

モノドン型バキュロウイルス感染症

Spherical Baculovirosis

1. 疫学

(1) 病名と病原体

- ① 病名：モノドン型バキュロウイルス感染症
英名：Spherical Baculovirosis
- ② 病原体：Nucleopolyhedrovirus 属の *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) (国際ウイルス分類命名委員会の表記法では、PemoNPV)
複数のタイプがあると考えられる。

(2) 発地域

中国・台湾を始めとする太平洋・インド洋、中近東、地中海、アフリカ、ハワイ、タヒチ、南北アメリカ諸国

(3) 宿主域

- ① 感受性種：ウシエビ（ブラックタイガー）(*Penaeus monodon*)、テンジクエビ（バナナエビ）(*P. merguensis*)、クマエビ (*P. semisulcatus*)、インドエビ (*P. indicus*)、アカオエビ (*P. penicillatus*)、ブラウンタイガー (*P. esculentus*)、カラモートエビ (*P. kerathurus*) など
- ② 非感受性種：ホワイトレグシュリンプ (*P. vannamei*)、ブルーシュリンプ (*P. stylirostris*)

(4) 発症経過

- ① 卵およびノープリウス幼生を除く全ての生活史の段階で、肝臓と中腸前部の粘液上皮細胞に感染する。
- ② 幼生期（プロトゾエア・ミス）およびポストラーバ初期ステージで最も死亡が多く発生する。
- ③ 流行地域の稚エビや成エビでは、MBV の感染率が 50%~100% 近くあるが、重度のストレス下でない限り、通常死亡が発生することはない。
- ④ 重度に感染した個体では、成長低下し、結果的には生残率の低下、養殖成績の低下を招く。
- ⑤ 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、0.1%マラカイトグリーン溶液
- 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。マラカイトグリーンで染色すると他の球状の物質と区別が容易である。
 - (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。マラカイトグリーンで染色すると他の球状の物質と区別が容易である。
- 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塊となった球状の包埋体を確認する（写真1）。包埋体は、わずかに屈折した緑色の核内封入体で、直径が0.1 μm以下から20 μm程度である。包埋体の方が宿主の球状物質よりマラカイトグリーンによって濃く染色させる（写真2）。
 - (b) 排泄物の標本では、単独もしくは複数塊となった球状の包埋体を確認する。包埋体の方が宿主の球状物質よりマラカイトグリーンによって濃く染色させる。

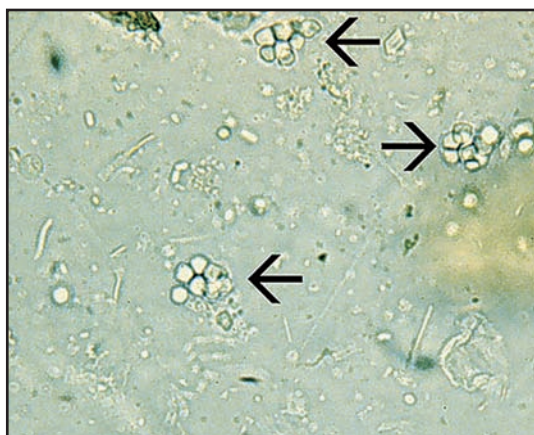


写真1 MBVに冒されたウシエビの腸内容物のウエットマウント標本。球形の包埋体の塊（矢印）が観察される。（D. V. Lightner 博士提供）

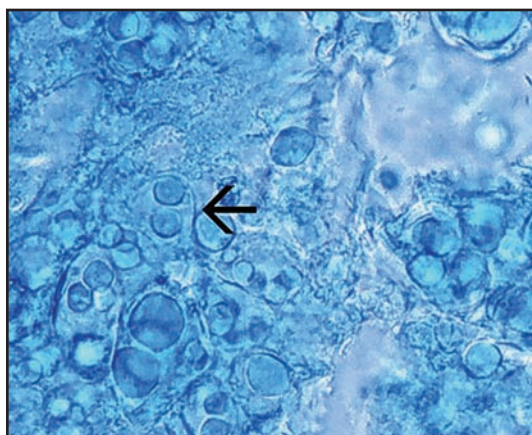


写真2 MBVに冒されたウシエビの腸内容物のウエットマウント標本（0.1%マラカイトグリーン染色）。核内に単独あるいは塊の包埋体（矢印）が観察される。（D. V. Lightner 博士提供）

(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

261F : 5'-AAT CCT AGG CGA TCT TAC CA-3'

261R : 5'-CGT TCG TTG ATG AAC ATC TC-3'

増幅産物サイズ ; 261bp

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℃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) MBV 陰性エビ組織から同様な方法で抽出した DNA、b) MBV 陽性エビ組織から同様な方法で抽出した DNA (MBV 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 5 分間、次いで 94℃で 30 秒間、60℃で 30 秒間、72℃で 30 秒間を 35 サイクル、最後に 72℃で 7 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 261bp 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 (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

MBV1.4F : 5'-CGA TTC CAT ATC GGC CGA ATA-3'

MBV1.4r : 5'-TTG GCA TGC ACT CCC TGA GAT-3'

増幅産物サイズ ; 533bp

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 94℃で 30 秒、65℃で 30 秒、72℃で 1 分間を 40 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 533bp 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。

供試材料としては、瀕死あるいは弱った個体が良く、死亡した個体は好ましくない。供試組織としては、特に肝臓および腸管 (中腸) が有用である。

(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) 球状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 3、4)。包埋体は、クロマチンが減少し周縁へ移動して著しく肥大した核内に一つ、しばしば複数個観察される。

(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。

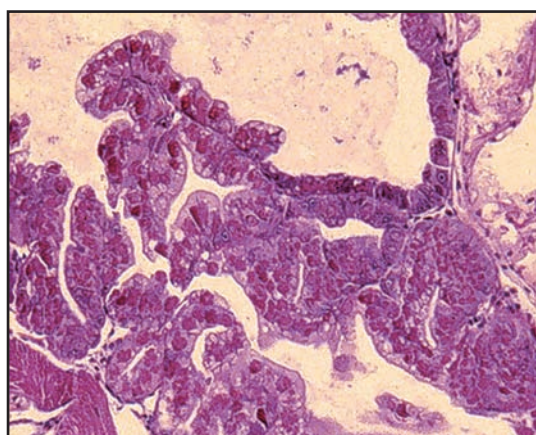


写真 3 MBV に冒されたウシエビの肝臓の病理組織像 (HE 染色、低倍)。核内にエオシンに染まった包埋体が観察される。

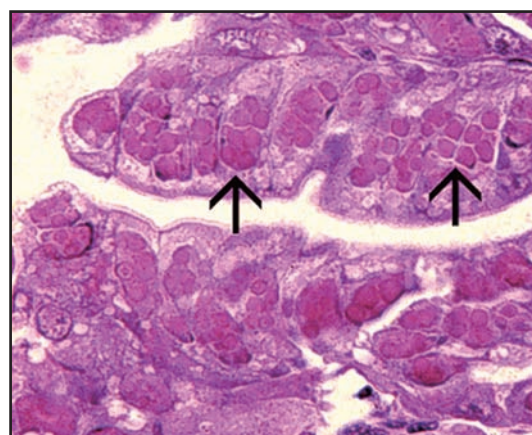


写真 4 MBV に冒されたウシエビの肝臓の病理組織像 (HE 染色、高倍)。核内にエオシンに染まった包埋体 (矢印) が観察される。

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 ウェ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、ウェ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軽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 2.3.5.; http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00052.htm.

