

## 1. 疫学

### (1) 病名と病原体

① 病名：イエローヘッド病

英名：Yellowhead Disease (YHD)

② 病原体：Yellowhead virus (YHV)：ロニウイルス科 *Okavirus* 属に分類される。

イエローヘッド複合ウイルス群には、6つの遺伝子型が知られ、YHVは遺伝子型1であり、イエローヘッド病の病原体である。遺伝子型2である Gill-associated virus (GAV) およびその他4つの遺伝子型(3~6)は、東アジア、アジアおよびオーストラリアの健康なウシエビで一般的に検出され、本病とほとんど関連がない。

### (2) 発生地域

中国、インド、インドネシア、マレーシア、フィリピン、スリランカ、台湾、タイ、ベトナム (GAV および他の遺伝子型:オーストラリア、インド、インドネシア、マレーシア、モザンビーク、フィリピン、台湾、タイ、ベトナム)

### (3) 宿主域

① 自然感染は、主にウシエビ (ブラックタイガー) (*Penaeus monodon*) で、その他、クルマエビ (*P. japonicus*)、テンジクエビ (バナナエビ) (*P. merguensis*)、ホワイトシュリンプ (*P. setiferus*)、ヨシエビ (*P. ensis*) 等で報告されている。

② 実験感染では、ホワイトレッグシュリンプ (*P. vannamei*)、ブルーシュリンプ (*P. stylirostris*)、ブラウンシュリンプ (*P. aztecus*) など多くのクルマエビ類等が感受性を示す。

③ 実験的に感染可能な宿主範囲は広いが、自然での発症はウシエビ (ブラックタイガー) であるので、この種の移動には特に注意が必要である。

### (4) 発症経過

① 数日間の異常な摂餌率の増加が見られた後、完全に摂餌が止り、1日以内に養殖池の縁の表面近くをゆっくり泳ぐ少数の瀕死エビがみられるようになる。この時のエビの頭胸部は少し黄色くなっている。2日以内に同様な状態の多数のエビがみられ、3日目には摂餌は完全にみられなくなり、大量死が認められるようになる。

② ウシエビではポストラーバ (PL) 15以降のものが感染しやすい。

### (5) 消毒

OIE マニュアル (2006) では、YHV は 60℃で 15 分間の加熱処理または 30ppm の塩素にて不活化すると述べられている。

## 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 尾の瀕死魚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
 

摂餌不良と遊泳緩慢が認められ、重症のエビは体部が黄色味がかった白となり、しばしば、頭胸部が膨れている（写真 1）。
- ⑥ 剖検所見
 

鰓の白色化あるいは薄黄色（写真 2）、時として肝臓の薄黄色化がみられる。



写真1 YHDに罹病したウシエビ（左）の外観症状。頭胸部が黄色味がかかる。右は健全エビ。(D. V. Lightner 博士提供)



写真2 YHDに罹病したウシエビの黄色化した鰓。(D. V. Lightner 博士提供)

## (2) 鰓のウェットマウント法（直接検鏡）

- ① 準備
  - (a) 解剖道具、固定用試料バイアル、スライドガラス、カバーガラス、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) ヘマトキシリン・エオシン (H&E) 染色に必要な器具および試薬
- ② 手技
  - (a) エビの個体全部あるいは鰓をダビッドソン固定液中で一晩固定する。
  - (b) 固定後、鰓の一部を切り出し、流水で固定液を十分取り除く。
  - (c) 通常の H&E 染色と同様に染色後、エタノールで脱水し、キシレンで透徹する。
  - (d) キシレンを一滴たらしたスライドガラスに鰓を載せ、2本の柄付き針で5,6個の二次鰓弁を手早く外す。残った鰓本体は標本として密閉できるバイアルなどでキシレン中に保存する。
  - (e) スライドガラス上の二次鰓弁で大きく厚みのあるものは取り除く。
  - (f) 調べる二次鰓弁にマウント剤を1,2滴たらし、カバーガラスを載せた後、カバーガラスを軽く押しながら、できるだけ薄く平らにする（これは永久標本として保存できる）。
  - (g) 光学顕微鏡で40倍の対物レンズを用いて観察する。
- ③ 観察結果
 

均一に濃く塩基性に染まる球状の細胞質内封入体（直径約  $2\mu\text{m}$  あるいはそれ以下）が中程度あ

るいは比較的多数認められた場合は、本疾病の可能性がある。

### (3) 血リンパ塗抹のギムザ染色

#### ① 準備

- (a) 1mL シリンジ、スライドガラス、カバーガラス、顕微鏡
- (b) 25%ホルマリン液あるいはダビッドソン固定液（作製組成は酢酸を水またはホルマリンに換える）、エタノール
- (c) ヘマトキシリン・エオシン (H&E) 染色に必要な器具および試薬

#### ② 手技

- (a) 25%ホルマリン液あるいはダビッドソン固定液 0.6mL を入れた 1mL 容注射器で、腹部または心臓付近から血リンパを約 0.3mL 採取し、注射器内で良く混合する。クロットができて構わない。
- (b) スライドガラスに注射器内で混合した血リンパを滴下し、カバーガラスまたは血液伸展専用の用具で伸展し、ただちに風乾する。
- (c) H&E 染色を行う。
- (d) エタノールで脱水後、マウント剤とカバーガラスで封入する。
- (e) 光学顕微鏡で 40 倍の対物レンズを用いて観察する。

#### ③ 観察結果

中程度あるいは比較的多数の核濃縮、核崩壊が血球に認められた場合、本疾病の可能性がある。また、このような血リンパ液中に細菌が見られないことも重要である（多くの細菌感染でこのような核変化を起こさせる）。本病の発病ステージの進んだ個体では、通常血球がほとんどないため、本法は有用ではなく、鰹のウエットマウント法の補助として用いること。

### (4) RT-PCR 法— 方法 1

#### ① 準備

- (a) 採取した病エビのリンパ組織、鰹あるいは血リンパの抽出 RNA
- (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 (RT-PCR キット\*など)

\* RT-PCR キット：SuperScript III One-Step RT-PCR (インビトロジェン社)

#### (c) プライマー

10F : 5'-CCG CTA ATT TCA AAA ACT ACG-3'

144R: 5'-AAG GTG TTA TGT CGA GGA AGT-3'

増幅産物サイズ；135bp

#### ② 手技

- (a) 採取した病エビ試料を適当な RNA 抽出キット (Trizol など) 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。
- (b) RT-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)YHV 陰性エビ組織から同様な方法で抽出した RNA、b)YHV 陽性エビ組織から同様な方法で抽出した RNA、c) テンプレートなし。
- (c) 抽出した核酸および対照 RNA をテンプレートとして、上記のプライマーを用いて 1 ステップの RT-PCR 反応を行う。反応は、60℃で 30 分間逆転写反応後、94℃で 2 分間処理し、次いで PCR 反応として、94℃で 30 秒間、58℃で 30 秒間、72℃で 30 秒間を 40 サイクル、最後に 72℃で 10 分間行う。
- (d) RT-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。

- (f) 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 135bp の増幅産物のバンドの有無を観察する。

## (5) RT-PCR 法—方法 2 (RT-nested PCR)

### ① 準備

- (a) 採取した病エビのリンパ組織、鰓あるいは血リンパの抽出 RNA  
(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 (RT-PCR キット\* など)

\* RT-PCR キット: SuperScript III One-Step RT-PCR (インビトロジェン社)

- (c) 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など)

### (d) プライマー

a: 1st RT-PCR

GY1: 5'-GAC ATC ACT CCA GAC AAC ATC TG-3'

GY4: 5'-GTG AAG TCC ATG TGT GTG AGA CG-3'

増幅産物サイズ; 794bp

b: 2nd PCR (YHV 特異的。GAV は増幅しない。)

GY2: 5'-CAT CTG TCC AGA AGG CGT CTA TGA-3'

Y3: 5'-ACG CTC TGT GAC AAG CAT GAA GTT-3'

増幅産物サイズ; 277bp

### ② 手技

#### 1st RT-PCR

- (a) 試料の調製法および試薬等は、方法 1 と同じ。  
(b) 抽出した核酸および対照 RNA をテンプレートとして、上記の a プライマーセット (GY1/GY4) を用いて 1 ステップの RT-PCR 反応を行う。反応は、60℃で 30 分間逆転写反応後、94℃で 2 分間処理し、次いで PCR 反応として、95℃で 30 秒間、66℃で 30 秒間、72℃で 45 秒間を 35 サイクル、最後に 72℃で 7 分間行う。  
(c) RT-PCR 反応液 5 μL を採取し、電気泳動用サンプル緩衝液と混合後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 1%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 794bp の増幅産物のバンドの有無を観察する。

#### 2nd PCR

- (a) 1st RT-PCR 反応液 (1 μL) および陽性対照 cDNA をテンプレートとして、上記の b プライマーセット (GY2/Y3) を用いて PCR 反応を行う。反応は、95℃で 30 秒間、66℃で 30 秒間、72℃で 45 秒間を 35 サイクル、最後に 72℃で 7 分間行う。  
(b) 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。  
(c) 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 277bp の増幅産物のバンドの有無を観察する。

\* なお、GAV の感染を疑う場合には、プライマーを次の GY2 と G6 を使い、1st RT-PCR 産物を試料とし同様に 2nd PCR を行う。反応産物として、406bp のバンドが観察される。

GY2 : 5'-CAT CTG TCC AGA AGG CGT CTA TGA-3'

G6 : 5'-GTA GTA GAG ACG AGT GAC ACC TAT-3'

増幅産物サイズ ; 406bp

## (6) 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

### 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、特にリンパ組織、胃、鰓が有用である。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

本疾病に感染している場合には、組織に強い壊死が散在し、核濃縮と核崩壊が認められる (写真 3)。特にリンパ組織、造血組織、鰓、皮下組織、筋肉、腸、生殖腺等外胚葉由来および中胚葉由来組織において、均一に濃く塩基性に染まる球状の直径約  $2\mu\text{m}$  またはそれ以下の細胞質内封入体が中程度あるいは比較的多数観察される (写真 4)。

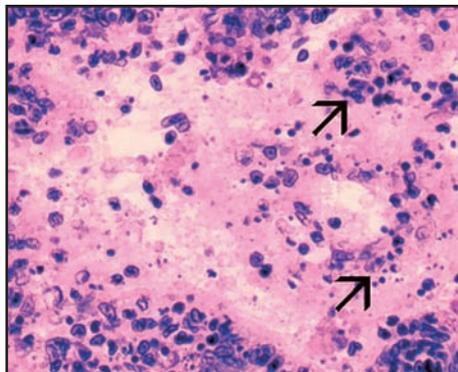


写真 3 YHD に罹病したウシエビのリンパ組織の病理組織像 (HE 染色)。強い壊死が散在し、核濃縮と核崩壊 (矢印) が認められる。(D.V. Lightner 博士提供)

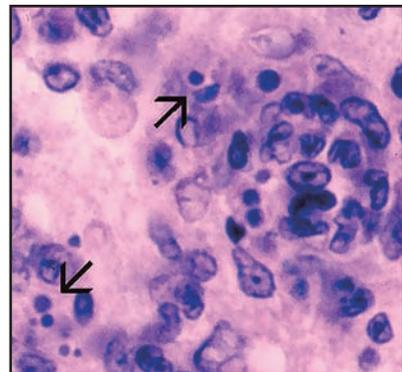


写真 4 YHD に罹病したウシエビのリンパ組織の病理組織像 (HE 染色)。核周辺部の細胞質内に球形の塩基性封入体 (矢印) が認められる。(D.V. Lightner 博士提供)

## 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 RT-PCR 法の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、鰓のウエットマウント標本あるいは写真、血リンパ塗抹のギムザ染色標本あるいは写真、RT-PCR 検査用組織試料 (凍結保存 : 輸送も凍結状態を維持すること) 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

病理所見はタウラ症候群 (Taura syndrome (TS)) と類似しているが、RT-PCR によって区別できる。タウラ症候群の項参照。

## 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 2.3.3.; [http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A\\_00050.htm](http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00050.htm)