

# バキュロウイルス・ペナエイ感染症

## Tetrahedral Baculovirus

### 1. 疫学

#### (1) 病名と病原体

① 病名：バキュロウイルス・ペナエイ感染症

英名：Tetrahedral baculovirus

② 病原体：Nucleopolyhedrovirus 属の *Baculovirus penaei* (BP) (国際ウイルス分類命名委員会の表記法では、PvSNPV)

少なくとも次の3つの地理的なタイプが知られる

#### (2) 発生地域

① アメリカ南東部大西洋沿岸およびメキシコ湾沿岸・カリブ諸国

② 南部・中部・北部アメリカ大陸太平洋沿岸

③ ハワイ

#### (3) 宿主域

ホワイトレッグシュリンプ (*Penaeus vannamei*)、ノーザンブラウンシュリンプ (*P. aztecus*)、ノーザンピンクシュリンプ (*P. duorarum*)、ノーザンホワイトシュリンプ (*P. setiferus*)、テラオクルマエビ (*P. marginatus*)、アカオエビ (*P. penicillatus*) など多くのクルマエビ類が感受性を有する可能性がある。

#### (4) 発症経過

① 幼生期（プロトゾエア、ミシス）およびポストラーバ期が最も高い感受性を示し、アメリカ大陸の種苗生産場において大量死亡が発生する。

② 稚エビあるいは成エビでは感染によって大量死亡が見られることはないが、稚エビ池や生育池の生残エビに成長不良や生残率低下が見られることがある。

③ 感染様式は、水平感染で、感染エビの組織・排泄物・包埋体 (occlusion body) あるいは汚染したデトライタスや水の摂取によって起こる。

#### (5) 消毒

OIE マニュアル (2006) では、受精卵とノープリウス幼生をホルマリンとヨード剤の組み合わせで消毒する方法が述べられている。

### 2. 診断手法

#### (1) 臨床検査、剖検

##### ① 準備

解剖道具、スライドグラス、顕微鏡、チャック付きポリ袋、氷、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10尾の瀕死エビまたは死亡直後の個体を採取する。

(b) 外観症状を記載する。

- ④ 剖検
  - (a) 体長、体重を測定する。
  - (b) ハサミ・ピンセットを用いて解剖する。
  - (c) 内臓の異常の有無を調べ、解剖所見を記載する。
- ⑤ 外観症状
 

特徴的な症状は乏しい。
- ⑥ 剖検所見
 

重度の感染個体では中腸に白濁がみられることが多い。

## (2) ウエットマウント法（直接検鏡）

- ① 準備
  - (a) 解剖道具、スライドグラス、カバーグラス、顕微鏡（位相差あるいは明視野）
  - (b) 半海水または1%食塩水
- ② 手技
  - (a) 半海水または1%食塩水を用いて、エビ幼生の押潰し標本（肝臓、中腸）あるいは稚エビ・成エビの排泄物のウエットマウント標本を作製し、顕微鏡で観察する。
  - (b) 排泄物を用いる方法は、稚エビあるいは成エビ、特に親エビの非破壊検査で有用である。検査用のエビを水槽に移し、数時間おいて排泄物を集め、直接ウエットマウント標本を作製する。
- ③ 観察結果
  - (a) 押潰し標本では、肝臓、中腸の上皮細胞の核内に単独もしくは複数が塊となった四面体型あるいはピラミッド型の包埋体（大きさ  $0.1\ \mu\text{m}$  以下から  $20\ \mu\text{m}$  程度）を確認する（写真1）。
  - (b) 排泄物の標本では、 $20\ \mu\text{m}$  程度で四面体型あるいはピラミッド型の包埋体を確認する。

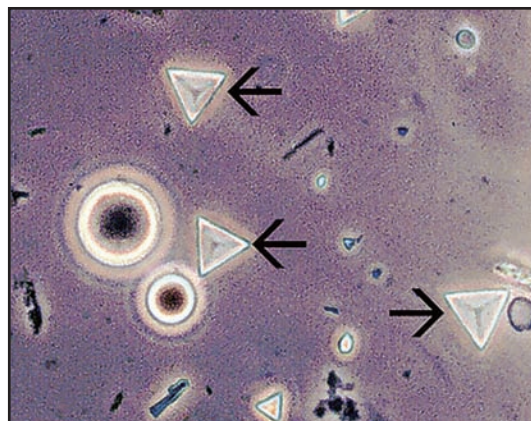


写真1 BPに冒されたホワイトレグシュリンプの排泄物のウエットマウント標本。四面体の包埋体（矢印）が観察される。（D.V.Lightner 博士提供）

## (3) PCR法—方法1

- ① 準備
  - (a) 採取した病エビの肝臓および中腸の抽出DNA
  - (b) PCR法使用機器（サーマルサイクラー、マイクロピペット、エッペンドルフチューブ、電気泳動装置、トランスイルミネーターなど）および試薬（酵素など）
  - (c) プライマー
    - BPA : 5'-GAT CTG CAA GAG GAC AAA CC-3'
    - BPF : 5'-TAC CCT GCA TTC CTT GTC GC-3'
    - 増幅産物サイズ : 196bp
- ② 手技
  - (a) 採取した病エビ試料を適当なDNA抽出キットにより核酸抽出する。抽出法などは、使用するキットのマニュアルに従う。抽出核酸は、 $100^{\circ}\text{C}$ で3分間加熱した後、急速冷却してPCRのテンプレートとする。
  - (b) PCRに際しては、テンプレートとして次の対照が必要である：a)BP陰性エビ組織から同様な方法で抽出したDNA、b)BP陽性エビ組織から同様な方法で抽出したDNA（BP陰性のエビ

- 組織に陽性対照 cDNA プラスミド等を加えたものから抽出しても良い)、c) テンプレートなし。
- (c) 抽出した核酸および対照 DNA をテンプレートとして、上記のプライマーを用いて PCR 反応を行う。反応は、95℃で 3 分間、次いで 94℃で 30 秒間、60℃で 30 秒間、72℃で 1 分間を 30 サイクル、最後に 72℃で 5 分間行う。
- (d) 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。
- (e) 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 196bp の増幅産物のバンドの有無を観察する。

#### (4) PCR 法—方法 2

##### ① 準備

- (a) 採取した病エビの鰓等のクチクラ上皮を含む組織あるいは血リンパの抽出 DNA
- (b) PCR 法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、エッペンドルフチューブ、酵素・試薬類、電気泳動装置および試薬類、トランスイルミネーターなど)
- (c) プライマー

6581 : 5'-TGT AGC AGC AGA GAA GAG-3'

6582 : 5'-CAC TAA GCC TAT CTC CAG-3'

増幅産物サイズ : 644bp

##### ② 手 技

- (a) 試料の調製法等は、(3)PCR 法 - 方法 1 と同じ。ただし、PCR の反応は、95℃で 5 分間、次いで 95℃で 30 秒間、65℃で 30 秒間、72℃で 1 分間を 35 サイクル、最後に 72℃で 7 分間行う。
- (b) 方法 1 と同様にして、PCR 終了後、1.5%程度のアガロースゲルで電気泳動し、分子量 644bp の増幅産物のバンドの有無を観察する。

#### (5) 病理組織学的検査

##### ① 準備

- (a) 解剖道具、シリンジ、固定用サンプル瓶、スライドグラス、カバーグラス、顕微鏡
- (b) ダビッドソン固定液 (95%エタノール 330mL、ホルマリン 220mL、酢酸 115mL、蒸留水 335mL)
- (c) パラフィン切片の作製に必要な器具および試薬、ヘマトキシリン・エオシン染色等の染色に必要な器具および試薬。染色液として、グラム染色液 (Brown and Brenn の組織学用) も有用である。

##### ② 手 技

- (a) サンプルの頭胸部等にダビッドソン固定液を注射 (体重の 5~10%) する。  
供試組織としては、特に肝臓および中腸前部が有用である。肝臓は固定されにくいので、固定液を注入後、頭胸部を切開して固定液の浸透を促進する。
- (b) サンプルの頭胸部等をダビッドソン固定液中で 12~24 時間固定し、その後 70%エタノールに保存する。
- (c) 常法によりパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色等を施す。
- (d) 顕微鏡を用いて組織観察を行う。

##### ③ 病理組織学的所見

- (a) 四面体構造で明るい赤色に染色された包埋体が肝臓あるいは中腸の上皮細胞の核内に観察される (写真 2、3)。その他、これら組織の核のクロマチンの減少や核膜周縁への移動も観察される。

(b) グラム染色では、包埋体は特異的に染色される訳ではないが、周辺組織の染色性と異なるため、包埋体が少ない標本では観察しやすい。

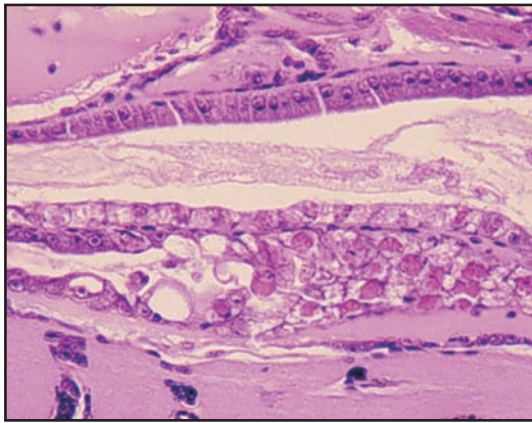


写真2 BPに冒されたホワイトレッグシュリンプのポストラーバの病理組織像 (HE 染色、低倍)。 (D. V. Lightner 博士提供)

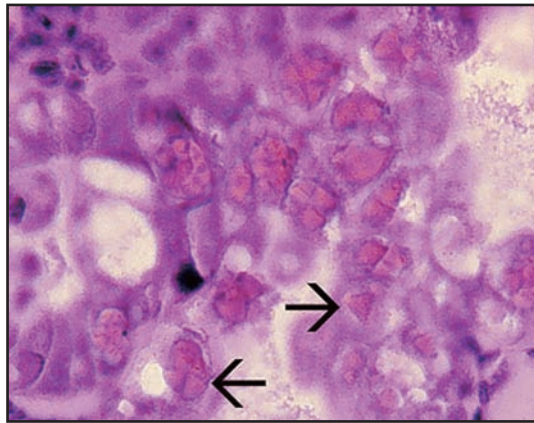


写真3 BPに冒されたホワイトレッグシュリンプのポストラーバの病理組織像 (HE 染色、高倍)。エオシンに染まった包埋体 (矢印) が観察される。 (D. V. Lightner 博士提供)

### 3. 診断のための養殖研究所への試料の送付

#### (1) 送付試料

- ① ウエットマウント標本で包埋体が確認あるいは疑われた個体、または、PCR 検査で陽性または疑陽性と診断された個体の試料・記録を養殖研究所へ送付する。
- ② 送付するもの：臨床検査・剖検記録、ウエットマウント標本あるいは写真、PCR の泳動像写真、PCR 検査用組織試料（凍結、冷蔵あるいは 70%エタノール固定）および病理組織学的検査用固定サンプル（ダビッドソン固定液で固定後、70%エタノールに置換・保存したもの）

### 4. 類似疾病検査

バキュロウイルス性中腸腺壊死症（BMN：Baculoviral Midgut Gland Necrosis）は本病と誤診されやすい。両者では、光学顕微鏡による感染細胞の病理組織像は類似しているが、BMN は包埋体を形成しないため、区別が可能である。感染初期や感染の程度の低い個体では包埋体の確認が難しいため、誤診される場合があるが、PCR によって区別できる。

### 5. 参考文献

- Bell, A.T. and D.V. Lightner (1988): A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. The World Aquaculture Society.
- Fauquet C.M., M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. Ball (2005): Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 1259 pp.
- Lightner, D.V. (Ed.) (1996): A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. The World Aquaculture Society.
- World Organisation for Animal Health (OIE)(2006): Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, Chapter 2.3.4.; [http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A\\_00051.htm](http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00051.htm).