

1. 疫学

(1) 病名と病原体

① 病名：ピシリケッチア症

英名：Piscirickettsiosis

あるいは Salmonid rickettsial septicemia (SRS)

② 病原体：細胞内寄生性リケッチアの *Piscirickettsia salmonis* (写真1)

(2) 発生地域

チリ、アイルランド、ノルウェー、カナダ太平洋沿岸・大西洋沿岸、アメリカ合衆国太平洋沿岸

(3) 宿主域

ほぼすべてのサケ科魚類が感受性を持つと考えられている。ギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*)、タイセイヨウサケ (*Salmo salar*) から魚類株化細胞を用いて分離されており、ギンザケ、タイセイヨウサケ、ニジマス (*O. mykiss*)、マスノスケ (*O. tshawytscha*)、カラフトマス (*O. gorbuscha*) では、顕微鏡観察により確認されている。ギンザケの感受性が最も高いと考えられている。

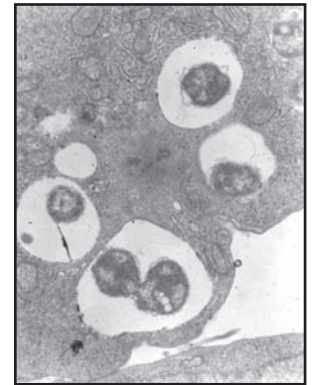


写真1 細胞内に寄生する *Piscirickettsia salmonis* の電子顕微鏡像 (吉水守博士提供)

(4) 発症の特徴

- ① 基本的には海水飼育中のサケ科魚類で発症がみられる。
- ② ギンザケの場合、淡水飼育稚魚が海水中に移されて10~12週間後に発症し、へい死は10週間程度継続する。
- ③ チリのギンザケ養殖ではへい死率は60~90%に達する。ニジマス、タイセイヨウサケではそれほど高くない(20%以下程度)。
- ④ 例外的に、淡水飼育中のニジマス、ギンザケでの発症も報告されている。
- ⑤ 伝播経路は不明。媒介生物による伝播の可能性もある。

(5) 消毒

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

2. 診断手順

(1) 臨床検査・剖検・検査試料採取

① 準備

麻醉剤 (MS222、FA100 等)

70%アルコール綿、解剖器具、手袋 (試料を個別に分ける)、無蛍光スライドガラス、ヘヤードライヤー、メタノール、冷却アセトン (-20℃で保存)、スライドガラス立て、ガスバーナー、チャック付きポリ袋、マイクロチューブ、記録用ノート

少なくとも10尾の瀕死魚または当該疾病の外観症状を示している生魚

② 取り上げ前

遊泳状況を観察する。

- ③ 取り上げ
- 生魚は麻酔剤で麻酔、大型魚は撲殺する。
 - 外観症状を記載する。
- ④ 剖検・検査試料採取（図1）
- 魚体長、体重を測定する。
 - 魚体表面をアルコール綿あるいはアルコール噴霧器で消毒し、滅菌したハサミ・ピンセットを用いて解剖する。
 - 内臓器の異常を調べ、剖検所見を記載する。
 - 腎臓、肝臓、脾臓を摘出する。
 - 腎臓、肝臓、脾臓の一部を切り出し、スライドグラス上に押し付けてスタンプ標本を作製し（各臓器最低2枚；ギムザ染色、免疫染色）、ヘヤードライヤー（冷風）で風乾後、スライドグラス立てに立てる。
 - ギムザ染色用にスタンプ標本をメタノールに5分間浸漬して固定する。また、免疫染色用に冷却アセトンに5分間浸漬して固定する。
 - 固定したスライドを風乾する。免疫染色用のスタンプ標本を-20℃で保存する。

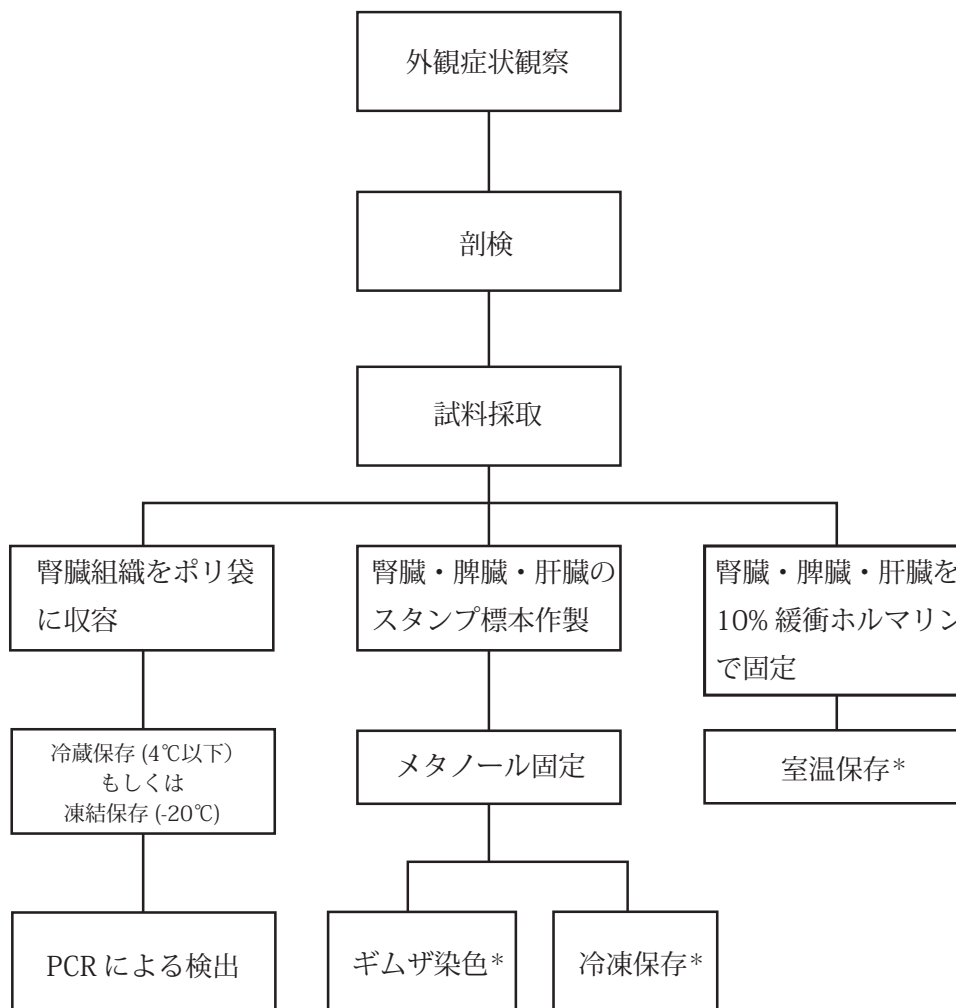


図1 臨床検査、剖検、検査試料採取の作業手順

* PCRあるいはギムザ染色で陽性の場合、臓器標本および、スタンプ標本を養殖研究所病害防除部に送付する。

(h) PCR 検査に必要となる腎臓の一部をマイクロチューブに回収し、4℃以下で保存する。さらに、残りの腎臓をセラムチューブに回収し、-20℃以下で保存する。

⑤ 罹病魚の外観症状と剖検症状

(a) 外観症状

体色が黒下し、遊泳が緩慢となる。

体表に白色小結節あるいは浅い出血性潰瘍（直径0.5~2.0cm）がみられる。

(b) 剖検症状

肝臓表面皮下の黄白色の病巣（写真2）が特徴的の症状であるが、瀕死魚であっても本症状がみられる個体は少ない（5~10%）。腹膜炎、臓器の褪色（貧血）、鰓の褪色、腹水の貯留がみられる。

脾臓の軽度の腫脹、腎臓の褪色と腫脹がみられる。

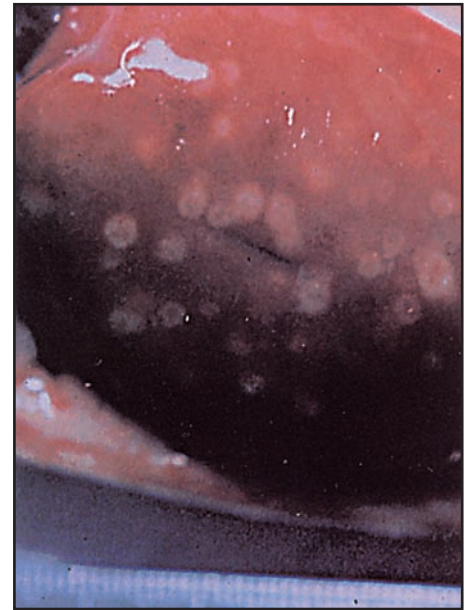


写真2 ピシリケッチア症に罹病したギンザケの肝臓。白斑が観察される。（吉水守博士提供）

(2) ギムザ染色（スタンプ標本）

① 準備

市販ギムザ染色液

1/12M リン酸ナトリウム緩衝液

* 1/12N NaH_2PO_4 溶液と 1/12M Na_2HPO_4 を混合して pH6.0 に調製する。

染色液（Working solution）

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

② 手技

(a) メタノール固定したスタンプ標本を染色液に 30 分間浸漬する。

(b) 水で洗う。

(c) 風乾する。保存する場合は、キシレンに数分間浸漬した後、合成封入剤で封入する。

(d) 油浸で顕微鏡観察を行う。

③ 顕微鏡観察

感染魚では、球菌状の菌体、あるいは 2 つの菌体がつながったリング状の菌体が宿主細胞内に観察される（写真3）。上記像が観察された場合は、PCR 検査へと進む。

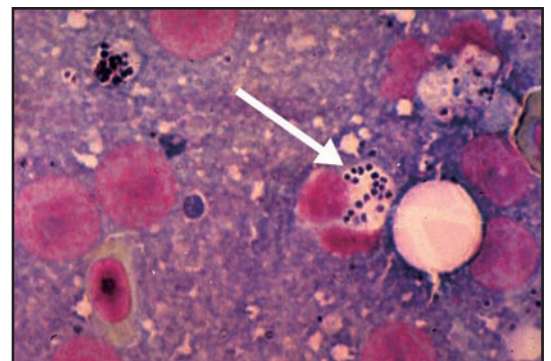


写真3 ピシリケッチア症に冒されたギンザケの腎臓塗抹標本（ギムザ染色）。矢印が *P. salmonis* 菌体。（吉水守博士提供）

(3) PCR 検査（初動診断）

① 準備

(a) 採取した病魚腎臓

(b) PCR 検査使用機器および試薬（サーマルサイクラー、マイクロピペット、マイクロチューブ、酵素・試薬類、電気泳動装置および試薬類など）

(c) プライマー

PS2S : 5'-CTA GGA GAT GAG CCC GCG TTG-3'

PS2AS : 5'-GCT ACA CCT GAA ATT CCA CTT-3'

増幅産物サイズ : 469bp

② 手 技

- (a) 適当な組織用 DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出する。抽出法などは、使用するキットのマニュアルに従う。なお、DNA 抽出に用いたマイクロチューブやマイクロチップなどはオートクレーブで滅菌して廃棄する。
- (b) 抽出した核酸および陽性対照 DNA をテンプレートとして、上記のプライマーおよび PCR 試薬を用いて PCR を行う。反応は、最初に 94℃で 2 分間、続いて 94℃で 1 分間、65℃で 2 分間、72℃で 3 分間を 35 サイクル、最後に 72℃で 3 分間行う。ただし、使用する PCR 試薬のマニュアルに最初の変性反応条件の指定がある場合は、それに従う。
- (c) PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 2% 程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。
- (d) 臭化エチジウム存在下、トランスイルミネーターにより分子量 469bp のバンドの有無を観察する。

③ 判 定

目的のバンドが検出された場合は陽性と判定し、確定診断のため養殖研究所に採取した臓器ならびに免疫染色用に冷却アセトンで固定したスタンプ標本を送付する。

(4) PCR 検査 (最終診断)

① 準 備

- (a) 採取した病魚腎臓
- (b) PCR 検査使用機器および試薬 (サーマルサイクラー、マイクロピペット、マイクロチューブ、酵素・試薬類、電気泳動装置および試薬類など)
- (c) プライマー

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 : 284bp

② 手 技

- (a) 適当な組織用 DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出する。抽出法などは、使用するキットのマニュアルに従う。なお、DNA 抽出に用いたマイクロチューブやマイクロチップなどはオートクレーブで滅菌して廃棄する。
- (b) 抽出した核酸および陽性対照 DNA をテンプレートとして、上記のプライマーおよび PCR 試薬を用いて PCR を行う。反応は、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 分間行う。ただし、使用する PCR 試薬のマニュアルに最初の変性反応条件の指定がある場合は、それに従う。
- (c) PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 2% 程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。
- (d) 臭化エチジウム存在下、トランスイルミネーターにより分子量 284bp のバンドの有無を観察する。

③ 判 定

目的のバンドが検出された場合は陽性と判定する。バンドが確認されない場合、臓器スタンプ・組織標本の免疫染色により抗体に反応する原因菌を確認する。

(5) 間接蛍光抗体法

① 準 備

病魚のスタンプ標本

0.01M リン酸緩衝塩類溶液 (PBS、pH 7.2)、一次抗体;抗 *Piscirickettsia salmonis* ヒツジ抗体 (コスモ・バイオ株式会社より販売)、二次抗体; FITC 標識抗ヒツジ IgG ウサギ抗体、湿潤箱

② 手 技

- (a) PBS で希釈した一次抗体液をスタンプ標本に滴下し、湿潤箱中に 30 分間静置する。
- (b) PBS で 3 回洗浄する。
- (c) PBS で希釈した二次抗体液をスタンプ標本に滴下し、湿潤箱中に 30 分間静置する。
- (d) PBS で 3 回洗浄する。
- (e) PBS を除去し、グリセロール塩類 (pH 8.5) 等を用いて封入後、直ちに蛍光顕微鏡で観察する。

③ 判 定

宿主細胞内に蛍光を示す球状のものが陽性である。

3. 確定診断のための養殖研究所への送付

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

4. 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。ギムザ染色による形態の観察ならびに寄生部位で識別が可能である。また、ELISA の結果により、BKD 単独感染と識別できる。

5. その他

明らかに *P. salmonis* と異なるリケッチア様微生物 (抗 *P. salmonis* 抗体に反応せず、*P. salmonis* に対する感受性を持たない培養細胞で培養可能) も報告されている。

6. 参考文献

- Almendras, F. E. and I. C. Fuentealba (1987): Salmonid rickettsial septicemia caused by *Piscirickettsia salmonis*: a review. Dis. Aquat. Org., 29, 137-144.
- Fryer, J. L., C. N. Lannan, L. H. Garces, J. J. Larenas and P. A. Smith (1990): Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. Fish Pathol., 25, 107-114.

-
- Marshall, S., S. Heath, V. Henríquez and C. Orrego (1998): Minimally invasive detection of *Piscirickettsia salmonis* in cultivated salmons via the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3066-3069.
- Mauel, M. J., S. J. Giovannoni and J. L. Fryer (1996): Development of polymerase chain reaction assays for detection, identification, and differentiation of *Piscirickettsia salmonis*. *Dis. Aquat. Org.*, 26, 189-195.
- Office International des Epizooties (2006): OIE Manual of diagnostic tests for aquatic animals (5th ed.).
- Olsen, A. B., H. P. Melby, L. Speiberg, O. Evensen, T. Hastein (1997): *Piscirickettsia salmonis* infection in Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway-epidemiological, pathological and microbiological findings. *Dis. Aquat. Org.*, 31, 35-48.