユ稚魚から初めて分離され、養殖場のみならず、河川のアユにも広くまん延し、深刻な影響を与えている。
- ・グラム陰性長桿菌のフラボバクテリウム・サイクロフィラム (*Flavobacterium psychrophilum*) が原因の細菌感染症。

- ・病魚の主な症状は鰓や内臓の貧血で、体側や尾部に潰瘍症状(いわゆる穴あき)を示すものも多い。下顎に出血や潰瘍、筋肉や腹腔内に出血などの症状を示すものも見られる。
- ・冷水病は飼育環境が悪化すると発病しやすく、再発もするので、飼育中や輸送、放流時においても極力、魚にストレスを与えないことが重要である。
- ・河川での流行は5月から10月にわたるが、5～7月(水温15～19℃)の発生が多い。

(2) アユのエドワジエラ・イクタルリ感染症

- ・米国や東南アジアのナマズ類の細菌感染症として知られる疾病。2007年夏に我が国では初めて河川のアユに発生。2008年以降も河川のアユやナマズ類で保菌や死亡が確認されている。
- ・原因菌は腸内細菌科に属するグラム陰性短桿菌のエドワジエラ・イクタルリ(*Edwardsiella ictaluri*)である。
- ・アユ病魚では腹部膨満、肛門の発赤、眼球の突出、体表の出血などの症状がみられることが多い。開腹すると血液の混じった腹水の貯留、肝臓の退色、生殖腺の出血、腎臓の腫大なども観察されるが、死魚であっても無症状のものもある。
- ・河川・湖沼では発症は7月から10月の夏季を中心とした高水温期に限定的に起こる。また、保菌率が上昇する時期は成熟期であり、高水温以外にも成熟が保菌率の増加と関連がある。

2) 養殖場において注意すべき疾病

(1) アユの異型細胞性鰓病：(Atypical Cellular Gill Disease：ACGD)

- ・1990年代より養殖場において、細菌性鰓病(以下:BGD)と似た症状を呈するが、BGDの対処法(1%程度で短時間の塩水浴)では効果を示さない疾病が発生した。現在まで多くの県の養殖環境下のみで発生がある。
- ・本病はアユポックスウイルス(*Plecoglossus altivelis* Pox Virus：PaPV)が原因である。
- ・病魚は遊泳不活発、食欲不振、突然の大量死を特徴とする。多くの場合、鰓弁の腫脹、うっ血、出血点等が観察される。組織観察では、鰓薄板に大型の異型細胞が多数出現し、鰓弁の棍棒状化が見られる。
- ・本病とBGDはどちらもその症状から「ボケ病」と呼ばれるが、対処法の条件は異なる。発生時には鰓を検査して、異型細胞の有無によりBGDとの鑑別が必要である。
- ・養殖場で発生し、大量死亡を引き起こす場合がある。河川での保菌例があるが、

発症例は知られていない。水温が 17～20℃となる 5～8 月に発症が多い。

II. 基本的な考え方

1) 天然の河川・湖沼への病原体のまん延を防止すること。

(1) 種苗の出荷・放流の可否の判断基準

- ① 種苗の出荷や放流前の保菌検査により、冷水病やエドワジェラ・イクタルリ感染症の病原体が陰性であることが確認されること。
- ② 疾病が疑われる症状や死亡が見られない飼育群であること。
- ③ 保菌検査で陽性であった飼育群、または疾病が疑われる症状が認められる飼育群については、出荷や放流を延期し、以下の対応を現場に指導する。
 - ・保菌検査を実施していない場合は、魚病診断機関に検査を依頼する。
 - ・保菌検査の結果、上記の疾病が陽性であった場合は、承認された水産用医薬品による治療や飼育環境の改善などにより病状の回復を図る。
 - ・治療等によって回復した後に、再度、保菌検査を行い、病原体が陰性であることを確認してから出荷や放流を行う。

2) 養殖場における疾病被害を防止すること。

III. 防疫のための具体的措置

1. 種苗生産・養殖施設における防疫措置

1) 健康な種苗の導入

(1) 種苗の導入の際には「来歴カード」（巻末「あゆ種苗来歴カード(例)」参照）等を参考にして、履歴によって健康が証明されている種苗を導入する。

(2) 出荷元または自県の魚病診断機関等で保菌検査を受け、冷水病菌やエドワジェラ・イクタルリ菌の保菌について陰性が確認された種苗を導入する。

- ① アユ冷水病の保菌検査は、資料 2 アユの冷水病の診断の「Ⅱ 培養によるアユ冷水病菌の検出」および「Ⅲ PCR によるアユ冷水病診断」に記載された方法によって行う。
- ② アユのエドワジェラ・イクタルリ感染症の保菌検査は、資料 3 アユのエドワジェラ・イクタルリ感染症の診断の「Ⅱ 保菌魚からの検出」に記載された方法に

よって行う。

- ③ 1 飼育群における保菌検査個体数は 60 個体とする。培養法により行う場合には個体ごと、PCR 法により行う場合は複数個体をプールして 1 検体とし、6 検体以上を検査する。

※※来歴カードについて※※

冷水病をはじめ魚病被害を軽減するためには、種苗の来歴を把握し、適切な飼育管理を行うことが大切である。種苗の来歴を記録した用紙を来歴カードという（用紙は都道府県の水産試験研究機関で配布）。

来歴カードは、一つの飼育池の種苗ごとに作成し、種苗を出荷する際に来歴カードを添付する。なお、一つの飼育池の種苗を異なる出荷先へ送付する場合は、それぞれの出荷先への送り状に来歴カード（コピーで可）を添付する。また、複数の飼育池の種苗を混合して出荷する場合は、混合した全ての種苗の来歴カード（コピーで可）を送り状に添付する。

種苗の出荷に際しては、その都度、来歴カードに必要事項を記入する。また、放流事業者や養殖業者など、最後に種苗を受け取った者は、添付されてきた来歴カードにその年の釣果や水揚げの良否等を記入して、各都道府県の水産試験研究機関に送付する。

2) 適正な飼育環境の確保

- (1) 飼育用水には水温が安定し、病原体の侵入する可能性が低い地下水を使用することが望ましい。
- (2) 河川水を使用する場合は、ろ過した上で紫外線による殺菌処理を施すことが望ましい。
- (3) 用水の導水部、排水部にはスクリーン等を設置して、病原体に汚染された可能性のある生物の侵入や逃避を防ぐ。排水路では、種苗の選別や蓄養を行わない。
- (4) 飼育施設や飼育用具類（タモ網、ブラシ等）および手やゴム手袋、長靴、合羽等については使用の都度、消毒を徹底し、清浄な状態を保つ。
- (5) 飼育用具類は池ごとに専用とし、複数池での共用は避ける。
- (6) 飼育担当者以外の不必要な立ち入りを規制する。
- (7) 水車等の飛沫が隣接する飼育池に飛ばないようにする。
- (8) 適切な飼育密度を保ち、過密飼育を避ける。また、残餌・糞等はこまめに除去する。
- (9) 継続して死魚がみられ、疾病の発生が疑われる飼育池の魚の移動等を行わず、速やかに魚病診断機関等で診断を受ける。

3) 施設・飼育用具類の消毒

- (1) 通常使用されている逆性石けん、アルコール類、塩素系消毒剤等を使用する。
- (2) 消毒剤の病原体への作用機序や特性を理解し、水生生物や人体、環境に及ぼす影響を避けることを念頭に置き、薬剤の選定や消毒作業を行う。
- (3) 消毒剤は、使用に際してその都度調製し、用法、用量を厳守する。
- (4) 使用後の消毒剤は、分解あるいは中和が必要な薬剤についてはその薬剤に添付されている使用上の注意等に従い、環境に配慮した適切な処理をして廃棄する。

〔参考〕消毒には以下の消毒剤を使うとよい。

手、ゴム手袋、長靴、合羽等・・・・・・逆性石けん液（100～200 倍稀釈）
アルコール類（70 %）

飼育用具類（タモ網、ブラシ等）、池・・・・逆性石けん液（100～200 倍稀釈）
塩素系消毒剤（サラシ粉の場合
1,000 倍稀釈）

4) 種苗の健康管理

- (1) 飼育池をこまめに観察し、常に魚の健康状態の把握に努め、衰弱魚や死魚は速やかに取り除き、焼却等により処分する。
- (2) 高密度飼育や過度の給餌は疾病の発生につながり、一旦発生すると被害の増大をもたらすことから、日頃から適正密度、適正給餌を心がけ、飼育環境の浄化に努める。
- (3) 変質した、あるいは病原体に汚染された可能性のある飼・餌料は与えない。
- (4) 飼育期間中に成長差が生じた場合には適宜選別を行い、極端にサイズの異なる魚の混養は避ける。なお、網ズレを避けるため、タモ網はできるだけ使用せず、バケツ等の容器で水ごとすくうようにする。
- (5) 種苗にストレスを与えることは極力避ける。
 - ・魚の分養時等に塩水浴（1%以下）をするとよい。塩分濃度が高くなるとアユに悪影響を及ぼすことがあるので注意する。
 - ・不用意に魚を驚かせてパニック状態にさせない。
 - ・種苗の計量に際しては、魚の量に対して十分な水量を用意する。
 - ・海産、人工種苗の場合、急激な淡水馴致は過度のストレスを与えるので避ける。

5) 疾病が発生した時の対応

(1)まん延の防止

- ・疾病が疑われる症状あるいは死亡が発生した場合には、魚病診断機関に診断を依頼する。

- ・病死魚や衰弱魚は速やかに取り除き、焼却等により適切に処分して施設内外への疾病のまん延防止に努める。
- ・採集や処理に使用した用具や手、ゴム手袋、長靴、合羽等は使用後速やかに消毒する。

(2) 診断・治療

① アユの冷水病

a 診断：

- ・アユ冷水病の診断は、資料 2 アユの冷水病の診断の「II 培養によるアユ冷水病菌の検出」および「III PCR によるアユ冷水病診断」に記載された方法によって行う。

b 治療：

- ・冷水病と診断された場合は、承認された水産用医薬品の投与あるいは加温処理によって治療し、病状が回復するまでは種苗の出荷等は避ける。
- ・冷水病の治療にはスルフィソゾールナトリウム（商品名イスランソーダ）を魚体重 1kg 当たり 1 日に 200mg を飼料に添加し、投与する。投与にあたっては薬品に添付されている使用上の注意に従うこと。また、使用禁止期間（医薬品を最後に与えてから、その水産動物を水揚げしてもよい時期になるまでの期間）15 日間を遵守する。
- ・冷水病の治療を目的に加温処理を行う場合、加温水を徐々に注水して飼育水温を 23℃で 3 日間維持し、通常水温に数日間戻した後に再度加温し 28℃で 3 日間維持する。23℃処理は温度上昇にアユを馴致するためのものであり、高い治療効果は 28℃の加温処理にある。

② エドワジエラ・イクタルリ感染症

a 診断：

- ・アユのエドワジエラ・イクタルリ感染症の診断は、資料 3 アユのエドワジエラ・イクタルリ感染症の診断の「I 病魚からの検出」および「II 保菌魚からの検出」に記載された方法によって行う。

③ 異型細胞性鰓病（以下：ACGD）

a 診断：

- ・異常遊泳・鰓のうっ血等が観察された場合、直ちに餌を止め、簡易診断を行う。
- ・瀕死魚もしくは死亡魚の鰓を切り出し、簡易診断（「ディフクイック染色による異型細胞の確認」資料 4-1）を行い、以後診断結果に基づいた処置を行う。
- ・異型細胞のみが観察された場合は ACGD。長桿菌のみが観察された場合は細菌

性鰓病(以下：BGD)と簡易診断する。両者が観察された場合は、ACGD と BGD の混合感染と簡易診断する。

- ・確定診断は資料 4-2「PCR 法による異型細胞性鰓病（ACGD）原因ウイルス PaPV ならびに細菌性鰓病（BGD）原因菌の検出法」によって行う。

b 治療：

- ・餌止め開始から 24 時間以降に、以下に従って塩水浴を行う。病状が回復するまでは給餌や出荷等は避ける。
- ・ACGD と簡易診断された場合、0.5～0.9%の塩水浴を 12 時間、飼育魚の状態が改善されるまで繰り返し行う。水温の上昇が予想される場合は、1.2%～1.3%の塩水浴を 2～4 時間、飼育魚の状態が改善されるまで繰り返し行う。できれば酸素供給により高酸素濃度環境にすることが望ましい。
- ・BGD が関与すると簡易診断された場合、1.0～1.2%塩水浴を 1～2 時間行う。混合感染の場合は引き続き上記の ACGD への塩水浴を水質悪化に注意しながら継続する。
- ・塩水浴や酸素供給は飼育水温や水質の影響を大きく受けるので、水温変動の少ない曇りの日や夜間に行う。また、運動飼育を避けるために、水車の位置変更や注水の向きを変更する。餌止めをしっかりと行わないと死亡数が増えることもあるので注意する。

2. 種苗の出荷・輸送時の防疫措置

1) 種苗の出荷時の措置

- (1) 出荷前には魚の健康状態を観察し、病徴（寄生虫の寄生や他の疾病の異常も含めて）がみられる飼育群は出荷を延期する。
- (2) 出荷前には餌止めを行う。
- (3) 種苗を飼育池から活魚水槽へ移す際には、急激な水温変化を避けるため、活魚水槽の水温を飼育池の水温に近づける。
- (4) 取り上げおよび計数は、できるだけストレスの少ない方法を選択する。
- (5) スレ防止のため、タモ網（網生け簀を含む）はなるべく使用せず、バケツ等の容器で水ごとすくうようにする。

2) 輸送時の措置

- (1) トラック、活魚水槽などは、使用前後に必ず消毒し、洗浄する。
- (2) 輸送トラックの同一水槽に、複数業者の魚を混ぜて収容しない。
- (3) 輸送距離・時間に合わせて、収容密度や輸送方法を選択するなど、種苗にスト

レスをかけないように注意する。

- (4) 収容の目安として、輸送水 1t 当たり中間種苗は 30kg 以下、放流種苗は 80kg 以下が望ましい。小型のアユほど、水量当たりの収容量を少なくする。
- (5) 輸送中は水温の急激な変化を避け、時々魚の状態や水温、酸素をチェックする。過度のエアレーションや酸素供給は、鰓に障害を与えるので注意する。
- (6) 輸送中、水面に発生する泡や死魚、異常魚はできるだけこまめに取り除くとともに、適切に処理する。
- (7) 輸送中または輸送後には、薄い塩水浴（0.2～0.9 %）をするとよい。ただし、塩分濃度が高くなるとアユに悪影響を及ぼすことがあるので注意する。また、塩水浴後の淡水への馴致は短時間で行わない。

〔補足説明〕

- ・輸送時には、飼育池からの「取り上げ」、「計量」、活魚水槽での「高密度収容」、走行中の「連続的な振動」、また排泄や呼吸等による「水質の悪化」などによるストレスがある。
- ・種苗が何らかの病原体を保有している場合、これらのストレスが疾病の発生の引き金となるので、輸送時のストレスは可能な限り小さくするように心がける。
- ・輸送中の排泄による「水質の悪化」や、餌の消化によるエネルギー消費を防ぐため、輸送前には必ず餌止めをする。
- ・輸送中に発生する泡には、アユの排泄物に由来するアンモニア等の有害物質が吸着されているため、泡の除去は、活魚水槽の水質悪化の軽減につながる。

3. 河川放流時の防疫措置

1) 放流種苗の導入

- (1) 放流用種苗は「来歴カード」が添付された種苗を導入する。
- (2) 放流用種苗は、購入前（時）の保菌検査によって冷水病菌やエドワジエラ・イクタリ菌を保菌していないことを確認した種苗を導入する。
- (3) 種苗の出荷・放流の可否の判断基準は、前述の II, 1, 1), (1)を参照する。また、保菌検査は III, 1, 1), (2)の①～③を参照にする。

2) 放流時期・場所の決定

- (1) 河川水温や流量、餌となる付着藻類の生育状況等を毎年、継続的に観察・記録する。
- (2) アユ豊漁年の河川の状況を基準として、当該年の放流時期や場所、回数、放流量を決定する。一般的には、日間最低水温が 13℃以上となるときを目安に、そ

れ以後の時期に放流予定量を数回に分けて、2 週間程度の間隔をおいて放流するのがよい。

- (3) 放流河川の水温の低い時期や水温変動の大きい時期、また濁水の出やすい時期の放流は避ける。

3) 放流種苗の取り扱い

- (1) 放流に際しては、活魚水槽と河川水の水温差が 2℃以内となるように、水槽内の水温を調節し、馴致させる。
- (2) 放流に際してはタモ網ですくった魚をそのまま運搬することはせず、バケツや太いホースなどを用いるようにする。
- (3) 輸送中に冷水病や他の疾病の疑われる症状が認められた活魚水槽の種苗は、いったん蓄養池等に移し、速やかに診断を受け、陽性であった場合は治療し、陰性を確認した後、放流する。
- (4) 輸送中の死魚や病魚は河川に投棄せず、焼却等によって適切に処理する。

4) 放流にあたっての参考事例

- (1) 漁業協同組合では放流効果の向上を目的に様々な対策を行っている。最も効果のあったとする対策は「無病アユの確保・放流」と「適切な放流時期の選定」であったが、具体的には次のとおりである。
- ・種苗の供給元に行って、購入するアユの健康状態を確かめた。
 - ・放流前に種苗の保菌検査を行い、無病であることを確認した。
 - ・無病であることが確認された種苗は漁場の上流側に放流した。
 - ・水温を計測し、水温上昇を待って放流開始日を決定した。
 - ・複数回に分けて複数箇所で放流した。
 - ・いろいろなサイズの種苗を放流した。
 - ・人工産、海産、琵琶湖産等の由来や、生産地（生産業者）が異なる種苗は、同一水系に放流しなかった。
 - ・付着藻類の生育状況を観察して放流開始日を調整した。
- (2) 川の付着藻類の生育状況とアユ漁の善し悪しの関連について
- ・付着藻類の生育は、水温を含めた河川環境を判断するよい指標であり、放流時に藻類がよく生育しているほど、解禁当初のアユの歩留まりはよかった事例がある。また、一般的に解禁当初のアユの歩留まりがよければ、シーズン全般の結果もよいという。放流効果向上のための対策として、藻類の発育を観察して放流してみる価値があると思われる。

IV. 防疫体制の確立

1. 防疫体制の整備

- (1) 本指針および「アユ冷水病対策のポイント」、「アユの病気」等を活用して、普及・啓発、ならびに防疫対策を推進する。その際、本指針の内容を都道府県の実情に合わせて再編集した「都道府県版指針」を作成し、指導に役立てることもよい。
- (2) 防疫体制を強化するために来歴カードの確実な普及及び回収を図る。なお、来歴カードの様式については都道府県の実状に合わせて適宜、変更してもよい。

2. おとりアユを介した疾病のまん延防止について

おとりアユを介した疾病のまん延を防止するため、おとりアユの販売業者や遊漁者に対して防疫についての知識と技術の普及・啓発を図る。

1) おとり販売業者が注意すべき事項

- ・伝染性の疾病、特に冷水病やエドワジェラ・イクタルリ感染症の感染のおそれのないアユを販売する。体表に異常が認められたり、元気のないおとりアユは購入もしくは販売をしない。

2) 遊漁者が注意すべき事項

- ・体表に病気が疑われるような異常が認められたり、元気のないおとりアユは購入しない。
- ・他の河川でおとりアユとして購入したアユや他の河川で釣ったアユを、おとりアユとして持ち込まない。
- ・釣ったアユやおとりアユは、全長制限などの規制がなければ持ち帰る。
- ・タモ網、引き舟、タビ、ウェーダー等は、使用後、洗浄・乾燥させる。
- ・病気と思われるアユを見ついたり、釣り上げた場合は、管轄漁協や魚病指導機関に連絡し情報提供する。

資料1 主要なアユの病気

冷水病（細菌性冷水病）		エドワジエラ・イクタルリ感染症	ビブリオ病	細菌性鰓病（Bacterial Gill Disease:BGD）
疾病名	全国のアユ養殖場および天然河川で発生がみられ、養殖場では水温15℃～20℃、天然河川では5～7月の発生が多い。	2007年8～10月に我が国の数河川のアユ病魚で始めて発生が確認された細菌性の病気である。	種苗の由来、サイズにかかわらず発生し、水温の上昇する夏場にかけて多発する。1990年以降本病の発生は減少している。	1980年以降、アユ養殖場で毎年発生する病気で、春先から初夏にかけて水温14～18℃での発生が多い。
原因	桿菌の <i>Flavobacterium psychrophilum</i> の感染による。	短桿菌の <i>Edwardsiella ictaluri</i> の感染による。	短桿菌の <i>Vibrio anguillarum</i> 、または <i>V. ordalii</i> の感染による。	長桿菌の <i>Flavobacterium branchiophilum</i> の感染による。
症状	体表のびらん・潰瘍、下顎の出血・欠損、鰓や内臓の貧血などが特徴。稚魚では体表の白濁、尾柄部のびらん・潰瘍もみられる。	顕著な外観症状は乏しいが、体表や肛門部の発赤、腹部膨満、眼球突出がみられることがある。血液の混じった腹水の貯留が認められることも多い。	稚アユでは顕著な症状は乏しいが、胸鰭やその基部の出血、躯幹部の白濁やスレがみられることもある。成魚では体側の褪色部位の形成、眼球・各鰭基部・体表の出血や体表の潰瘍形成がみられる。	食欲が低下し、病魚は池壁や注水口で鰓蓋を開いて浮上し、次第に魚群から離れて排水口付近に流れ、死に至る。外観症状は乏しいが、鰓のうっ血、腫脹や時として貧血、点状出血が認められる。
対策	養殖場への導入前、河川への放流前に保菌状況をチェックし、消毒の徹底により原因菌を持ち込まない。治療にはスルフィゾールの投与が効果がある。	承認された医薬品はなく、既発生水域からの種苗の導入や、河川水はできるだけ使用しない等、養殖場への持ち込みを注意する。	予防にはビブリオ病不活化ワクチンの投与が有効。治療には早期に的確な処置が重要で、有効な薬剤の選択が必要である。	予防は過食と過密養殖を避けること、発生した場合は直ちに餌止めを行い、治療は0.7～1.0%食塩水の1～2時間浴が効果的である。

エロモナス病		細菌性出血性腹水症	真菌生肉芽腫	異型細胞性鰓病（Atypical Cellular Gill Diseases : ACGD）
疾病名	夏から秋にかけて高水温の養殖場に発生しやすい病気で、一般に大型のアユに発生が見られる。	1990年代に発生し、冷水病対策で加温や投薬を行った後の冷水病の終息時に単独もしくは冷水病と合併して発生する。時期は5月から7月にかけて水温が15℃～20℃で発生する。	1970年代に発生し、現在でも発生が確認されている。水温が25℃以上に上昇すると発生する。	不活発遊泳を呈する症状から、細菌性鰓病ともに「ボケ病」と呼ばれていたが、本疾病は短期間に大量死を引き起こし、細菌性鰓病治療での塩水浴では効果がないことで異なる。水温17～20℃となる5月～8月発生が多い。
症状	桿菌の <i>Aeromonas hydrophila</i> の感染による。	桿菌の <i>Pseudomonas plecoglossida</i> の感染による。	水カビ（ <i>Aphanomyces</i> 属の真菌）の感染による。	ポックスウイルス（ <i>Plecoglossus altivelis</i> Pox Virus : PaPV）の感染による。
原因	眼球の突出や出血、魚体の背部と、尾鰭の付け根の皮下に出血がみられる。また、肛門の発赤や拡張も特徴的な症状である。	外部所見では頭部や下顎の発赤・出血、鰓の褪色、肛門の拡張・出血が見られる。内部所見では、脾臓の腫大と腎臓の腫脹が見られる。病名のとおり、血液混じりの腹水が腹腔内に貯留することが最も大きな特徴である。	体表に肉芽腫が形成され、病気の進行により皮膚が崩壊し、穴あき状態を呈するが、養殖場ではその前に魚が死亡することが多い。	病魚は遊泳不活発、食欲不振、突然の大量死を特徴とする。多くの場合、鰓弁の腫脹、褪色、出血点が観察され、鰓弁上に異型細胞の形成が見られる。
対策	17℃前後の低水温の用水に切り替えることで軽減することができる。化学療法は確立されていない。	体のスレから感染するとされ、密殖は避け魚体を丁寧に扱うように気をつける。	現在の所、有効な対策はない。	発生が疑われる場合は速やかに餌止めを行い、DiffQuick染色による簡易診断により鰓弁上の異型細胞ならびに長桿菌の有無を確認し、同様な症状を呈する細菌性鰓病との鑑別を行う。治療には塩水浴と酸素の補給が有効である。

アユの冷水病の診断

I. 診断にあたっての注意事項

- ・生の魚体組織試料を扱う場合には、何らかの病原体がいる可能性を常に考え、検査後、殺菌・消毒できる場所で行う。
- ・サンプルは症状を示す病魚または瀕死魚とする。死亡魚はできるだけ使用しない（生魚が入手できない場合にはできるだけ新鮮な死亡魚を選択する）。試料到着後、速やかに検査を行う。やむを得ず、後日検査する場合には凍結保存する。
- ・試料のクロスコンタミネーションを防ぐため、検体ごとにチップを換える。
- ・検査を始める前には、アルコール綿等を用いて机上のほこりをよく拭き取る。
- ・試験管、シャーレ等の蓋を開ける際には、アルコールランプ（あるいはガスバーナー）付近で行い、出来るだけ空中落下菌の混入を避ける。
- ・細菌に汚染した器具、培養液等は滅菌缶に入れ、オートクレーブ処理する。オートクレーブできない器具や実験台はアルコール消毒する。
- ・検査後の検体（魚）は焼却処分する。

II. 培養によるアユ冷水病菌の検出

1. 材料と方法

1) 培地

改変サイトファーガ培地を用いる。エラの場合は、雑菌の繁殖を制御するために、トブラマイシン $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ を添加した培地を用いる。培地原料はディフコ社製を用いる（血清は添加しない）。血清を添加する場合は明記する。

薬剤（サルファ剤）感受性試験には、血清添加培地は用いない。

改変サイトファーガ培地 組成

トリプトン	2.0 g
酵母エキス	0.5 g
肉エキス	0.2 g
酢酸ナトリウム	0.2 g
塩化カルシウム	0.2 g
(または硫化マグネシウム)	
寒天	15 g
水	1 L
pH7.2～7.4 に調整	

2) 釣菌部位

死因の特定時
保菌検査時

腎臓、病患部
エラと腎臓、可能なら脳も加える

なお腎臓からの釣菌については、資料3「アユのエドワジエラ・イクタルリ感染症の診断」の「I 病魚からの検出、3. 手技、1) 菌分離」を参照。

3) 培養温度

18℃とする（腎臓や脳）。

- ・エラや病患部からの細菌分離では、カビや雑菌が繁殖し、保菌検査が困難なことが多いため、低温で培養し、温度条件を明記する。

4) 培養菌の確認

コロニーの観察は必須であり黄色のコロニーを形成する長桿菌である。

菌の同定は下記の PCR 法により行い、確定する。

また、抗血清を用いた凝集試験などは検査者の手慣れた方法で行う（検査法を明記すること）。

III. PCR 法によるアユ冷水病診断

ロタマーゼ遺伝子群の1つである PPIC (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C) 遺伝子をターゲットとした PCR (以下、ロタマーゼ法と略す) が陽性である場合を確定とする。必要に応じて遺伝子型の解析も実施する。本ターゲットは Izumi ら(2003)が発見した遺伝子断片であり、吉浦ら(2006)が同定して検出用 PCR を改良した。なお、従来の PCR による方法(Toyama *et al.* (1994))やその他の PCR 等も診断には使用できるが、菌の遺伝子型の解析には使用できない。

1. テンプレート（試料）の調製

培養法（前述の「II 培養によるアユ冷水病菌の検出」）により得られたコロニーを用いる。

やむをえない場合には腎臓、病患部またはエラを検体とする。この場合、200 µL の STE buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)を加え、ホモジナイズする（エラについては別記の方法で洗浄濃縮液を試料として用いた方が検出感度は高い）。

DNA の抽出法 1

- ①コロニーのホモジネート 10 µL またはエラ洗浄濃縮液を、300 µL 5% Chelex100 と混合。
- ②55℃ 30 分
- ③5～10 秒激しく攪拌
- ④100℃、20 分
- ⑤遠心分離（10,000 *g*、5 分）。
- ⑥上澄みをテンプレートとして使用する（テンプレートは 4℃で保存可）。

DNA の抽出法 2

- ① コロニーのホモジネート 10 μ L またはエラ洗浄濃縮液を、300 μ L TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) と混合。
- ② 5～10 秒激しく攪拌
- ③ 95℃ 10 分
- ④ 氷中に 2 分置く
- ⑤ 遠心分離 (10,000 *g*、4℃、3 分)
- ⑥ 上澄みをテンプレートとして使用する (テンプレートは 4℃で保存可)。

* DNA の抽出には他の方法、例えば、ISOGEN または DNA 精製用のカラム (QIAamp DNA Mini kit 等) を用いる方法でも可。

2. PCR 法

1) ロタマーゼ法

(1) プライマーセット

fpPPIC1F : 5'-GTA-CCA-TGA-TAC-AGT-CAG-GTT-TTT-ATA-CCA-3'
fpPPIC1R : 5'-GCG-TTT TTA AAT CCA ACT CTT GCT TCG-3

(2) 使用する酵素

通常は Takara *Ex Taq* Hot Start Version を使用する (①の方法)。KOD FX を使用する方法 (②の方法) は、*Ex Taq* と同様に、コロニーおよび鰓洗浄液の検体にも利用でき、また、病魚組織あるいは泥、藻類等が検体の場合に用いると結果が安定する。

(3) 増幅

- ① Takara *Ex Taq* HS Version を使用する方法。吉浦ら (2006)

・ PCR 反応液組成

テンプレート	1.0 μ L
10 x <i>Ex Taq</i> buffer	2.0 μ L
2.5mM dNTPs Mixture	0.8 μ L
fpPPIC1F (10 μ M)	1.0 μ L
fpPPIC1R (10 μ M)	1.0 μ L
<i>Ex Taq</i> HS Ver.(5 unit / μ L)	0.1 μ L
滅菌 DW	14.1 μ L
合計	20.0 μ L

・ PCR 条件

プレヒーティング	95℃ 1 分
熱変性	95℃ 15 秒
アニーリング	60℃ 30 秒
伸長	72℃ 30 秒
終了後は 4℃ で保持	

* 35 サイクル (鋳型 DNA サンプルが薄いと予想される場合は、40 サイクルまでサイクル数を増やして PCR 反応を行う。)

② TOYOBO KOD FX を使用する 方法

・ PCR 反応液組成

テンプレート	1.0 μ L
2 x PCR buffer for KOD FX	10.0 μ L
2mM dNTPs	4.0 μ L
fpPPIC1F (10 μ M)	1.0 μ L
fpPPIC1R (10 μ M)	1.0 μ L
TOYOBO <i>KOD FX</i> (1 unit/ μ L)	0.3 μ L
滅菌 DW	2.7 μ L
合計	20.0 μ L

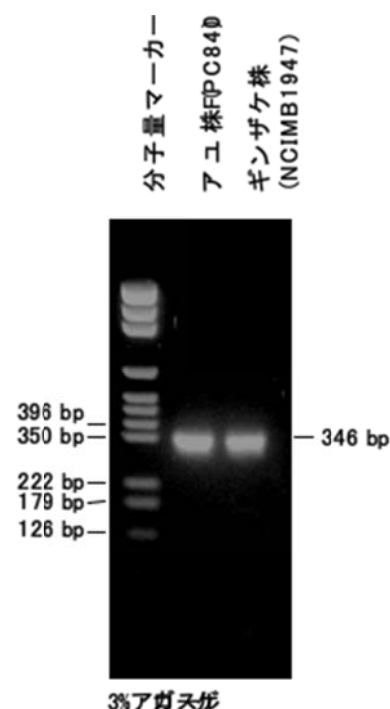
・ PCR 条件

プレヒーティング	94℃ 2 分
熱変性	98℃ 10 秒
アニーリング	60℃ 30 秒
伸長	68℃ 30 秒
終了後は 4℃ で保持	

* より高感度を求める場合は、45 サイクルまでサイクル数を増やす。

(4) PCR 増幅産物の電気泳動

PCR 後の反応液 (3 μ L) を試料として、3%アガロースゲルを用い、定電圧 100 V、25 分間の条件で電気泳動を行う。346 bp の増幅産物が認められた場合、陽性とする (右図)。



(5) PCR 増幅産物の *Hinf* I 消化断片長の違いによる遺伝子型の解析

(3) で充分量の増幅産物 (明瞭なバンド) が確認できたものは、制限酵素 *Hinf* I (認

識配列：G↓ANTC)による増幅産物の消化を行う。制限酵素処理反応液を調整し、37℃で2時間インキュベートする。(反応液量が少ないので、汎用インキュベーターまたはPCR装置を37℃に設定して使用する。ウォーターバスは、チューブのフタ内側に水滴が付いて反応液量に変化することにより、結果が安定しない場合があるので、なるべく使用しない。)

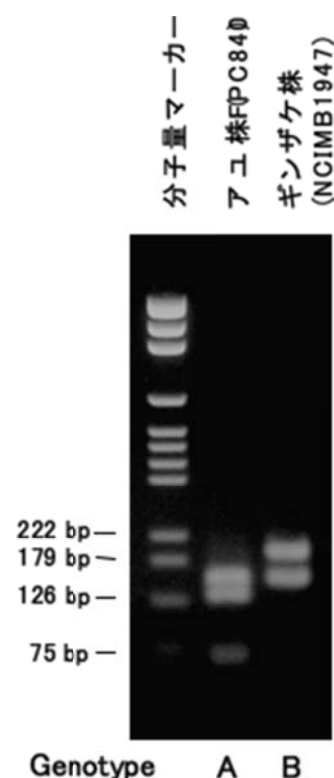
・制限酵素処理反応液組成

PCR 反応液 (増幅産物が十分あるもの)	5.0 μ L
10 x H buffer (<i>Hinf</i> I に添付)	1.0 μ L
制限酵素 <i>Hinf</i> I (10 unit / μ L)	0.2 μ L
滅菌 DW	3.8 μ L
合計	10.0 μ L

消化済液 (3 μ L) を3%アガロースゲルを用いて、定電圧100 Vで30分間電気泳動を行い、PCR増幅産物の消化断片長を確認する。

63 bp、129 bp、154 bpの3つの断片が認められる場合は遺伝子型A、192 bp、154 bpの2つの断片が認められる場合は遺伝子型Bと判定する (右図)。

吉浦康寿・釜石 隆・中易千早・乙竹 充 (2006):
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C 遺伝子を標的とした PCR による *Flavobacterium psychrophilum* の判別と遺伝子型. 魚病研究, 41(2), 67-71.



(別記) エラ洗浄濃縮液の作り方

エラに3 mLのPBS (－) を加え、30秒間激しく攪拌
↓
エラだけを取り出す
↓
遠心分離 (500 g、4℃、10分)
↓
上清を別のチューブに移す
↓
遠心分離 (10,000 g、4℃、10分)
↓
上清を捨てる
↓
遠心分離産物を50 μ LのPBS (－) に懸濁させ、10 μ Lを試料として用いる

* 10尾をプールし、1検体として分析可能

2) 従来の方法 : Toyama *et al.* (1994)

(1) 増幅

1 回目の増幅

・ PCR 反応液組成

テンプレート	2.00 μL
10 x PCR buffer	1.00 μL
2.5mM dNTPs Mixture	0.80 μL
20F (10 μM)	1.00 μL
1500R (10 μM)	1.00 μL
Taq DNA polymerase	0.05 μL
滅菌 DW	4.15 μL
合計	10.0 μL

・ プライマーセット

20F : 5'-AGA-GTT-TGA-TCA-TGG-CTC-AG-3'
1500R : 5'-GGT-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T-3'

・ PCR 条件

プレヒーティング 94°C 5 分
熱変性 94°C 30 秒
アニーリング 51°C 90 秒
伸長 72°C 2 分
最終サイクル 72°C 5 分
終了後は 4°C で保持

2 回目の増幅

・ PCR 反応液組成

テンプレート*	4.0 μL
10 x PCR buffer	2.0 μL
2.5mM dNTPs Mixture	1.6 μL
PSY-1 (10 μM)	2.0 μL
PSY-2 (10 μM)	2.0 μL
Taq DNA polymerase	0.1 μL
滅菌 DW	8.3 μL
合計	20.0 μL

* 1 回目の PCR 増幅産物を 1/10 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) で 5% に希釈し、2 回目のテンプレートとする。

・ プライマーセット

PSY-1 : 5'-CGA-TCC-TAC-TTG-CGT-AG-3'
PSY-2 : 5'-GTT-GGC-ATC-AAC-ACA-CT-3'

・ PCR 条件

プレヒーティング	94℃ 5 分
熱変性	94℃ 30 秒┐
アニーリング	51℃ 90 秒┐30 サイクル
伸長	72℃ 2 分 ┘
最終サイクル	72℃ 5 分
終了後は 4℃で保持	

(2) PCR 増幅産物の電気泳動

PCR 後の反応液(10 μL)を試料として、1%アガロースゲル(ゲル強度約 1,500 g / cm³)を用い、定電圧 100 V、30 分間の条件で電気泳動を行う。1,089 bp の増幅産物が認められた場合、陽性とする(図 3)。分子量マーカーとして Takara の pHY Marker(#3404A)などを使用する。

Takashi Toyama, Kumiko Kita-Tsukamoto and Hisatsugu Wakabayashi (1994): Identification of *Cytophaga psychrophila* by PCR targeted 16S ribosomal RNA. *Fish Pathology*, 29(4), 271-275.

3. その他の PCR 法等

下記の論文に、上記以外の PCR 法等が紹介されている。

1) PCR 法

Urdaci, M. C., C. Chakroun, D. Faure and J. F. Bernardet (1998): Development of a polymerase chain reaction assay for identification and detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Research in Microbiology*, 149, 519-530.

Shotaro Izumi and Hisatsugu Wakabayashi (2000): Sequencing of gyrB and their application in the identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR. *Fish Pathology*, 35(2), 93-94.

del Cerro, A., I. Marquez and J. A. Guijarro (2002): Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5177-5180.

Ballarda, A., D. Faure and M. C. Urdaci (2002): Development and application of a nested PCR to monitor brood stock salmonid ovarian fluid and spleen for detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 510-516.

2) 定量 PCR

del Cerro, A., M. C. Mendoza and J. A. Guijarro (2002): Usefulness of a TaqMan-based polymerase chain reaction assay for the detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 149-156.

大原 健一・景山 哲史・桑田 知宣・海野 徹也・古沢 秀一・吉浦 康寿(2009):リアル

タイム PCR を用いたアユ冷水病における *Flavobacterium psychrophilum* の定量性の検討.日本水産学会誌, 75(2),p258-260.

3) LAMP 法

永田恵里奈・江口 充(2007): 環境水におけるアユ冷水病菌 *Flavobacterium psychrophilum* の定量的モニタリング. 日本水産学会誌, 73(2), 306-309.

安中敏光・小島 禎・池戸正成・吉浦康寿(2007): LAMP 法による *Flavobacterium psychrophilum* (冷水病菌) の検出. 平成 19 年度日本魚病学会講演要旨集, p49.

アユのエドワジェラ・イクタルリ感染症の診断

I 病魚からの検出

1. 注意事項

- ・ 資料 2 アユの冷水病の診断 I. 診断にあたっての注意事項を参照

2. 必要な実験装置と試薬類

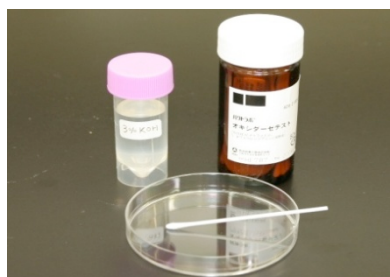
1) 試薬・実験器具



- ・ 解剖器具
- ・ 火炎滅菌用アルコールランプ（またはガスバーナー）
- ・ アルコール綿
- ・ 魚体重測定用電子天秤



- ・ 白金耳、白金線
- ・ トリプトソイ寒天培地（TS 寒天培地、あるいはトリプトソイ液体培地＋細菌培養用寒天）
- ・ 滅菌シャーレ
- ・ スライドグラス



- ・ チトクローム・オキシダーゼ試験棒（または試験紙）
- ・ 3 % KOH 溶液



- ・ SIM 培地
- ・ コバック試薬
- ・ 小試験管
- ・ 白金線



PCR 関連試薬・器具一式

- ・ 酵素 (TaKaRa *EX Taq* Hot Start Version 等)
- ・ プライマーセット (線毛遺伝子上流部位)
- ・ 陽性対照 (養殖研より配付)

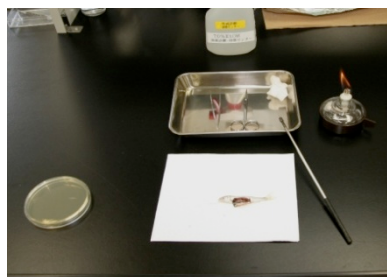
その他、PCR 関連器具

2) 実験機器・装置

- ・ インキュベーター
- ・ 遠心機または、高速微量遠心機
- ・ PCR 関連機器・装置
- ・ ブロックインキュベーター
- ・ オートクレーブ

3. 手技

1) 菌分離



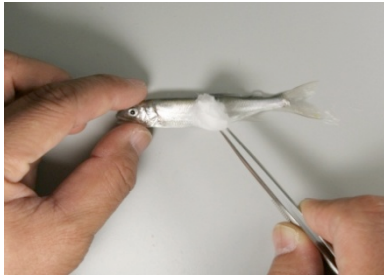
- ① 解剖器具、菌の分離培養に用いる TS 寒天培地、白金耳、アルコールランプ、アルコール綿等を準備する。



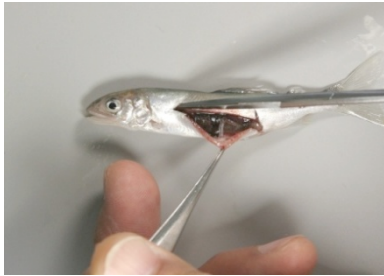
- ② 解剖器具は火炎滅菌する。



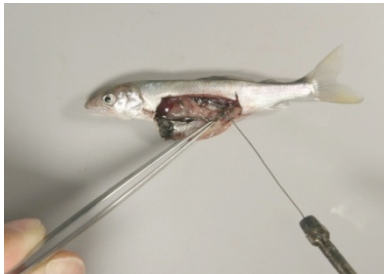
- ③ 病魚の体長・体重を測定・記録した後、症状を観察する。血液の混じった腹水に起因する腹部膨満等がアユの *E. ictaluri* 感染魚の症状の一つである。



- ④ きつく絞ったアルコール綿で体表を拭き、病魚の体表を殺菌する。



- ⑤ 消化管を傷つけないように、肛門前方からハサミを入れ、側線にそって鰓蓋付近まで腹腔壁を切開し、開腹する。腹水が溜まっている場合は、きつく絞ったアルコール綿で腹水を拭う。



- ⑥ 腎臓（体腎：背鰭基部後端の下方に位置する背骨の腹側に張り付いている）を露出させ、火炎滅菌した白金耳を挿入する。予め、白金線で腎臓表面の膜に孔を開けておくと白金耳を挿入しやすい。



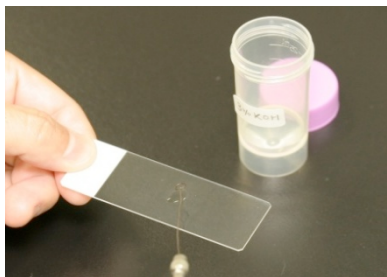
- ⑦ TS 寒天培地に画線塗布する。



- ⑧ 25℃で48時間培養する。48時間後の培養コロニーは半透明の白色を示し、粘着性が無いのが特徴である。特徴的なコロニーが単一に多数形成していることを確認し、それらを以下の性状検査や遺伝子検査に用いる。

2) 性状検査

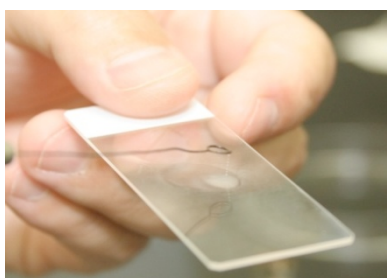
(1) 菌のグラム鑑別試験（劉の方法）



- ① 3 % KOH 溶液を準備し、スライドグラス上に 1 滴滴下する。



- ② 48 時間培養した菌のコロニー数個を白金耳で掻き取り、スライドグラス上で KOH 滴と混合する。



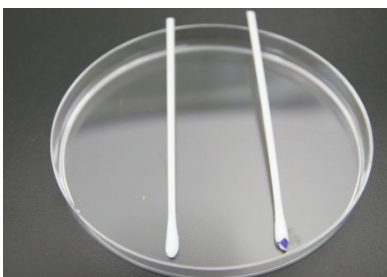
- ③ グラム陰性菌であれば、菌体が粘性を示し、白金耳を上下すると糸を引く。逆にグラム陽性菌は粘性を示さない。（*E. ictaluri* は、グラム陰性）

(2) チトクローム・オキシダーゼ試験



- ① チトクローム・オキシダーゼ綿棒に寒天上の 48 時間培養菌のコロニーを付着する。

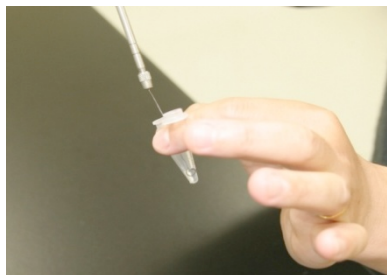
試験紙タイプのものを使用する場合には、試験紙を少量の蒸留水で湿らせ、その上に滅菌楊子等で掻き取ったコロニーを塗布する。



- ② 30 秒以内に菌の塗布部分が青色に変色するか否かを判定する。本菌の場合、青色に変色しない（*E. ictaluri* は、チトクローム・オキシダーゼ陰性）。

3) PCR 法による菌種の同定

(1) テンプレートの準備



- ① TS寒天培地上で48時間培養した菌の1コロニーを白金耳あるいは滅菌楊子で軽く触れ、1.5 mL マイクロチューブ内の蒸留水（遺伝子実験用）100 μ Lに懸濁する。
- ② ブロックインキュベーターを用いて、100℃で5分間加熱する（DNAの熱抽出）
- ③ 10,000 rpm、5分間遠心し、その上清をPCR用のテンプレートとする。

(2) PCR

・PCR 反応液組成

テンプレート	0.5 μ L
10 x <i>Ex Taq</i> buffer	2.0 μ L
2.5mM dNTPs Mixture	1.6 μ L
EDi-F (100 μ M)	0.2 μ L
EDi-R (100 μ M)	0.2 μ L
<i>Ex Taq</i> HS Ver.(5 unit / μ L)	0.1 μ L
滅菌 DW	15.4 μ L
合計	20.0 μ L

・*E. ictaluri* 検出用プライマーセット（線毛遺伝子上流に設計）

EDi-F : 5'-CAG-ATG-AGC-GGA-TTT-CAC-AG-3'

EDi-R : 5'-CGC-GCA-ATT-AAC-ATA-GAG-CC-3'

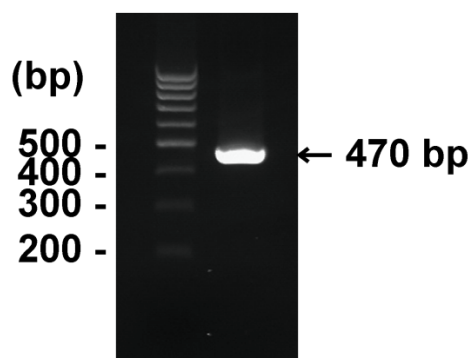
・反応条件は表の通り。

表 PCR 反応条件 (TaKaRa *ExTaq* の場合)

	反応温度	反応時間	反応回数
酵素活性*	94℃	3 分	1 回
熱変性	94℃	30 秒	

アニーリング	65℃	30 秒	40 回
伸長	72℃	1 分	
最終伸長*	72℃	5 分	1 回

*使用する酵素の説明書に従う



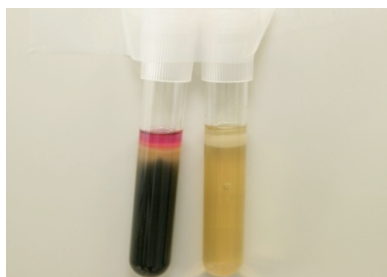
- ④ 増幅産物の電気泳動像。分子量 470 bp の陽性バンドが認められる。

参考：SIM 培地を用いた性状試験

本試験は腸内細菌属の性状試験として常用される試験であり、本菌と性状が近似する *Edwardsiella tarda* との簡易鑑別にも有用である。



- ① SIM 培地を説明書に従い、小試験管内に作製する。あるいは市販の生培地を購入する。
- ② 白金線（先端がループ状でないこと）を用いて、48 時間培養菌の数コロニーを掻き取り、培地の中央部に挿入し、試験管底から 1 cm 上方までせん刺する。
- ③ 25℃で 48 時間培養後、培地の色および濁りを観察する。硫化水素産生がある場合には、培地全体あるいはせん刺部位が黒変する。運動性陽性の場合には、せん刺部位より拡がって培地の濁りが観察される。



- ④ 次にコバック試薬を数滴試験管内に滴下し、試薬と接した培地面が赤変するか否かを観察する。赤変すればインドール陽性。写真左が *E. tarda*、右側が *E. ictaluri*。

表. SIM 培地を用いた *Edwardsiella ictaluri* と *E. tarda* の鑑別

	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	<i>E. tarda</i>
硫化水素産生能 (S)	± *	+ **
インドール産生能 (I)	—	+
運動性 (M)	+ (W) ***	+

* : 48 時間以内に判定した場合、陰性

** : 海水魚に感染する *Edwardsiella tarda* の中には、硫化水素を産生しない株もある。

*** : せん刺部位より拡がって培地の濁りが観察されるが、培地全体の濁りには至らない。

II 保菌魚（種苗）からの検出

1. 注意事項

- ・ 資料 2 アユの冷水病の診断 I. 診断にあたっての注意事項を参照

2. 必要な実験装置と試薬類

1) 試薬・実験器具



- ・ 解剖器具
- ・ 火炎滅菌用器具（アルコールランプ等）
- ・ アルコール綿
- ・ 魚体重測定用電子天秤
- ・ 滅菌缶



- ・ 滅菌綿棒
- ・ 50 mL 遠沈管または小試験管（滅菌済み）
- ・ マイクロピペット（滅菌済み）
- ・ 三角フラスコ
- ・ 1.5 mL マイクロチューブ（滅菌済み）
- ・ SS 寒天培地



PCR 関連試薬・器具一式

- ・ 酵素（TaKaRa EX Taq Hot Start Version 等）
- ・ プライマーセット（線毛遺伝子上流部位）
- ・ 陽性対照（養殖研より配付）
- ・ その他、PCR 関連器具

2) 実験機器・装置

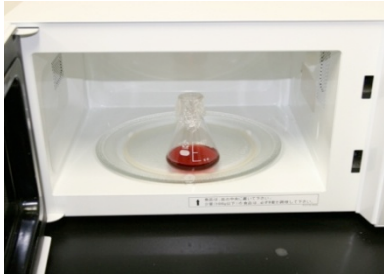
- ・ 遠心機および高速微量遠心機
- ・ 電子レンジ
- ・ インキュベータ
- ・ ブロックインキュベータ
- ・ PCR 関連機器・装置
- ・ オートクレーブ

3. 手技

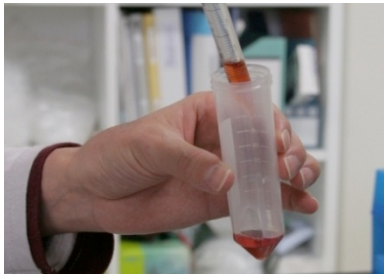
1) SS 液体培地（選択増菌培地）の作製



- ⑨ 50 mL 遠沈管内で、市販の SS 寒天培地を蒸留水に溶解し、その後約 1,500 rpm (400 g)、1 分間の遠心により、寒天を沈殿させる。ピペット等でその上清を三角フラスコに移す。



- ⑩ フラスコにラップをかけ、電子レンジを使って、培地を軽く沸騰させる。ラップに孔を開けておくと、突沸を防ぐことができる。



- ⑪ 滅菌した遠沈管または小試験管に上記の SS 液体培地を無菌的に分注する。適量は 50 mL 遠沈管で 5 mL、小試験管で 3 mL 程度である。分注後は蓋をして、使用時まで冷蔵で保存する。

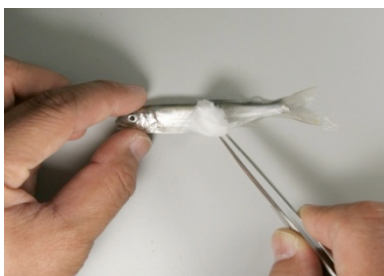
2) 魚の解剖と増菌培養

検査魚のサイズにより、解剖の手技が異なる。

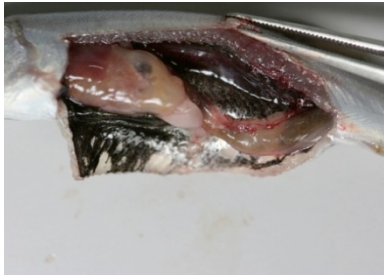
(1) 全長 5 cm 以上の検査魚の場合



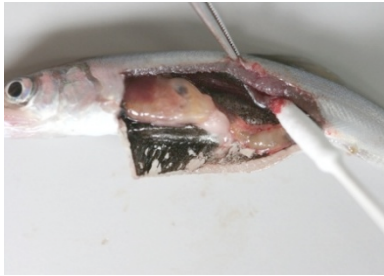
- ① 解剖器具をアルコールランプ等で火炎滅菌する。



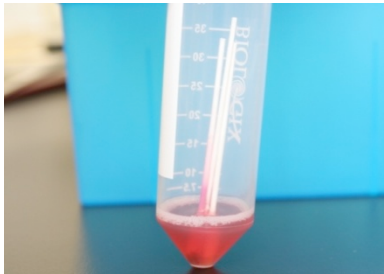
- ② きつく絞ったアルコール綿で、魚体表を拭く（軽く粘液を拭う程度）。



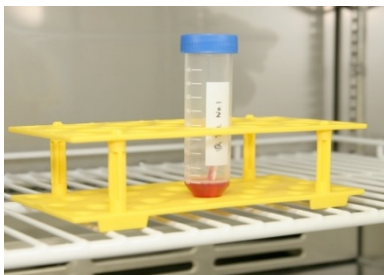
- ③ 火炎滅菌した解剖器具を用いて、肛門より前方の位置から、側線に沿って前方に切開し、開腹する。



- ④ 滅菌綿棒を用いて、体腎（背鰭基部後端の下方に位置する背骨の腹側に張り付いている）を削ぎ取る。



- ⑤ SS 液体培地の入った遠沈管または小試験管に腎組織の付着した綿棒を移入する。同じロットの検査魚からの綿棒を 1 本の遠沈管にプールしても構わない。



- ⑥ 遠沈管（または小試験管）の蓋が閉まるように、綿棒の先端を切り取り、蓋をして、25℃で 24 時間培養する。



- ⑦ 蓋を開け、遠沈管（または小試験管）内の綿棒を除去し、滅菌缶に捨てる。



- ⑧ 再び蓋を閉め、軽く震とう攪拌して、細菌を懸濁させる。さらに、1,000 rpm (180 g)、3 分間の遠心により組織片を沈殿させる（細菌は沈殿しない）。



- ⑨ 培地上清 1 mL を 1.5 mL のマイクロチューブに移入する。



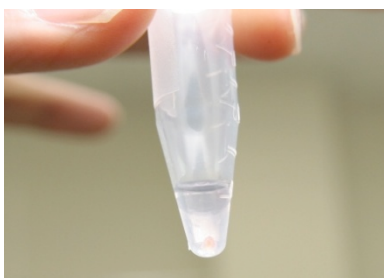
- ⑩ 5,000rpm (2,430 g)、5 分間の遠心により、細菌を沈殿させ、ピペットを用いて、上清 (SS 培地) を除去する。



- ⑪ D.W. (遺伝子実験用) を 100 μ L 添加し、ピペッティングにより細胞を懸濁させる。

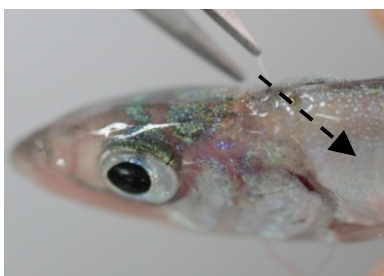


- ⑫ ブロックインキュベータを用いて 100°C で 5 分間加熱する (熱抽出)。

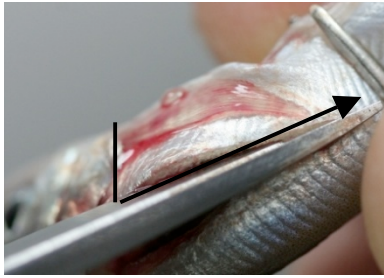


- ⑬ 10,000 rpm、5 分間、4°C で遠心し、その上清を PCR 用テンプレートとする。

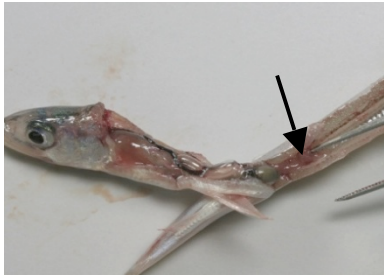
(2) 全長 5 cm 以下の検査魚の場合



- ① 解剖ハサミを用いて、頭部後方より背骨に達するまで切断する。



- ② 消化管を傷つけないように気を付けながら、両腹側を側線に沿って切開する。



- ③ 体腎が露出したら、前述の 1) ④ 同様に綿棒で腎臓を削ぎ取る。矢印の先端が体腎部。以降、前述の (1) ⑤ に続く。

3) PCR 法による *E. ictaluri* の検出

作製した PCR 用テンプレートを用いて PCR を行う。反応液組成、プライマーの塩基配列、反応条件については、I 病魚からの検出-3) PCR 法による菌種の同定を参照。

ディフクイック染色による異型細胞の鑑別

異型細胞性鰓病（以下：AcGD）の発生時には迅速に本病か否かを診断する必要がある。そのため、鰓の上皮組織に形成される本病に特徴的な異型細胞を鑑別するためにディフクイック染色を行い、その結果により以後の対処法を選択する。

1. 材料

ディフクイック染色液（シスメックス株式会社）（固定液、染色液 1、染色液 2 のセット）

解剖用具（ピンセット、ハサミ）

スライドガラス

染色液を入れる瓶（蓋があるものが良い）

2. 方法

供試魚は瀕死の魚を採取し、直ちに検査に供する。瀕死魚が得られない場合にはやむを得ず死後間もない魚を使用する。

- ① 鰓蓋をハサミで切り取り鰓を一枚切り出す。この時に鰓弁をピンセットでつかまないように気をつける。
- ② スライドガラス上に鰓をスタンプする。3 列程度スタンプするのが適当。
- ③ スライドガラスにドライヤーの冷風を当てて十分に乾燥させる（熱を加えないこと）。
- ④ 完全に乾燥したスライドガラスを固定液に入れ、ゆっくり上下させ液に 5 回（秒）くぐらせる。
- ⑤ 染色液 1 にスライドガラスをゆっくりと 5 回（秒）くぐらせる。
- ⑥ 染色液 2 にスライドガラスをゆっくりと 5 回（秒）くぐらせる。
- ⑦ スライドガラスをきれいな水で洗浄し、染色液を落とす。ドライヤーの冷風で乾燥後、光学顕微鏡で検鏡し、異型細胞の有無、細菌の有無を観察する。

3. 診断

異型細胞のみが観察された場合は AcGD。長桿菌のみが観察された場合は細菌性鰓病(BGD)と簡易診断する。両者が観察された場合は、AcGD と BGD の混合感染と簡易診断する。

・ 異型細胞の特徴

赤血球の数倍～数十倍の大きさを呈する。

細胞質は弱好塩基性から弱好酸性を呈する。また細胞質に空胞が認められる場合もある。

核/細胞質比が高い。

PCR 法による異型細胞性鰓病 (ACGD) 原因ウイルス PaPV ならびに 細菌性鰓病 (BGD) 原因菌の検出法

鰓スタンプのディフクイック染色による簡易診断ののち、ACGD 原因ウイルス PaPV や、BGD 原因菌を PCR 法により検出し、確定診断を行う。

1. 材料

- ・ 瀕死魚あるいは死亡後間もない新鮮なアユの鰓を材料とする。すぐに核酸抽出が行えない場合は、使用時まで凍結もしくは 99.5%エタノールで固定し保存する。

2. 方法

1) 核酸抽出

米粒大の鰓組織から市販の DNA 抽出キット等で DNA を抽出する。

2) PCR 法

(1) PaPV 検出 PCR : 渡邊ら, (2007)*¹

・ PCR 反応液組成

テンプレート DNA	1.0 μ L
10 x <i>Taq</i> buffer	1.0 μ L
2.5mM dNTPs Mixture	0.8 μ L
2.5mM MgCl ₂	0.6 μ L
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ L
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ L
<i>Takara Taq</i> (5 unit / μ L)	0.05 μ L
滅菌 DW	5.55 μ L
合計	10.0 μ L

・ プライマーセット

BOKE30-F : 5'-CGA-TAT-CAT-ATC-TGT-GAT-CG-3'

BOKE30-R : 5'-AAT-GTT-GAT-GTG-TCC-AGG-AT-3'

・ PCR 条件

プレヒーティング	95°C 2 分	
熱変性	95°C 15 秒	
アニーリング	57°C 30 秒	35 サイクル
伸長	72°C 30 秒	
最終サイクル	72°C 3 分	
終了後は 4°C で保持		

・ PCR 増幅産物の電気泳動

PCR 後の反応液 5 μ L を EtBr 溶液添加 1.0% アガロースゲルで電気泳動を行い、302bp の PCR 増幅産物を確認する。

*1:渡邊房子・福田穎穂・渡辺裕介, アユの「ボケ病」に関する研究-ボックス様ウイルス粒子について-. 平成 19 年日本水産学会春季大会講演要旨集, 2007;p221

(2) BGD 原因菌検出 PCR : Toyama *et al.*, (1996)*2 を改変

・ PCR 反応液組成

PaPV 検出の反応液組成に準ずる

・ プライマーセット

BRA1 : 5'-ACT-TCT-ICG-AGT-AGA-AG-3'

1500R : 5'-GGT-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T-3'

・ PCR 条件

プレヒーティング	94°C 2 分	
熱変性	94°C 15 秒	┐
アニーリング	45°C 30 秒	└ 40 サイクル
伸長	72°C 30 秒	┐
最終サイクル	72°C 3 分	
終了後は 4°C で保持		

・ PCR 増幅産物の電気泳動

PCR 後の反応液 5 μ L を EtBr 溶液添加 1.0% アガロースゲルで電気泳動を行い、1057bp の PCR 増幅産物を確認する。

*2: Toyama, T., T. K. Kita, and H. Wakabayashi, Identification of *Flexbacter maritimus*, *Flavobacterium brachnophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR Targeted 16S Ribosomal DNA. Fish Pathol, 1996, 31:25-31.

