

1. 疫学

(1) 病名と病原体

- ① 病名：レッドマウス病またはエンテリック・レッドマウス病
英名：Enteric redmouth disease (ERM)
- ② 原因菌：*Yersinia ruckeri*

(2) 発生地域

アメリカ合衆国、カナダ、チリ、アイルランド、イギリス、スペイン、イタリア、フランス、デンマーク、ドイツ、スイス、ハンガリー、ブルガリア、旧ユーゴスラビア、ノルウェー、フィンランド、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

(3) 宿主域

- ① すべてのサケ科魚類が本病に感受性を有すると考えられる。
 - (a) ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*)、ベニザケ (*O. nerka*)、ヒメマス (*O. nerka*)、ギンザケ (*O. kisutch*)、マスノスケ (*O. tshawytscha*)、タイセイヨウサケ (*Salmo salar*)、ブラウントラウト (*S. trutta*)、カットスロートトラウト (*S. clarkii*)、カワマス (*Salvelinus fontinalis*)、レイクトラウト (*S. namaycush*)、オシヨロコマ (*S. malma*)、アルプスイワナ (*S. alpinus*)、ホワイティッシュ (*Coregonus peled*, *C. muksun*) から *Y. ruckeri* が分離されている。
 - (b) これらのうちニジマスでの発生および被害が最も多い。
- ② サケ科魚類以外でも、ウナギ、キンギョ、コイ、ミノー、シスコ、バス、タラ、チョウザメから *Y. ruckeri* が分離されている。
- ③ 甲殻類（ザリガニ）、鳥類、ほ乳類（ネズミ）からも *Y. ruckeri* は分離されており、宿主域は広いと考えられる。

(4) 発症の特徴

- ① 本病は 7.5 cm ほどに成長したニジマスに発生しやすい。
- ② 病状の経過により急性型、亜急性型、慢性型に分けられる。
 - (a) 急性型は春から夏にかけての水温上昇期に、主として当歳魚に発生するもので、30~60 日間に死亡率は 50~70% に達する。
 - (b) 亜急性型は秋から冬にかけての水温下降期に流行し、死亡率は急性型より低いが、2~6 ヶ月で 10~50% に達する。
 - (c) 慢性型の死亡率は約 10% と低いが、商品サイズの魚や親魚に発生しやすい点が問題となる。
- ③ 感染耐過魚はキャリアとなり、主として腸管内に原因菌を長期にわたり保持し、過密飼育、低酸素、高水温、ハンドリングなどのストレスにより、本病の発生および環境中への原因菌の排出を繰り返す。
- ④ 水温 13℃ 以上、多くは水温 18℃ 前後で発生する。
- ⑤ 垂直感染の可能性を示唆する報告もあるが、本病の発生のほとんどは水平感染の結果と考えられる。感染耐過魚がキャリアとなるほか、外見上健康なコイ、ザリガニなどからも本菌の排菌が確認されている。

(5) 消毒

- ① 一般細菌に対する消毒法が有効
 - (a) 器具：70%エタノール、3~5%クレゾール、オートクレーブによる滅菌、乾熱滅菌
 - (b) 手指：70%エタノール、0.1~1.0%逆性石鹼
 - (c) 池：0.02%次亜塩素酸ソーダ

(6) 防除法

- (a) 血清型の一致が前提となるが、全菌体不活化ワクチンが有効である。
- (b) 発病群の移動、感染耐過群の親魚としての飼育は行わない。
- (c) 発病池を消毒する。

2. 診断手法

(1) 臨床検査

① 準備

麻酔剤：0.5% MS222 (Tricaine ; 3-aminobenzoic acid ethyl ester methanesulfonate)、FA100 (オイゲノール) など。記録用ノート。

② 取り上げ前

遊泳状況を観察する。

③ 取り上げ

- (a) 少なくとも5尾の瀕死魚または当該疾病の外観症状を示している死亡直後の個体を採取する。
- (b) 生魚は麻酔剤で麻酔する。大型魚では撲殺する。
- (c) 外観症状を記載する。

④ ERM 罹病魚の症状

- (a) 遊泳が緩慢、体色黒化、両眼球の突出。
- (b) 口腔内、口吻部、下顎および鰭基部等の皮膚に発赤や点状出血 (写真1、2)。
- (c) ただし、列記した症状を呈さない症例も報告されている。

(2) 剖検

① 準備

70%アルコール綿、解剖器具、ガスバーナー (アルコールランプ、ライター)

② 手技

- (a) 魚体表面をアルコール綿またはアルコール噴霧器で消毒し、滅菌したハサミ、ピンセットなどで解剖する。
- (b) 内臓器の異常を調べ、剖検所見を記載する。

③ 判定

- (a) ERM 罹病魚は、肝臓、膵臓、脂肪組織、鰾、腸間膜、腸後部、筋肉などに出血がみられる (写真3、4)。脾臓は腫大する。
- (b) 胃には水様物が貯留し、腸内には黄色の粘液が認められる。

(3) 細菌の分離・培養

① 準備

白金耳 (ループ、線)、ビニールテープ、保冷箱 (発泡スチロール等)、氷 (冷却剤)、ビニール袋、ラベル

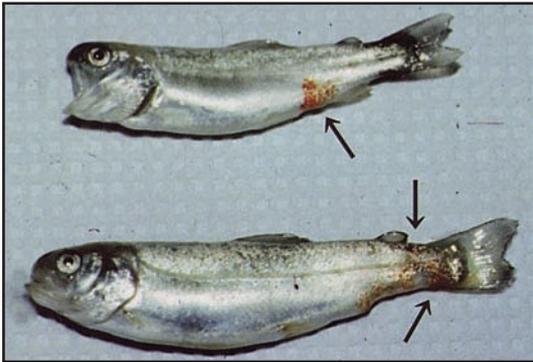


写真1 ERMに罹病したニジマス稚魚。尻鰭基部や尾柄部皮下に出血(矢印)がみられる。(S. Lapatra 博士提供)



写真2 ERM罹病魚(ニジマス)の症状。写真左:口腔内上側の皮下出血(下顎を切除して撮影)、写真中央:胸部腹面の皮下出血、写真右:口腔内下側の皮下出血(上顎吻部を切除して撮影)。(吉水 守博士提供)



写真3 ERM罹病魚(ニジマス)。脂肪組織および腸間膜に出血がみられる。(S. Lapatra 博士提供)

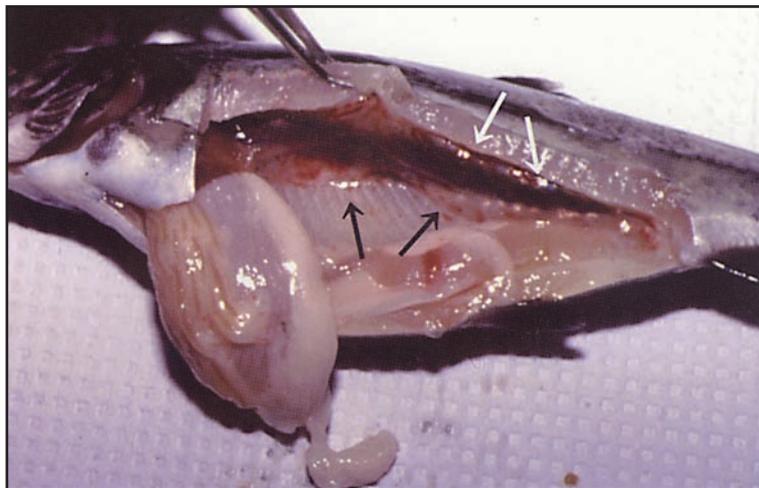


写真4 ERM罹病魚(ニジマス)。鱗(白矢印)および腹膜(黒矢印)に出血がみられる。(S. Lapatra 博士提供)

トリプトソーヤ寒天培地(TSA培地、日水製薬)

インキュベーター(25℃)

② 検査試料

(a) できるだけ発生現場で細菌分離を行う。

(b) やむを得ず検査機関まで搬送して菌分離を行う場合は、生きたままビニール袋などで酸素詰めにし、水温変動に注意する。または、検査魚を現場で即殺後、個体ごとに別々に無菌の密閉可能な容器に包装し、氷冷または冷蔵状態で24時間以内に検査機関まで搬送する。検査魚として死魚しか入手できない場合は、なるべく新鮮なものを採取し、個体ごとにビニール袋な

どで密閉包装し、氷冷または冷蔵状態で搬送する。検査魚には採取場所および日時を明記したラベルを添付する。

(c) 魚体サイズによる検査部位

全長 5 cm 以下の魚では腎臓を含む内臓全体を試料とする。

全長 5 cm 以上の魚では腎臓を試料とする。

③ 菌分離

(a) 検査魚の腎臓を滅菌したハサミ、ピンセットなどで露出させる。

通常は解剖後、腹側から鰓を除去し、腎臓を露出させる。

死亡後時間が経過し、内臓（特に腸管）の損傷、融解が予想される場合には、背部皮膚を 70% アルコール綿または噴霧器で消毒した後、背側から背骨まで切開し、腎臓を露出させる（写真 5）。



写真 5 菌分離のために背面から切開したニジマス（矢印は腎臓）。

(b) 白金耳を用いて、腎臓を TSA 培地に塗抹する。

(c) 菌体塗抹後のシャーレはビニールテープ等で密閉後、検査機関まで保冷庫に十分量の氷または冷媒を入れ、0~4℃に保ちながら搬送する。試料は凍結しないよう注意する。

④ 培養

(a) 試料接種した培地は 25℃で 3 日間培養する。

(b) 毎日目視にて観察し、出現するコロニーの形態（直径、色、透明感、コロニー周縁の形状、コロニー全体の形状）を観察する。

(c) 試料接種した培地にコロニーが現れたら、「5. 細菌検査」の手順に従って細菌の同定に着手する。

(d) 3 日後においてもコロニーが出現しなければ、試料は陰性と診断する。

⑤ *Y. ruckeri* の性状

TSA 培地では、コロニーは円形で小さく、乳白色で半透明、構造は均質、表面は平滑、辺縁は平滑で明瞭、色素の産生はない（写真 6）。



写真 6 トリプトソーヤ寒天培地における *Yersinia ruckeri* のコロニー。（48 時間培養後）
左：透過光で撮影、右：落射光で撮影

(4) 細菌検査

① 準備

3% 水酸化カリウム水溶液、スライドグラス

市販のチトクローム・オキシダーゼ試験用紙（日水製薬）、先を丸くしたガラス棒

② グラム鑑別

(a) 3%水酸化カリウム水溶液をスライドガラスに1滴のせ、それに平板培地上のコロニーを白金耳で取ってよく混ぜる。

(b) 液が粘稠で糸を引くようになればグラム陰性菌、変化がなければグラム陽性菌である。

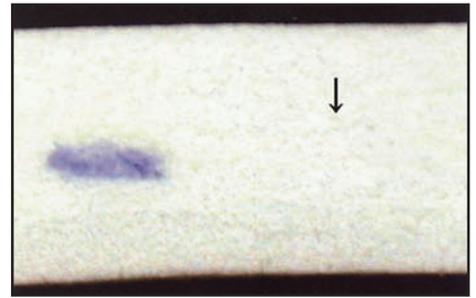


写真7 チトクローム・オキシダーゼ試験結果。Y. ruckeriは陰性（右、矢印）、左は陽性対照。

③ チトクローム・オキシダーゼ試験

(a) 試験紙を水で湿らせ、ガラス棒などで被検菌を試験紙の表面になすりつける。なお、ニコロム線は擬陽性の原因となるため用いない。

(b) 1分以内に深青色を呈するものを陽性、無変化を陰性とする（写真7）。

④ Y. ruckeri の性状

(a) グラム陰性

(b) チトクローム・オキシダーゼ陰性

⑤ 判定

(a) 上記④の性状がすべて満たされる場合は、PCR検査へと進む。

(b) 上記④の性状が満たされない場合は、陰性と診断する。

(5) PCR検査（初動診断）

① 準備

(a) 分離コロニー

(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

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

② 手技

(a) 熱抽出法または適当なDNA抽出キットにより菌体DNAを抽出する。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。

熱抽出；マイクロピペットチップ等を用いて釣菌した少量の菌体を100 μ LのTEバッファー（10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA）に懸濁し、98 $^{\circ}$ Cで10分間加熱処理する。遠心分離（12,000rpm、3分間）に供し、菌体残滓を沈殿させ、上清1 μ LをPCRの鋳型として用いる。DNA抽出キット；使用するキットのマニュアルに従う。

(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 $^{\circ}$ Cで5分間、続いて94 $^{\circ}$ Cで40秒間、60 $^{\circ}$ Cで40秒間、72 $^{\circ}$ Cで1分間を30サイクル、最後に72 $^{\circ}$ Cで5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588bp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分離菌体を送付する。

(6) PCR 検査（最終診断）

① 準備

- (a) 分離コロニー
- (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、電気泳動装置など）
- (c) 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

② 手技

- (a) 熱抽出法または適当な DNA 抽出キットにより菌体 DNA を抽出する。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。

熱抽出；マイクロピペットチップ等を用いて釣菌した少量の菌体を 100 μ L の TE バッファー (10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA) に懸濁し、98℃で 10 分間加熱処理する。遠心分離 (12,000rpm、3 分間) に供し、菌体残滓を沈殿させ、上清 1 μ L を PCR の鋳型として用いる。DNA 抽出キット；使用するキットのマニュアルに従う。

- (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 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 409bp 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。

3. 確定診断のための養殖研究所への送付

- ① 細菌検査および PCR 検査で陽性と判定された分離コロニーを TSA 培地に接種し、25℃で 24~48 時間培養する。
- ② シャーレをビニールテープ等で密閉し、キムタオル等の吸水パッドで包む。
- ③ 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 吸水パッドとともに試料を防水防漏性の袋に入れ密封する。
- ⑤ 試料と保冷剤（水、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・細菌検査記録・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 冷蔵宅配便で送付する。

4. 備考

(1) 培地の調製法

- ① 精製水（蒸留水または脱イオン水）に培地成分を溶解し、オートクレーブを使用して 121℃、15 分間滅菌する。
- ② 通常のシャーレ（直径 90 mm）を用いて寒天平板培地を作製する場合、培地の量は 1 枚あたり 20 mL を目安とする。
- ③ 寒天粉末には細菌の発育阻害作用のある微量成分が含まれるので、Bacto agar（Difco）など精製度のよい寒天を使用する。
- ④ 寒天平板培地は調製後すぐには使用せず、ある程度平板表面が乾燥してから使用する。
- ⑤ 細菌検査用培地類は、日水製薬、栄研化学、Difco、BBL、Oxoid などから市販されている。

(2) 検査試料、使用器具などの処理

- ① 検査試料（病魚）は、検査後速やかにオートクレーブにより滅菌後、廃棄する。
- ② 網などの採捕用具、輸送用コンテナおよびバケツ、長靴など病魚あるいは飼育水と接触した可能性のあるもの、検査に用いた器具などは、病原体による汚染・伝播を防止するために、洗浄、再使用あるいは廃棄の前に、必ずすべて消毒をする。

5. 参考文献

- 日本水産資源保護協会（1996）：エンテリックレッドマウス病、「魚類および貝類の病原体の検出と同定法（第 4 版）、魚類防疫技術書シリーズ、XIV」、37-39.
- LeJeune, J. T. and F. R. Rurangirwa (2000): Polymerase chain reaction for definitive identification of *Yersinia ruckeri*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 12, 558-561.
- Furones, M. D., C. J. Rodgers and C. B. Munn (1993): *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *Annual Rev. Fish Dis.*, 3, 105-125.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5177-5180.
- 坂井貴光・大迫典久・飯田貴次（2006）：レッドマウス病原菌の簡易迅速検出法について。魚病研究, 41, 127-130.

