

農林水産省委託事業

魚類防疫技術書  
**養殖カンパチの**  
**魚病診断マニュアル**  
(改訂版)

平成30年3月

公益社団法人 日本水産資源保護協会



平成 30 年度 農林水産省委託事業

魚類防疫技術書

## 養殖カンパチの魚病診断マニュアル (改訂版)

第 1 章	カンパチ養殖の概要	1
第 2 章	魚病診断 概説	9
第 3 章	魚病診断 各論	29
第 4 章	カンパチの魚病	55

マダイイリドウイルス病  
ビブリオ病  
ビブリオ・ハーベイ感染症  
類結節症  
 $\alpha$  溶血性レンサ球菌症  
新型レンサ球菌症  
滑走細菌症  
ノカルジア症  
抗酸菌症  
エピテリオシスチス症  
イクチオホヌス症  
脳微孢子虫症  
べこ病  
白点病  
心臓クドア症  
奄美クドア症  
ハダムシ (ベネデニア) 症  
ハダムシ (ネオベネデニア) 症  
エラムシ (ゼウクサブタ) 症  
エラムシ (ヘテラキシネ) 症  
住血吸虫症  
ヒルディネラ類吸虫による幼虫移行症  
カンパチ筋肉条虫症  
ウズムシ症  
アニサキス症  
鰓カリグス症  
皮膚カリグス症  
ヒドラの着生  
オヨギイソギンチャクの刺症  
腎腫大症

参考資料	118
------	-----



# 第1章

## カンパチ養殖の概要

# 1. カンパチ養殖の概要

## 1) 養殖カンパチ

アジ科ブリ属に属するカンパチ (*Seriola dumerili*) は、東部太平洋を除く全世界の温帯・熱帯海域に生息している。日本国内では東北地方以南に分布し、南日本の太平洋岸に多く、日本海側には少ない。カンパチは魚体重が 80 kg に達することもある大型の肉食魚であり、最も美味しいサイズは体重 2～3 kg のものであると言われている。しかしながら、魚体重 3 kg 以下では頭部の割合が高く、肉の歩留まりが悪くなるため、市場では 3～3.5 kg が好まれる傾向にあり (宮下・熊井, 2000), 養殖魚として市場に流通している商品価値が高いサイズは 3～4.5 kg がほとんどである。

## 2) 養殖の概要

カンパチ養殖は、1960 年頃から三重県や和歌山県で開始されたが、当初、日本近海への稚魚の来遊数は少なかったため、業者数も養殖尾数も少なかった。1986 年に中国産種苗が初めて国内に輸入されて以降、中国産種苗の輸入量の増加に従い、放養尾数は飛躍的に増加した。種苗が国内産に限られていた頃は、養殖は稚魚の確保が容易な高知県須崎地区が中心であったが、中国産種苗の増加に伴い、種苗の輸送や生育環境に恵まれた鹿児島県に養殖の中心が移行した。

カンパチの飼育適水温はハマチよりやや高く 20～31℃であり、当歳魚は 26～30℃で最も良く成長するが、水温が 32℃以上、15℃以下では摂餌してもほとんど成長がなく、体重が減少する場合もある (原田, 1969)。特に 13℃以下の低水温で投餌を行うと死に至る場合も見られる。

餌料はイワシ類を中心とした低廉多獲魚の生鮮または冷凍品、あるいは生餌と配合飼料を混合したモイストペレット (MP 飼料)、及び固形飼料 (EP 飼料) が用いられる。EP 飼料の使用は少なく、生餌を主体とした飼料を与えているのが現状である (宮下・熊井, 2000)。

カンパチは同属のブリ以上にハダムシ、エラムシなどの寄生虫による被害が大きく、これらの駆除に細心の注意を払う必要があるため、築堤式や網仕切り方式による養殖よりも、生簀網による飼育が適している。風波による被害の予想される海域 (例えば、宮崎県や鹿児島県等) では、沈下式の生簀が使用される。愛媛県では飼育 1 年目はポリ網単独もしくは金網生簀内にポリ網を敷設した生簀が使用され、沈下式の生簀はほとんど使用されていない。生簀サイズは一辺が 8～12m の様々な方形生簀が使用され、深さは概ね 5～8m に設定されている。養殖期間中、高水温期の稚魚では 1 週間に 1 回程度の寄生虫駆除が行われる。養殖開始から 1 年を超え魚体サイズが 1kg 近くになると、ポリ網から金網での飼育に移行する。金網に收容すると寄生虫の寄生強度はポリ網での飼育よりも低下するものの、月に 1～2 回は寄生虫の駆除は行われている。

收容密度は、和歌山県では最大で 12kg/m<sup>3</sup>、鹿児島県では 15～20 kg/m<sup>3</sup> で、出荷時には 28～39 kg/m<sup>3</sup> に達するとの報告もある (宮下・熊井, 2000)。愛媛県においても他海域と同様、

15～27 kg/m<sup>3</sup>の範囲で収容されている。

出荷までの期間は、稚魚搬入後1年半～2年弱である。愛媛県では稚魚の搬入は4～8月(盛期4、5月)に行われ、出荷は早いもので9月から始まり、翌年7月頃までには終了する。カンパチ養殖は、マダイやヒラメ養殖のような完全養殖とは異なり、稚魚のほとんどを外国産天然種苗に依存しており、種苗の品質が、その後の成長や歩留まりに大きな影響を与える。そのため、優良種苗の確保は、カンパチ養殖の経営安定化には欠かせない重要な要素である。一方、魚病診断の際に行う聞き取り調査は、重要な疫学情報となるが、稚魚が外国産である場合、稚魚の育成に関する詳細な情報を入手することは難しい。本章では、疫学情報取得の際の一助とするため、中国産種苗の採捕海域と育成海域、輸入経路、育成管理等の基本的な情報について整理した。

## II. 種苗の輸入

### 1) 中国国内での稚魚の採捕海域と育成海域

中国におけるカンパチ種苗は11～3月頃までは海南島付近で採捕されるが、漁期の後半にあたる4～5月は広東省汕尾付近でも採捕される。採捕された種苗は、病気(イリドウィルス病)対策の関係で水温事情に応じて海南島(概ね11月～翌年3月)、広東省(概ね4～5月)、福建省(概ね6月以降)のそれぞれの海域で育成されていた(図1参照)。しかし最近では、地球温暖化による水温の上昇で、海南島と広東省の水温差がなくなってきたため、広東省への移動を行わず、海南島から直接福建省へ魚群を運ぶ飼育体制が主流になりつつある。5月末までに(28℃前後で)全量を移動する。

海南島における稚魚育成地は、3海域(三亜、万寧、文昌)存在する(図2)。2008年当時、海南島における各海域での放養量は、三亜で約500万尾、万寧・文昌で約200万尾であり、稚魚育成地の中心は三亜であった(表1)。ところが、2009年以降、三亜における主要育成地が中国の国内事情(軍事的な問題:軍港の設置)で使用出来なくなったため、海南島における稚魚育成地は大きく変化した。2009年も2008年と同様、海南島における稚魚育成地の中心は三亜であったものの、三亜の稚魚育成地は漁場3から漁場2へ移動した(図2,表1)。さらに2010年には三亜の主要稚魚育成地は、漁場2から漁場4へ移動し(表1)、各海域における放養量も、三亜で約300万尾、万寧で約200万尾、文昌で約200万尾と、海南島における稚魚の育成地は、三亜中心から3海域分散へと変化した。2008年まで使用していた育成漁場は、カンパチ種苗の適地であったらしい。以前の三亜漁場から50kmほど北にある、陵水地区漁場の生産者に聞いた話では(2017年2月)、「水温が1℃違う(高かった)」ということだ。成長が以前よりも劣り、病気の被害も多くなったと言う。日本でも問題になっている「眼球炎」は、中国でも日本でも、この漁場移動が行われた2009年以降に問題化してきている。

先に述べたように海南島では主要な稚魚育成場が3海域あるが、種苗流通業者により、取り扱う稚魚の育成地が異なっている(図2,表2)。これに対して広東省における主要な稚魚育成地は汕尾のみ(図1)であることから、広東省では、汕尾が各種苗流通業者共通の稚魚育成地であると言える(表2)。中国国内には漁業権という制度はないため、基本的に漁場の場

所は自由に選ぶことができ、放養量の制限もないため、漁場の規模は稚魚の放養量に応じて大きく変化する。聞き取り調査の結果、広東省汕尾の稚魚育成場は稚魚 1000 万尾を放養可能なレベルの大きな漁場である。

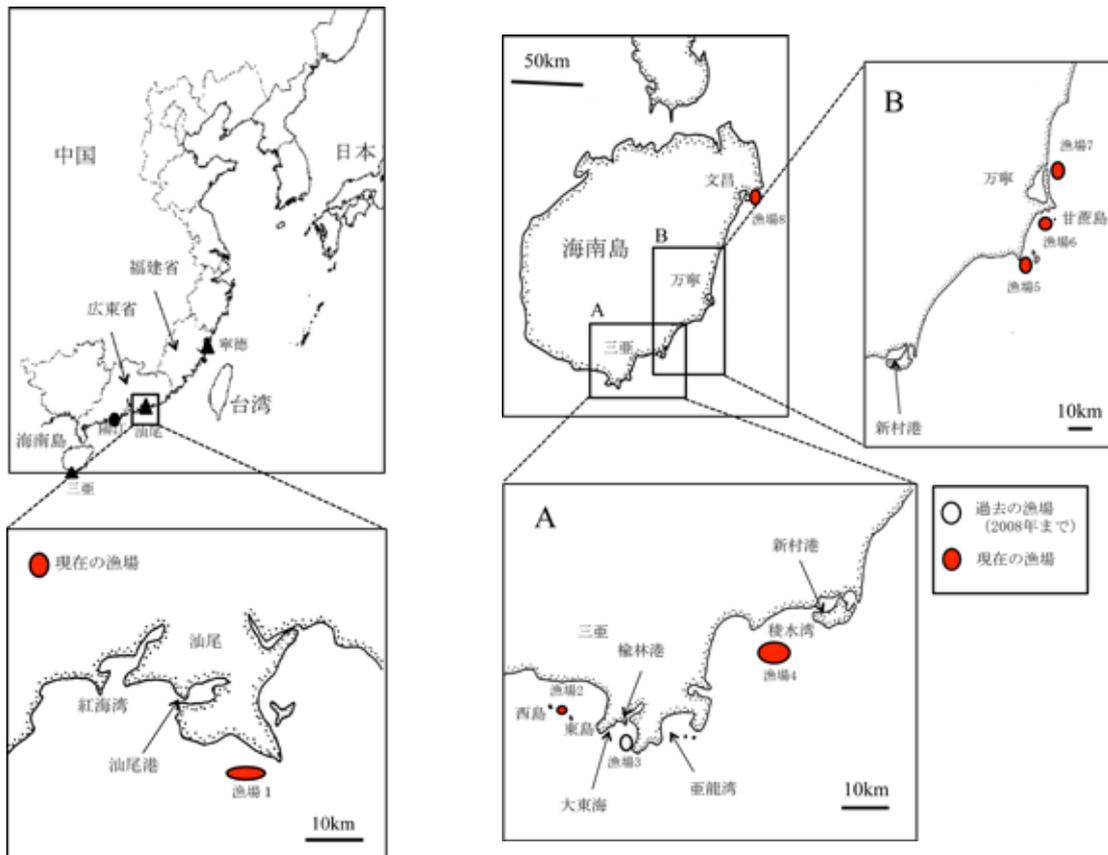


図 1-1 中国国内における稚魚育成場となる主要漁場

図 1-2 海南島における稚魚育成漁場

表 1-1 海南島における稚魚育成漁場の変化 (2008 ~ 2010 年)

	三亜			万寧	文昌
	漁場 2	漁場 3	漁場 4		
2008 年		●		●	●
2009 年	●			●	●
2010 年	●		●	●	●

表 1-2 各種苗流通業者の主要な稚魚育成漁場

種苗流通業者	広東省		海南島					
	汕尾	三亜	万寧		文昌			
	漁場 1	漁場 2	漁場 4	漁場 5	漁場 6	漁場 7	漁場 8	
A	○	○			○			
B	○		○					
C	○		○					
D	○				○		○	
E				○		○	○	
F	○					○	○	
G	○					○		
H	○			○				
I	○			○				

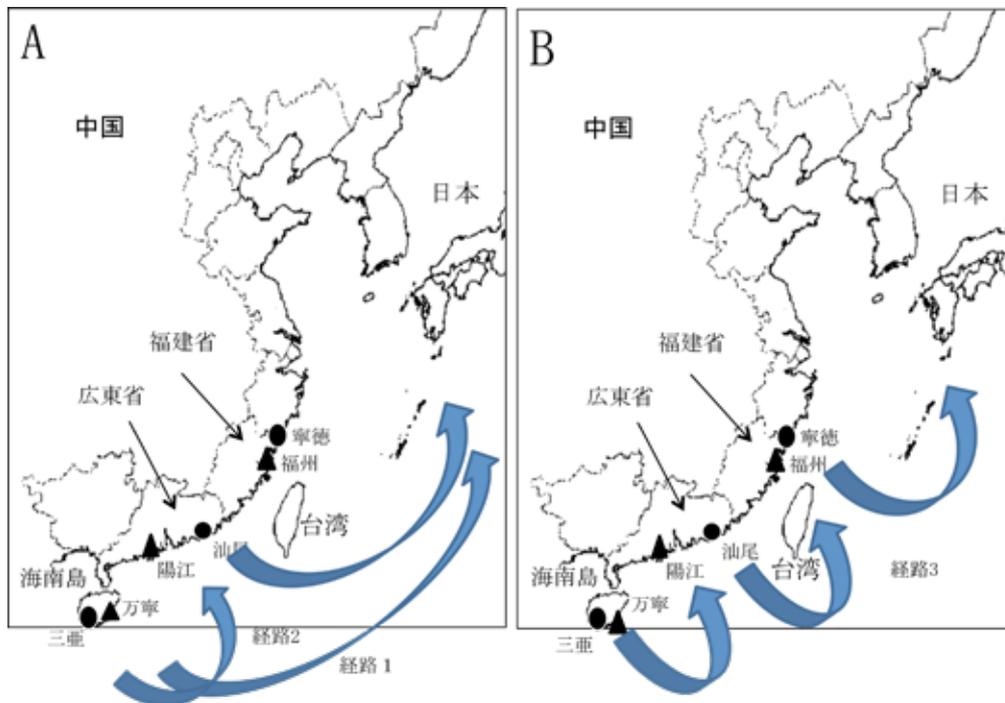


図 1-3 中国産種苗の日本国内への輸入経路

## 2) 中国産種苗の日本国内への輸入経路

稚魚の育成海域は、水温の上昇に伴い海南島から北の育成漁場へと移動していくため、輸入経路もそれに応じて変化する。日本国内への稚魚搬入経路は、海南島から直接、日本国内へ搬入される経路（第 1 経路）、海南島から広東省汕尾を経由する経路（第 2 経路）、広東省汕尾から福建省寧徳を経由する経路（第 3 経路）の 3 つに大別される（図 1-3）。日本国内への稚魚の搬入は 5 月には概ね終了することから、海南島から直接、あるいは海南島から広東省汕尾を経由する第 1、2 経路（図 1-3- A）で搬入されるケースがほとんどであり、福建省寧徳を経由する第 3 経路（図 1-3- B）で搬入されるケースは少ない。

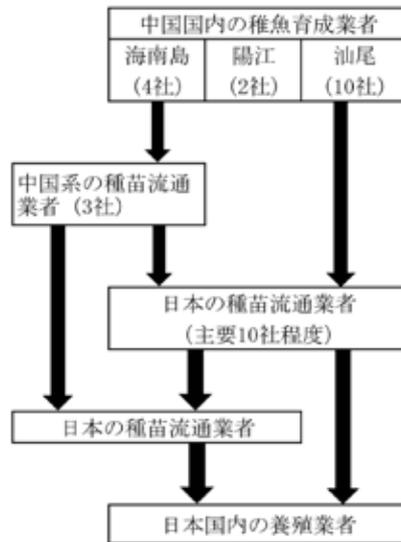


図 1-4 中国から輸入されるカンパチ稚魚の流通システム

### 3) 種苗の流通

漁期初めの11月に採捕されたトビ(大型)の種苗は、1月には出荷される。数量は少ないが「一番仔」として高値で取引される。以降、順次 25cm前後に成長した稚魚が、5月まで日本に輸送される。種苗の価格は(2017年調査)、トビが550円/尾、2～3月出荷魚群では400～450円/尾であった(中国での浜値)。日本着の種苗は、運送代や諸経費が加わり、700～800円/尾となる。

2010年におこなった関係者への聞き取り調査の結果、中国国内では稚魚育成業者が16業者あり、これらの稚魚を買い取る日本の主要な種苗流通業者は10社程度、現地中国人種苗流通業者が3社存在する(図4)。日本の種苗流通業者を通して国内にカンパチ種苗が輸入されるが、国内の養殖業者にカンパチ稚魚が輸入されるまで、他の日本の種苗流通業者や現地中国人種苗流通業者が中間に入る場合もある。また、種苗流通業者によっては稚魚の育成履歴を開示できるように育成履歴の異なる稚魚が混在しないように出荷を行う業者と、注文に応じて様々なロットを集め、育成履歴の異なる稚魚が混在した稚魚を出荷する業者があることがわかった。

### 4) 中国国内での稚魚の育成管理に関する情報

採捕された1～2cmサイズの稚魚は、3～5m四方の生簀に設置した1×1×0.6mの生採捕直後のカンパチ稚魚は全長2cm前後で、アミエビで餌付けを行い、その後全長4cmまで初期飼料(日本産E P飼料)で飼育する。全長4cm以上になった種苗は、冷凍生餌(アジ、イカナゴ、カタクチイワシ等)、または近海で漁獲される小魚(鮮魚)を給餌し、出荷サイズ(25cm前後)まで育成される。

中国国内では、類結節症、ビブリオ病等が発生し、その治療に投薬が行われている。使用薬

剤は基本的に原末が使用され、オキシテトラサイクリン（OTC）が常用されているが、アンピシリン（ABPC）、フロルフェニコール（FF）、サルファ剤も使用されている。ノカルジア症対策では、リファンピシリンを投与している生産者も少なくない。近年、スレ予防に使用されているニトロフラン系薬剤の使用が制限されたため、スレ防止には効果の低い薬剤を代用せざるを得ない状況にあり対策に苦慮している。生薬（漢方）等を試している養殖場もあるが、効果のほどはわからない。また、業者によっては、副作用の強い薬剤（サルファ剤）を1カ月間にわたり使用する等、水産用医薬品の適正使用が徹底されていない事例も見受けられる。当歳魚育成地の福建省寧徳海域は、カンパチのみならず他の養殖魚でも、毎年のようにノカルジア症が多発している。この地区から夏越の中間魚を導入する場合は、本症に要注意である。

ワクチンは、日本産のイリドウイルス病ワクチンが、唯一使用されている。日本から正規輸入されたワクチンは価格が高くなるので（60～80円/尾）、半量接種が少なくない。生産者は「それで3か月は大丈夫」と言っているが、危うい。輸入されたカンパチ種苗から、置き出し直後のマダイ種苗に、イリドウイルスが感染したという症例は、後を絶たない。

用薬剤は基本的に原末が使用され、オキシテトラサイクリン（OTC）が常用されているが、アンピシリン（ABPC）、フロルフェニコール（FF）、サルファ剤も使用されている。近年、スレ予防に使用されていたニトロフラン系薬剤の使用が制限されたため、スレ防止には効果の低い薬剤を代用せざるを得ない状況にあり、対策に苦慮している。また、業者によっては、副作用の強い薬剤（サルファ剤）を1カ月間にわたり使用する等、水産用医薬品の適正使用が徹底されていない事例も見受けられる。

稚魚の育成管理は、基本的に中国国内の稚魚育成業者に依存しており、日本の種苗流通業者主導の管理は行われていないケースが多い。日本国内に輸入されるカンパチ稚魚のほとんどは関税非対象の稚魚であるが、通常の飼育を行うと関税対象の稚魚（IQ品）にまですぐに成長するため、稚魚育成現場では選別を頻繁に行い、魚体サイズを調整している。しかしながら、関税非対象の稚魚を高頻度の選別で集めることは、成長の悪い稚魚を集める危険性もはらんでおり、その後の歩留まりにも大きく影響する。したがって、稚魚価格が安価であったとしても、歩留り次第では関税非対象の稚魚からの養殖よりもIQ品からの養殖の方が、経営効率が高い場合も見受けられる



写真 1-1 中国国内におけるカンパチ稚魚生簀  
頻繁に選別を行い、体長別に飼育管理している。  
左：広東省汕尾、右：広東省陽江



写真 1-2 カンパチ稚魚育成場 遠景 (広東省汕尾)

#### 【引用文献】

宮下 盛・熊井英水 (2000) : 適地選定から出荷・販売まで カンパチ、海産魚の養殖 (熊井英水編)、湊文社、pp78-88.

原田輝男 (1969) : カンパチ、養魚講座 4 ハマチ・カンパチ (大島泰雄編)、緑書房、pp189-201.

## 第2章

# 魚病診断概説

カンパチにおける一般的な魚病の診断手順を紹介し、外部症状の観察と内部臓器の観察により、病気を診断する手順を示しました。各観察項目ごとに「診断のポイント」を設け、症状から推定される病気と、さらに診断を進めるために必要な情報を示しました。

# 魚病検査の手順

## 検体の受付・検体の採集

### 確認事項

養殖業者の持ち込み  
 瀕死または死亡直後の鮮度のよい検体を採取  
 計測（体重、体長）

検体情報の収集

## 観察

### ①外観症状の観察

体型、体色の確認  
 体表、鰭、眼の損傷の有無と程度  
 外部寄生虫の有無と寄生頻度・強度

### ②鰓の生標本観察

肉眼およびウエットマウント  
 による顕微鏡観察

貧血や鰓腐れの有無と程度  
 エラムシ等の寄生虫の有無と寄生頻度・強度  
 黒点の有無（ウイルス感染症の可能性）  
 鰓弁中の住血吸虫卵や異物の有無 など

## 解剖

### ③内臓諸器官の観察

肝臓・脾臓重量の測定

各臓器の結節等の病変の観察  
 寄生虫の寄生の確認

※上記の検査で病原体が見つからない場合、各情報を精査、再確認する。

## 病原体の検査

### ④染色標本による細菌検査

鰓、体表、腎臓等の染色塗抹標本作製  
 メチレンブルー、抗酸菌染色等

顕微鏡観察による病原菌の確認

### ⑤細菌分離

臓器片を細菌培養用寒天培地に塗抹  
 18～24時間培養

病原菌の分離と同定

薬剤感受性の判定（細菌）

API 20E キットなどによる同定

### ⑥各種病原体の検査

PCR 法や細胞によるウイルス分離など  
 目的に応じた検査

## 終了

最終診断結果を診断カルテに記録（カルテの保存）

## 対策検討

第2章・4章を参照

第3章を参照

# I. 魚病診断

カンパチにおける一般的な魚病の診断手順を紹介し、外部観察と解剖による内部臓器の観察項目により推定される病気と、診断する手順を示す。

## 1. 検体のサンプリング

魚病診断に用いる検体は以下の点に注意してサンプリングを行う。また、検体を持ち込む養殖業者にもサンプリングの方法を周知する。

### サンプリング時の注意事項

- 鮮度の良い魚を検体として受け取る。  
浮いている死魚は腐敗してガスが溜まっているため、可能であれば潜水して、底に沈んでいる魚を検査用にする。特に夏期は水温が高く腐敗が速く進むので注意が必要である。
- 瀕死の魚を中心にサンプリングする。  
死亡魚よりも病態を正確に把握できるので、緩慢遊泳、遊泳停止、異常遊泳などの魚を中心にサンプリングする。
- 健常魚のサンプルも入手する。  
比較対照として可能であれば健常魚も入手する。
- サンプルは氷冷で送付する。  
氷水と魚体が直に接しないように検体をビニール袋に入れて密封し、氷冷する。やむをえず冷凍された魚でも検査は可能ではあるが、体表の寄生虫の確認が不完全になる場合がある。

## 2. 聞き取り

養殖業者からの持ち込み検査の際は、受付時に魚種、魚齢、漁場、連絡先を確認し、以下の項目について問診・聞き取りを行い、問診票に記録する。

### 聞き取り時の確認事項

- 病気の発生状況と時期（いつ頃から症状やへい死が見られたか）
- 異状行動の有無
- へい死状況（尾数：日間、累積）
- 飼育状況（餌の種類：生餌（魚種）、MP、栄養剤の添加等、管理状況：水温、生け簀の大きさ、放養尾数等）

- 種苗の由来（自家、県外、海外等）。中継地等の情報もできるだけ入手する。
- 現在の病気に対する処置（投薬の場合薬剤名、投与量、投与日数等）とその効果
- 魚だけでなく養殖漁場環境も含めた異常の有無
- 消毒時の異常魚の有無

表 2-1 診断のポイント～遊泳状態～

症 状	推定される病気	対 応
遊泳異常がみられる。 (旋回・狂奔遊泳)	脳微孢子虫症 ビブリオ病 $\alpha$ 溶血性連鎖球菌症など	病理組織学的観察が必要。脳の解剖と固定標本作製して、専門機関に診断を依頼する。
緩慢な遊泳をしている。	様々な病気が疑われる	瀕死魚を採取して魚病検査を行う。
網に体を擦りつける。	ハダムシなどの外部寄生虫の寄生	体表の寄生虫の有無を確認し、採取して種を同定する。



異常な遊泳の一例

脳微孢子虫症のカンパチ。らせん状に旋回遊泳する。

# 魚病検査問診票

依頼者情報		持ち込み(本人・依頼・現地)・配達	
検査依頼年月日		会社名	
養殖場名		担当者名	
魚種		連絡先(TEL)	
魚齢		連絡先(FAX)	

へい死状況			
発生時期	___月___日 頃から・以前から 継続・不明		
日間へい死尾数	1生簀当たり1日 _____尾へい死	へい死発 生生簀数	
累積へい死尾数	これまでに約 _____尾へい死		
へい死状況			

飼・餌料			
餌の種類	DP( _____ )	MP( _____ )	生餌( _____ )
餌食い状態	良好・普通・不良	配合飼料・栄養剤 ( _____ )	
給餌量	_____ kg/台	給餌方法	手投・投餌機・船上MP・置き餌

種苗入手先					
種苗由来	自家種苗・県外種苗( _____ 県)・人工種苗( _____ 産), 国外種苗( _____ 産)				
入手時期	___月___日	大きさ	_____ cm、 _____ g	導入数	_____ 尾

管理状況			
生簀の大きさ	縦×横×深さ( _____ × _____ × _____ m), 円形( _____ m)		
生簀材質	モジ網・金網・その他( _____ )	放養尾数	_____ 尾/台
平均体重・体長	_____ g	_____ cm	水温 _____ °C

病気の発生から現在までの処置			
投薬時期(歴)		使用医薬品名	
投薬量		その他	

その他	
-----	--

問診票の例

### 3. 病魚の検査

#### (1) 必要器具等

メジャー・秤

解剖器具（ハサミ、メス・カミソリ等、ピンセット、柄付き針）

シャーレ

スライドグラス・カバーグラス

アルコール綿

顕微鏡（光学および実体顕微鏡）

海水・生理食塩水

#### (2) 外部症状の観察

検査に着手する前に、必要に応じて麻酔や脱血の処置を行う。供試魚の体長、体重を計測する。検体の鮮度も確認すること（検体の鮮度が悪い場合は検鏡時に雑菌が混在してみられるため誤診する可能性もある）。

##### ○外部症状の観察項目○

- ・ 外観（腹部膨満、痩せ、変形、死亡時の状態）
- ・ 体色（黒変、黄変、褪色、青白化）
- ・ 体表の状態（凹凸、発赤、出血、潰瘍・スレ・糜爛、肛門の状態）
- ・ 眼球の状態（白濁、欠損、突出、出血等）
- ・ 鰭の状態（欠損、基部の発赤、潰瘍、黒点・白点の有無）
- ・ 体表面の外部寄生虫の有無
- ・ 鰓葉や鰓蓋の状態（結節、貧血、鰓腐れ、鰓蓋部の出血、膿瘍等）

外部症状の観察により得られた情報から、大まかな病気の推定が可能である（表 2-2）。

表 2-2 カンパチの病気と特徴的な外部症状

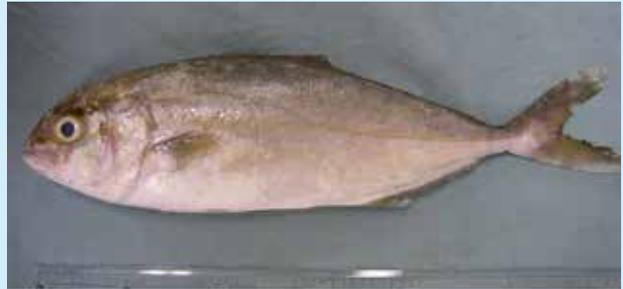
病気	主な外部症状		
	体表・鰭	眼球・眼窩	鰓
連鎖球菌症	尾柄部の潰瘍、発赤(尾鰭等)	白濁、出血、突出	
ノカルジア症	結節、潰瘍		結節
べこ病	体表の凹凸		
類結節症	脱鱗		貧血
ビブリオ病	スレ、背鰭基部出血、 肛門の発赤	白濁、出血、突出	
滑走細菌症	スレ、口辺部の発赤、鰭の欠損		腐れ、変色
住血吸虫症	開口		
ハダムシ症、皮膚カリグス症	スレ、寄生虫の寄生	寄生虫の寄生	
エラムシ症			エラムシの寄生、 貧血
白点病	体表や鰭に白点		鰓弁に白点
リンホシスチス病	鰭に小黑点		

表 2-3 診断のポイント～外観～

症 状	推定される病気	対 応
腹部膨満	抗酸菌症 など	様々な原因が疑われるため、他の症状も観察する。
痩せている	ビブリオ病 べこ病 など	様々な原因が疑われるため、他の症状も観察する。
体幹部の変形	α溶血性連鎖球菌症	脳の解剖を行い、細菌塊の形成の有無を確認する。 尾柄部の潰瘍の有無など、他の症状も併せて観察する。
	奇形	種苗の由来を確認する。
口や鰓蓋を開いた状態での死亡	赤潮や貧酸素水塊による酸欠	養殖環境に問題はないか、状況の聞き取り情報を確認する。
	類結節症	解剖して内部症状を観察し、腎臓、脾臓に白色の結節を確認する。
	住血吸虫症 エピテリオシスチス病	鰓弁のウェットマウント標本を作製して、検鏡する。 血管内に虫卵が多数みられる。→住血吸虫症 鰓弁の肥大や、半透明なシストがみられる。 →エピテリオシスチス病
体色の変化 (黒変、黄変、褪色、青白化)	マダイイリドウイルス病 ビブリオ病 α溶血性連鎖球菌症 類結節症 抗酸菌症 滑走細菌症 ノカルジア症 など	様々な原因が疑われるため、他の症状も観察する。
体幹部の一部が隆起	腎腫大症 イクチオホヌス症	解剖して腎臓の腫大を確認し、腎臓のスタンプ標本を作製し、検鏡する。 類円形異物がみられる。→腎腫大症 多核球状体がみられる。→イクチオホヌス症



口と鰓蓋を開いた死亡魚（住血吸虫症）



体色の褪色と脱鱗（類結節症）



体幹部の一部が隆起（腎腫大症）

表 2-4 診断のポイント～体表面の状態～

症 状	推定される病気	対 応
体表面が凹凸	ノカルジア症（躯幹結節型）	体表の膨隆部を切開し、膿汁が出てくることを観察する。解剖して腎臓・脾臓などに白色の結節の形成を確認する。
	べこ病	筋肉内に白色のシストを確認する。
	ヒルディネラ症	解剖して腹腔内を観察する。腹腔内が黒色の粘液で覆われているか、筋肉内に黒色の異物の有無を観察する。
スレ・糜爛・発赤	滑走細菌症 ビブリオ病 ビブリオ・ハーベイ感染症	患部からスタンプ標本を作製し、染色して検鏡する。
	ハダムシ症 皮膚カリグス症 ヒドラの着生	体表面に寄生虫や異物の付着の有無を確認する。
	オヨギイソギンチャクの刺症	生け簀にオヨギイソギンチャクが付着しているか確認する。
鰓蓋の糜爛	ノカルジア症	他の症状（体幹部の結節や腎臓・脾臓の結節の形成）も観察する。
体表面に白点	白点病	体表面を掻きとってウェットマウント標本を作製し、検鏡して白点虫を確認する。鰓についても同様に検査をする。
脱鱗	類結節症 など	様々な原因が疑われる。他にも症状がないか観察する。



体表面が凹凸（ノカルジア症）



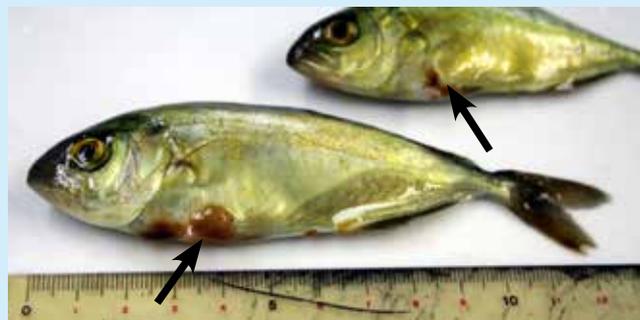
体表面の白点（白点病）



体表面が凹凸。写真はブリの例（べこ病）



鰓蓋に糜爛（ノカルジア症）



体表に異物の付着（ヒドラの着生）

表 2-5 診断のポイント～鰭・尾柄部～

症 状	推定される病気	対 応
鰭の欠損	滑走細菌症・ ビブリオ・ハーベイ感染症 ハダムシ症	患部のスタンプ標本を作製し、染色して検鏡し、菌を確認する。 体表のハダムシ寄生の有無と程度を観察する。
鰭基部の発赤	$\alpha$ 溶血性連鎖球菌症 新型連鎖球菌症	他の症状（尾柄部の潰瘍など）を観察する。
鰭に白点	白点病	鰭の表面を掻きとってウェットマウント標本を作製し、検鏡して白点虫を確認する。体表や鰓も同様に観察する。
尾柄部に潰瘍	$\alpha$ 溶血性連鎖球菌症 新型連鎖球菌症	患部からスタンプ標本を作製し、検鏡して連鎖球菌の存在を確認する。 同定のため細菌分離を行う。



鰭の欠損（ハダムシの寄生による）



尾柄部の潰瘍（新型連鎖球菌症）

表 2-6 診断のポイント～眼球・眼窩～

症 状	推定される病気	対 応
欠損・突出・白濁・出血	ビブリオ病 ビブリオ・ハーベイ感染症 $\alpha$ 溶血性連鎖球菌症 新型連鎖球菌症 ハダムシ症 など	様々な病気が疑われるため、他の症状も観察して、診断する。



眼球の突出と出血（ビブリオ病）



眼球の白濁（ $\alpha$  溶血性連鎖球菌症）



眼球の欠損（ $\alpha$  溶血性連鎖球菌症）



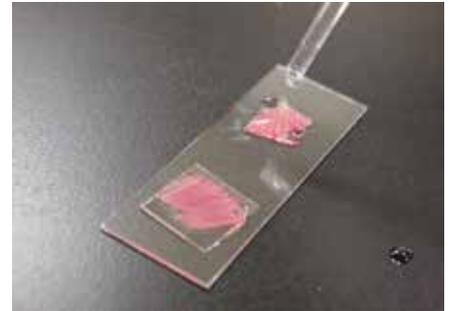
ハダムシの寄生（ハダムシ症）

### (3) 鰓の観察（肉眼および顕微鏡観察）

鰓蓋の内側の出血の有無、鰓の色（貧血やうっ血）、鰓腐れ、結節の有無等を観察後、鰓葉を切り出す。

魚体から切り出した鰓葉には粘液や血液が多量に付着しており、そのままでは観察に支障がある。切り出した後に、海水中で軽くすすいで、血液を洗い落とす。

鰓の顕微鏡観察は、エラムシ等の大型の寄生虫であれば海水を張ったシャーレに鰓を入れて実体顕微鏡で観察することが可能である。細菌や原虫類、血管内の住血吸虫卵や鰓弁中の黒点は、「ウエットマウント標本」を作製して、光学顕微鏡で観察する。



ウエットマウント標本

#### ○鰓の顕微鏡観察のポイント○

- ・鰓腐れ箇所を観察する。

鰓の組織が壊死している箇所があれば、切り出して検鏡し、滑走細菌症の原因菌である長桿菌の有無を観察する。

- ・寄生虫の有無を観察する。

原虫類（トリコジナや白点虫）や、単生虫（エラムシ）等の寄生や、一次鰓弁の血管内に蓄積している住血吸虫卵の有無を観察し、寄生の程度を把握する。

エラムシは鰓弁から吸血し、寄生数が多い場合は貧血を引き起こすことから、他に病原体が確認されず、内臓が極度に貧血している場合は死亡の原因と推定される。

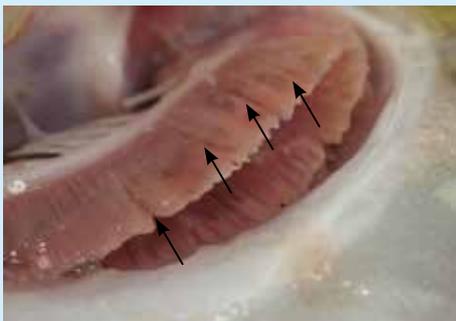
住血吸虫の卵は、鰓の血管に詰まり、血流を阻害して酸欠症状を引き起こすので、死亡魚の状態（口を開けて死亡している等）も記録する。

- ・鰓弁の黒点の有無を観察する。

鰓弁に黒点が観察される場合は、マダイイリドウイルス病や、抗酸菌症が疑われる。マダイイリドウイルス病では脾臓のスタンプ標本にギムザ染色を施して光学顕微鏡で観察し、異型肥大細胞を確認して推定診断とするか、モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法やPCR法で陽性を確認した上で確定診断とする。抗酸菌症は外観および内部症状や細菌学的検査の結果を併せて診断する。

表 2-7 診断のポイント～鰓（肉眼観察および顕微鏡観察）

症 状	推定される病気	対 応
貧血	マダイイリドウイルス病	鰓の顕微鏡観察で黒点を確認する。 解剖して脾臓のスタンプ標本を作製し、ギムザ染色もしくは、蛍光抗体法により異型肥大細胞を確認する。
	ビブリオ病 類結節症	細菌検査を行う。
	エラムシ症	大型単生虫の寄生を確認し、寄生状況を観察する。
	腎腫大症	解剖して腎臓の腫大を確認する。
鰓腐れ	滑走細菌症 ビブリオ病	患部鰓弁のウェットマウント標本を作製し、検鏡する。 患部のスタンプ標本を作製し、染色して検鏡する。 他の症状も観察する。
結節	ノカルジア症（鰓結節型）	結節部位のスタンプ標本を作製し、抗酸菌染色を施してして放線菌を観察する。
白点	白点病	鰓のウェットマウント標本を作製し、白点虫の寄生を確認する。体表や鰭も観察する。
鰓蓋内側が出血	$\alpha$ 溶血性連鎖球菌症	他の症状（眼球の異状、尾柄部の潰瘍の有無）も観察する。
寄生虫が寄生	エラムシ症 ウズムシ症 鰓カリグス症	鰓弁のウェットマウント標本を作製し、検鏡する。 また、寄生虫を採取して観察する。
鰓弁に小黑点 （顕微鏡観察）	マダイイリドウイルス病 抗酸菌症	解剖を行い、内臓を観察する。 腎臓や脾臓に抗酸菌症に特徴的な結節の形成がある。 →抗酸菌症 脾臓のスタンプ標本を作製し、蛍光顕微鏡で観察して異型肥大細胞がみられる。→マダイイリドウイルス病
血管内に住血吸虫虫卵 が蓄積している（顕微 鏡観察）	住血吸虫症	住血吸虫の卵を確認する。
鰓弁中に楕円形で透明 なシストがみられる （顕微鏡観察）	エピテリオシスチス症	さらに診断を進めるには研究機関へ相談する。



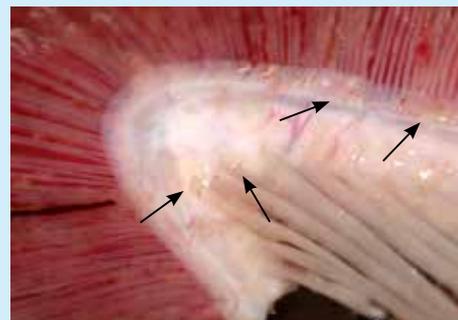
鰓の貧血（エラムシ症）



鰓腐れ（滑走細菌症）



鰓の結節（ノカルジア症）



寄生虫の寄生（鰓カリグス症）



鰓の黒点 (抗酸菌症)



一次鰓弁中に透明なシスト  
(エピテリオシスチス病)



一次鰓弁中の吸虫卵の蓄積 (住血吸虫症)



鰓弁上皮下の白点虫の寄生 (白点病)

## (4) 内臓諸器官の観察

供試魚を解剖して、腹腔内および内臓諸器官（特に腹腔内と主に血液の多く集まる臓器：心臓、腎臓、肝臓、脾臓）を中心に病変の有無を観察する。

また、魚体を2枚におろすことで、べこ病、筋肉の出血（薬害など）、骨腫（ノカルジア症や連鎖球菌症）、骨折（衝突、成長不良）等が観察されることもある。

連鎖球菌症に感染した魚では内臓の病変以外に、脳の解剖や尾柄部を切開することで、症状の確認と採材ができることもある。

アニサキス症の検査では筋肉部分を薄く3枚におろして観察するなど、解剖の手法は検査の目的に応じて臨機応変に行うことが必要である。

### ○解剖のポイント○

- ① 臓器がよく見えるように開腹する。
- ② 切開時に内臓を傷つけない。特に腸管に注意する。腸内細菌が漏れ出し、臓器内に形成された病巣中の細菌の観察がしにくくなる。
- ③ 外部観察から推定される病気に特徴的な症状がみられる部位も解剖する。



肛門の前部にハサミで浅く切り込みを入れる。  
肛門と直腸部分を傷つけないように注意する。



肛門部の切り込みから背骨に沿って切開し、腹腔部  
を露出させる。

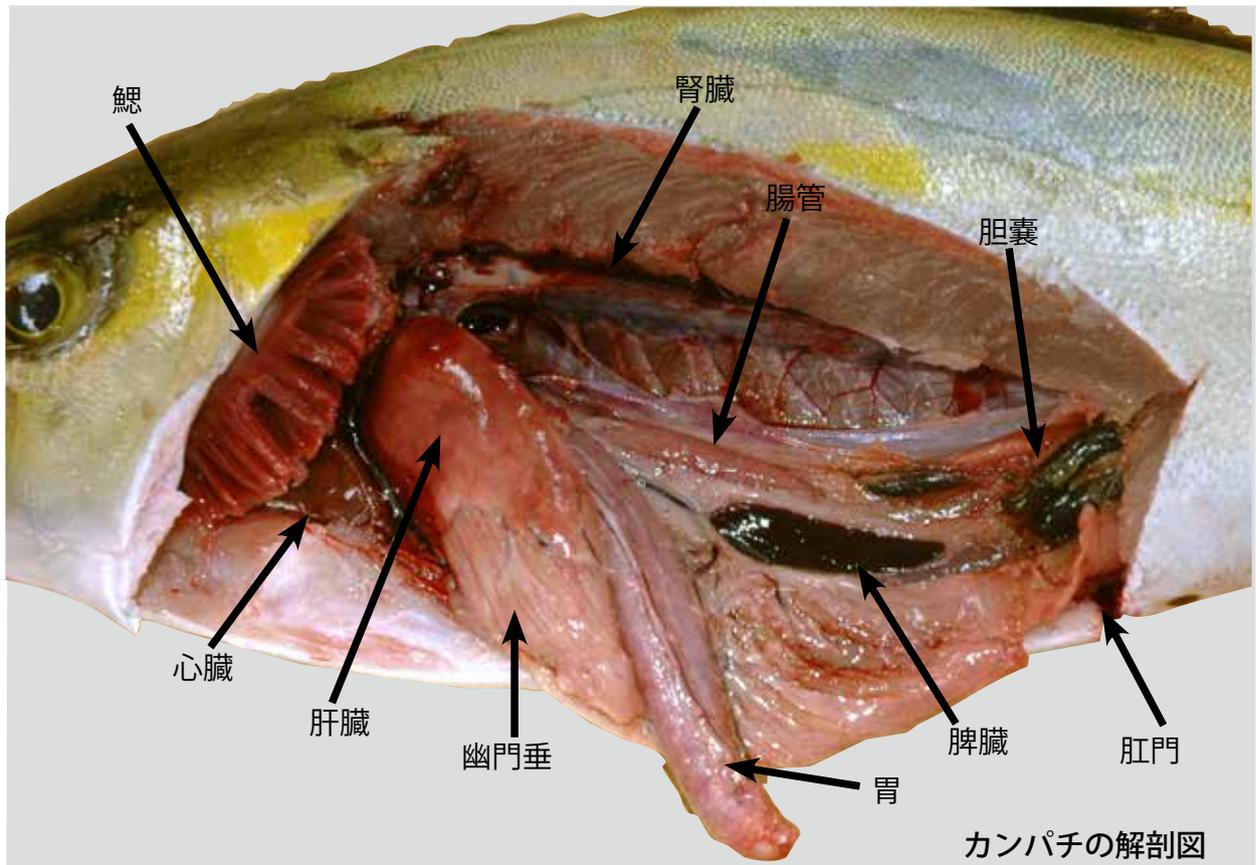


切り込みから体の前方に向けて開腹する。  
腸管を傷つけないよう注意する。



開腹した状態  
腹腔内と臓器を観察し、目的に応じて摘出して検  
査に供する。

### 一般的な解剖の手順



眼球の上をかすめるように、魚体に水平に包丁を入れる。



脳が露出するので、摘出する。

### 脳の解剖手順

表 2-8 主なカンパチの病気と内臓にみられる症状

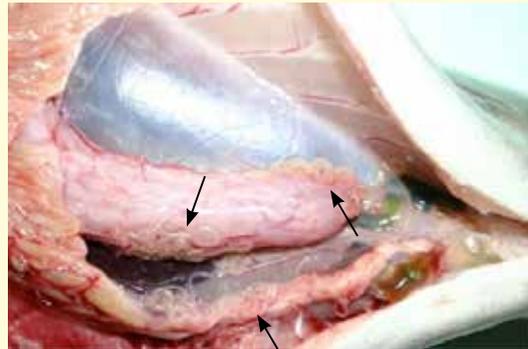
病 気	主な内臓の症状				
	心臓	脾臓	腎臓	肝臓	その他
連鎖球菌症、ビブリオ病	心外膜炎	肥大	肥大		
類結節症、ノカルジア症、抗酸菌症		結節、肥大	結節		
マダイイリドウイルス病		肥大、貧血		貧血	
心臓クドア症	シストの形成				
腎腫大症、イクチオホヌス症			腫大		
酸欠等の突発的な死亡					胃内残餌

表 2-9 診断のポイント～腹腔内～

症 状	推定される病気	対 応
腹水の貯留	抗酸菌症 ピブリオ・ハーベイ感染症	他の症状（腎臓、脾臓の結節など）も観察する。
腹膜の癒着	ノカルジア症	他の症状（腎臓、脾臓の結節など）も観察する。
腹腔内に異物	ヒルディネラ症 アニサキス症	摘出して寄生虫種を同定する。



腹水の貯留（抗酸菌症）



腹腔内に寄生虫（アニサキス症）

表 2-10 診断のポイント～腎臓～

症 状	推定される病気	対 応
褪色	マダイイリドウイルス病	この症状だけでは推定できないので、他の症状も観察する。
貧血	類結節症	この症状だけでは推定できないので、他の症状も観察する。
肥大・腫大	類結節症 $\alpha$ 溶血性連鎖球菌症 抗酸菌症 ノカルジア症 イクチオホヌス症 腎腫大症	結節がみられる。（類結節症、ノカルジア症、抗酸菌症） 結節患部からスタンプ標本を作製し、顕微鏡で観察する。 結節は見られない。（その他の病気） 腎臓のスタンプ標本を作製し、顕微鏡で観察する。 多核球状体が見られる。→イクチオホヌス症 類円形微生物が見られる。→腎腫大症
出血点	$\alpha$ 溶血性連鎖球菌症	この症状だけでは推定できないので、他の症状も観察する。
結節の形成	類結節症 ノカルジア症 抗酸菌症	患部のスタンプ標本を作製し、顕微鏡で観察して菌を確定する。



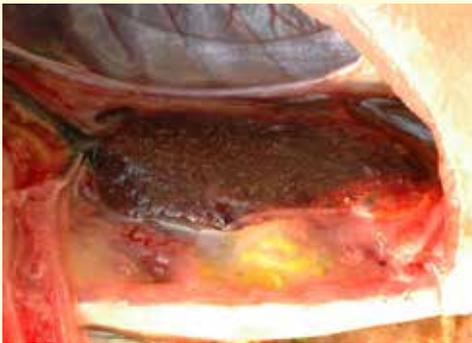
腎臓に結節が形成（類結節症）



腎臓の腫大（イクチオホヌス症）

表 2-11 診断のポイント～脾臓～

症 状	推定される病気	対 応
褪色	マダイイリドウイルス病	スタンプ標本を作製し、ギムザ染色を施すか、モノクローナル抗体による蛍光抗体法で異型肥大細胞を確認する。
貧血	類結節症	この症状だけでは推定できないので、他の症状も観
肥大・腫大	マダイイリドウイルス病 ビブリオ病 類結節症 $\alpha$ 溶血性連鎖球菌症 抗酸菌症 ノカルジア症 腎腫大症	結節がみられる。(類結節症、ノカルジア症、抗酸菌症) 結節患部からスタンプ標本を作製し、顕微鏡で観察する。 結節はみられない。(その他の病気) 脾臓のスタンプ標本を作製し、顕微鏡で観察する。 異型肥大細胞がみられる。→マダイ・イリドウイルス病 腎臓も肥大している。腎臓のスタンプ標本を作製し、顕微鏡で観察する。→腎腫大症
出血点	$\alpha$ 溶血性連鎖球菌症	この症状だけでは推定できないので、他の症状も観察する。
結節の形成	類結節症 ノカルジア症 抗酸菌症	結節患部からスタンプ標本を作製し、顕微鏡で観察して菌を同定する。



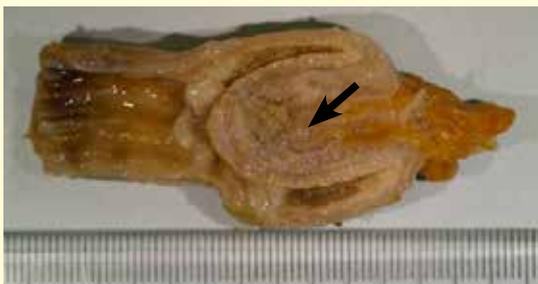
脾臓の結節の形成 (ノカルジア症)



脾臓の腫大と結節の形成 (抗酸菌症)

表 2-12 診断のポイント～胃～

症 状	推定される病気	対 応
胃の盲嚢部が反転	アニサキス症	腹腔内に虫体の有無を観察する。
胃に残餌	突発的な死亡	環境や養殖作業を確認する。



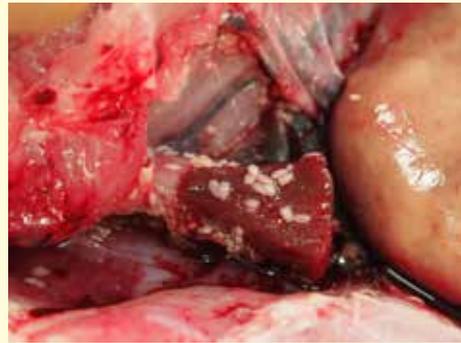
反転した胃の切断面像。内側に陥入 (アニサキス症)

表 2-13 診断のポイント～心臓・囲心腔～

症 状	推定される病気	対 応
心外膜炎	$\alpha$ 溶血性連鎖球菌症	他の症状（尾柄部の症状・鰓蓋裏の出血など）
囲心腔内にシスト	囲心腔クドア症	シストを顕微鏡で観察し、クドアであることを確認する。



心外膜炎（ $\alpha$  溶血性連鎖球菌症）



囲心腔内に粘液胞子虫のシスト（心臓クドア症）

表 2-14 診断のポイント～肝臓～

症 状	推定される病気	対 応
褪色	マダイイリドウイルス病	この症状だけでは推定できないので、他の症状も観察する。
出血点	$\alpha$ 溶血性連鎖球菌症	この症状だけでは推定できないので、他の症状も観察する。

表 2-15 診断のポイント～筋肉内の症状～

症 状	推定される病気	対 応
筋肉内にシスト	べこ病 奄美クドア症	シストを顕微鏡で観察し、寄生虫の種類を確認する。
筋肉内に大型の異物	ヒルディネラ症 筋肉条虫症	異物を取り出し、寄生虫であれば種類を確認する。
筋肉内に黒色の異物	ヒルディネラ症	腹腔内や筋肉内に寄生虫がいないか確認する。



筋肉内にシスト（奄美クドア症）



筋肉内に寄生虫の寄生（筋肉条虫症）



筋肉内に黒色の異物（ヒルディネラ症）

外部と内部観察の検査を行ったにもかかわらず原因が推定できないこともあるが、そのような場合は、脾臓と肝臓の重量を計測し、魚体重における脾臓と肝臓の重量の割合を確認しておく事が望ましい。病原体が確認されず、かつ脾臓が肥大していない場合は、感染症の可能性は低いと考えられ、脾臓が肥大している場合は何らかの感染症が疑われる場合がある。一方、感染症の可能性が低く、肝臓が著しく萎縮している場合は、何らかの原因による栄養不足が疑われる。そのほか、養殖環境(水質:溶存酸素、塩分、水温等)や餌料、投薬状況等について再度聞き取りを行い、知り得た情報を記録に残し、今後の検査の参考とすることが重要である。



## 第3章

# 魚病診断各論

本章では、カンパチに発生する病気の病原体の分離手法や、確定診断法に必要な技術・手法について記載しました。なお、都道府県の水産試験場で日常的に行われている魚病診断の範疇外で、必ずしも必須とされない技術（寄生虫種の同定など）については、専門機関へ検査を依頼する際に必要なケースもあるため、サンプル処理方法などを紹介しました。

# I. 検鏡による検査法

## 1. ウェットマウント標本による観察

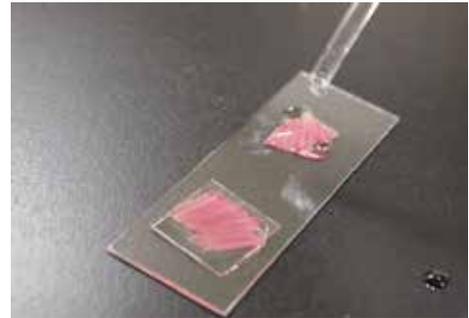
観察対象をスライドガラスとカバーガラスで挟んで、光学顕微鏡で観察する。簡便にできるので、検査の途中で確認のために行う。

### 1) 目的：

鰓弁の観察（血管中の住血吸虫卵や、黒点の有無の確認。寄生虫の確認など）

体表の観察（体表粘液中の寄生虫の確認など）

粘液胞子虫や微胞子虫のシストの観察 など



鰓のウェットマウント標本

### 2) 材料：

#### a. 海水または生理的食塩水：

鰓弁や体表粘液の観察には海水、粘液胞子虫や微胞子虫のシストの観察には生理食塩水を使用する。

#### b. カバーガラス：観察対象によって大きさを選ぶ。

#### c. スライドガラス

### 3) 方法：

① スライドガラスに生理的食塩水を一滴たらして、観察対象物を載せる。

② カバーガラスをかけて光学顕微鏡（40～100倍程度）で観察する。

（粘液胞子虫や微胞子虫のシストはつぶして、中の胞子を観察する）。

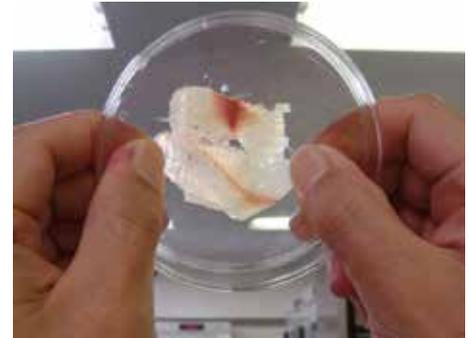
## 2. キャンドリングによる観察

キャンドリングは、透明な2枚の板で組織を挟み、透過光により組織中の異物を確認する検査方法である。

### 1) 目的：筋肉可食部中の粘液胞子虫や微胞子虫のシストの確認

腎臓中のイクチオホヌスの多核球状体の確認

筋肉可食部中のアニサキスの有無の確認など



シャーレを使ったキャンドリングの例

### 2) 材料：透明なアクリル板やスライドガラスを2枚。または、ガラスシャーレ（蓋と皿のセット）。

### 3) 方法：筋肉可食部の検査の例

- ① 供試魚を三枚におろし、刺身を切る要領で筋肉を薄くスライスする。
- ② 厚手の透明アクリル板で薄くスライスした筋肉を挟み、扁平に押しつぶした状態で太陽光や電灯にすかして肉眼で観察するか、実体顕微鏡で観察して異物や寄生虫の有無を確認する。少量の組織片であれば、スライドグラスやガラスシャーレで圧平して観察する。

## 3. 患部のスタンプ染色標本による検査

病魚の病巣中の細菌や寄生虫を確認するため、体表患部、鰓、内臓諸器官等のスタンプあるいは塗抹染色標本を作製して観察する。目的とする病原体により適切な染色液を選択する。

### 1) 目的：

病魚の病巣中にいる細菌の確認

筋肉中や臓器中の微孢子虫や粘液胞子虫といった寄生虫の確認

マダイイリドウイルス病の異型肥大細胞の確認 など

### 2) 材料：

- a. 解剖器具（ハサミ、ピンセット）
- b. スライドグラス
- c. 染色液（表4参照）
- d. ガスバーナー（火炎固定のため）

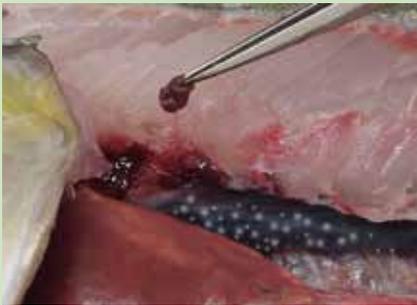


### 3) 方法：

- ① 病魚から脾臓・腎臓等の組織を少量取り、余分な血液をティッシュなどで吸い取った後、スライドグラス上に薄くスタンプ（塗抹）する。厚く塗抹すると観察が困難になるので、薄い方が望ましい。
- ② 風乾かドライヤーの冷風で乾燥させた後、ガスバーナーの炎の中を一瞬通して火炎固定をする。適切な染色液により染色を施し、ティッシュなどで水分を拭き取って自然乾燥させるか、ドライヤーの温風で乾燥させて標本を作製する。作製した標本は光学顕微鏡で観察する。

## 各種スタンプ標本の染色法

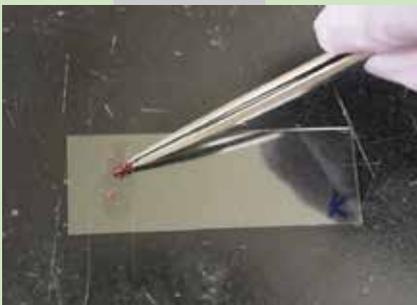
検査する病原体	染色法（染色液）	固定方法	染色方法
レンサ球菌 類結節症原因菌 ビブリオ菌など	メチレンブルー単染色 (メチレンブルー染色液)	火炎	染色（1分）→水洗
ノカルジア症原因菌 ミコプラズマ症原因菌	抗酸菌染色 (抗酸菌染色キット：A液とB液からなる)	火炎	A液で染色(5分)→水洗→B液で染色(2分半)
寄生虫 (微胞子虫・粘液胞子虫 などの孢子)	ディフ・クイック染色 (ディフ・クイック染色キット：固定液、A液、B液からなる)	風乾後メタノールで固定	固定液(30秒)→A液(30秒)→B液(30秒)
マダイイリドウイルス病 (脾臓のスタンプ)	ギムザ染色 (ギムザ染色液)	風乾後メタノールで固定	染色（3分）→水洗



病巣から組織を一部を摘出する。



メチレンブルー染色液で1分間染色する。



スライドグラスに組織片をスタンプする。



流水で染色液を洗い流す。



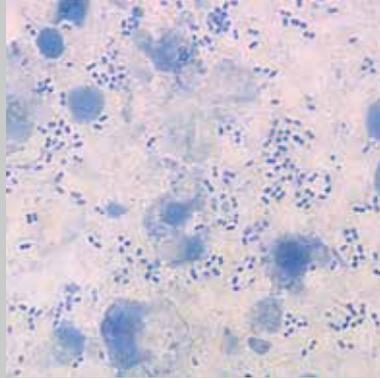
スライドグラスを炎の中に一瞬間くぐらせて火炎固定する。



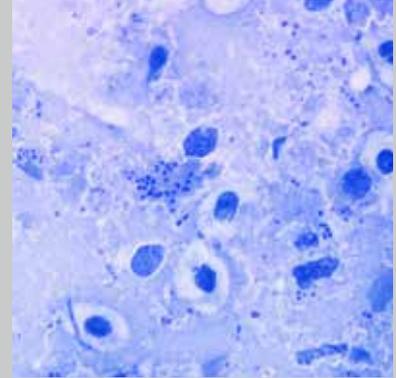
風乾させて完成。光学顕微鏡で観察する。

細菌観察のためのメチレンブルー染色によるスタンプ標本作製の手順

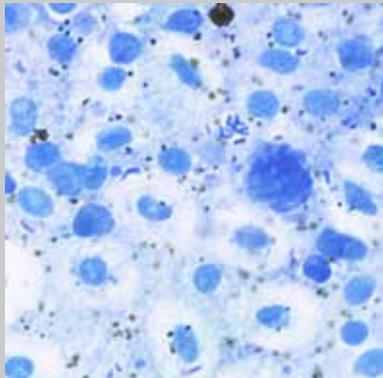
## メチレンブルー 単染色



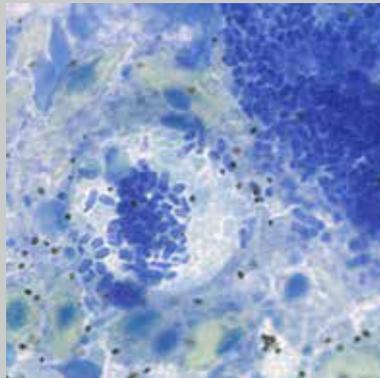
$\alpha$  溶血性連鎖球菌症原因菌  
*Lactococcus garvieae*



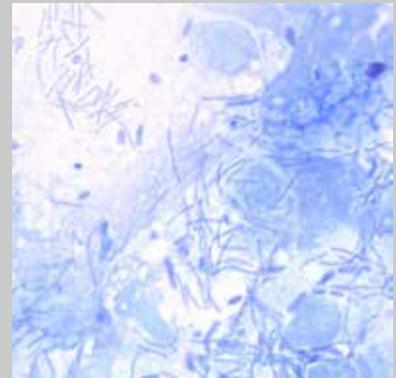
新型連鎖球菌症原因菌  
*Streptococcus dysgalactiae*



ビブリオ病原菌  
*Vibrio* sp.

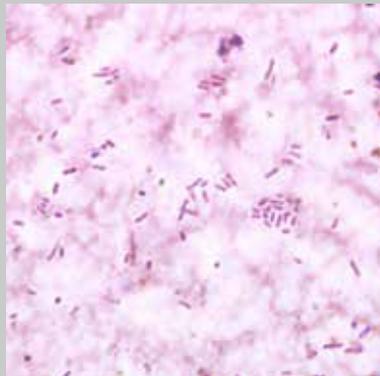


類結節症原因菌  
*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

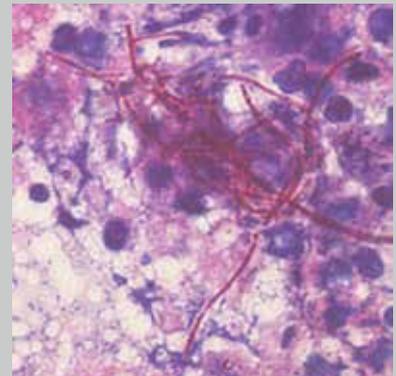


滑走細菌症原因菌  
*Tenacibaculum maritimum*

## 抗酸菌染色



抗酸菌症原因菌  
*Mycobacterium* sp.



ノカルジア症原因菌  
*Nocardia seriolae*

各種病原細菌の染色像

## 4. 蛍光抗体法によるマダイイリドウイルス病の診断

マダイイリドウイルス病の診断は、脾臓スタンプ標本にギムザ染色を施して異型肥大細胞を観察する推定診断法（前述）のほか、モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法によりウイルス感染細胞を検出する確定診断法が用いられる。

### (1) 材料：

- a. 解剖器具（滅菌済み） 1セット
- b. メスの刃
- c. スライドグラス（蛍光観察用の無蛍光のもの）
- d. カバーグラス
- e. 染色バット
- f. 染色瓶（固定用、洗浄用に複数個用意する）
- g. 湿潤箱
- h. 37℃恒温槽
- i. 落射蛍光顕微鏡
- j. アセトン 100mL（冷蔵庫で保存）
- k. PBS 1,000mL
- l. 抗マダイイリドウイルスモノクローナル抗体（MAb）  
M10\*
- m. 市販の抗マウス FITC 標識抗体（ウサギまたはヤギの抗体）
- n. 陰性対照脾臓スタンプ標本と 陽性対照脾臓スタンプ標本\*\*



\* 都道府県試験研究機関に対して増養殖研究所が配布している。

\*\* 観察に先立ち、陰性対照としてマダイイリドウイルス非感染魚、陽性対照として感染魚の脾臓のスタンプ標本を用意しておくことが望ましい。

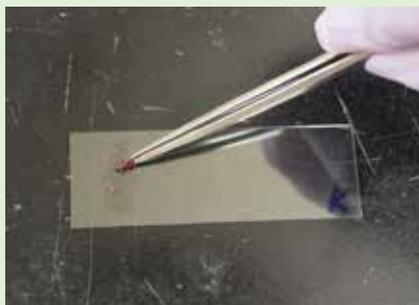
### (2) 方法：

- ① 供試魚は十分に放血させる。
- ② 解剖して脾臓を取り出し、メスの刃等の鋭利な刃物で切断する。なお、臓器のサイズが大きい場合は、スライドグラスのサイズに合わせて細切する。
- ③ 清浄なスライドグラス上に脾臓の切断面をスタンプする。
- ④ 残った脾臓は、ウイルス分離が必要になった場合に備えて、4℃で保存する。
- ⑤ スタンプしたスライドを20分間風乾させる。
- ⑥ スライドグラスを冷アセトン（冷凍庫で冷やしたアセトン）に10分間浸して固定する。固定後風乾させる。
- ⑦ PBSで10倍に希釈した抗マダイイリドウイルスモノクローナル抗体（MAb）M10を、スタンプした部分を覆うように十分に載せて、乾燥を防ぐために湿潤箱に入れて37℃で30分間反応させる。陰性および陽性対照の脾臓スタンプ標本も同時に行う。

- ⑧ スライドガラスを PBS の入った容器に浸して軽く洗浄し、容器 (PBS) を換えて 3 回洗浄を繰り返す。
- ⑨ 10 ～ 40 倍に希釈した十分量の抗マウス FITC 標識抗体をスライドガラスに載せ、再び湿潤箱に入れて 37° C で 30 分間反応させる。
- ⑩ スライドガラスを PBS の入った容器に浸して洗浄し、容器を換えて 3 回洗浄を繰り返す。
- ⑪ PBS で 10 倍希釈したグリセリンを少量スライドガラスに載せて、カバーガラスをかける。
- ⑫ 蛍光顕微鏡を使用して、間接の UV 光で検鏡する。陰性および陽性対照のスライド標本と比較して、強い蛍光を発する巨大細胞が確認されれば陽性と判定する。

備考：

- ・スタンプ法での結果が陽性的場合、検査魚はマダイイリドウイルス (RSIV) 感染魚と診断する。
- ・陰性的場合は、より検出感度の高い方法 (PCR 法や、4°C で保存していた臓器を用いて培養細胞によるウイルス分離) を行う。



病魚の脾臓をスタンプする。



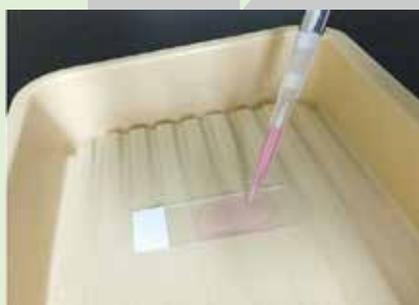
湿潤箱にいれて、37°C で 30 分間インキュベートして反応させる。



冷アセトンで固定する。



PBS で 3 回洗浄する。



10 倍に希釈した抗マダイイリドウイルスモノクローナル抗体を載せる。



風乾させた後、グリセリンで封入して完成。蛍光顕微鏡で観察する。矢印が感染細胞。

### 蛍光抗体法によるマダイイリドウイルス病の診断手順

## II. 微生物の検査方法

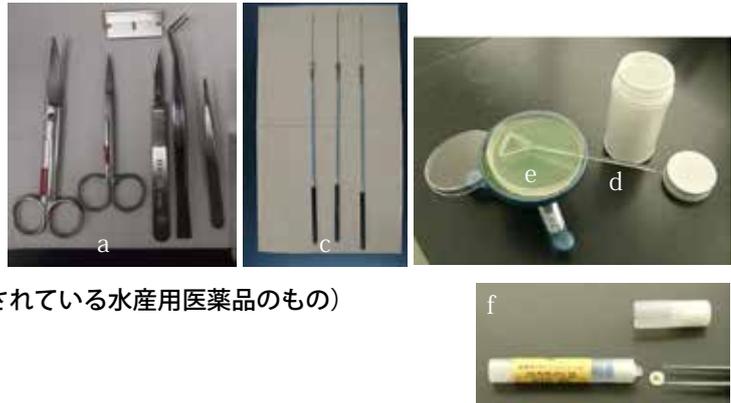
### 1. 細菌分離と簡易的な薬剤感受性試験

病魚の症状等から細菌病が疑われる場合、体表患部、鰓、内臓諸器官等のスタンブあるいは塗抹染色標本を作製して観察し、さらに必要に応じて普通寒天培地やハートインフュージョン寒天培地等を用いて細菌の分離と同定を行う。対象とする細菌の種類によって使用する分離用培地は異なるので注意を要する。

また、同時に原因菌の水産用医薬品に対する感受性を調べるため、簡易的な薬剤感受性試験を行う。

#### (1) 材料：

- a. 解剖器具（ハサミ、ピンセット）
- b. アルコール綿
- c. 白金耳
- d. コンラージ棒
- e. 細菌培養用培地
- f. 薬剤感受性ディスク（その病気に認可されている水産用医薬品のもの）
- g. インキュベーター



各種病原細菌分離のための培地と培養温度

病名	細菌名	培地	培養温度
滑走細菌症	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	海水サイトファーガ寒天培地	25℃
ビブリオ病	<i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Vibrio</i> spp.	ハートインフュージョン寒天培地	25℃
類結節症	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	ハートインフュージョン寒天培地	25℃
α溶血性レンサ球菌症	<i>Lactococcus garvieae</i>	ハートインフュージョン寒天培地	25℃
新型レンサ球菌症	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	ハートインフュージョン寒天培地	25℃
ノカルジア症	<i>Nocardia seriolae</i>	7H11 培地、小川培地	25℃
抗酸菌症	<i>Mycobacterium</i> spp.	7H11 培地、小川培地	25℃

## (2) 方法：

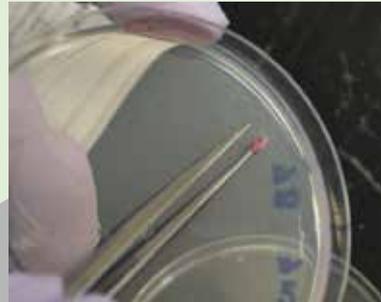
### ① 細菌分離

細菌を分離する部位は、スタンプ標本の観察で細菌を確認した臓器（通常は腎臓や脾臓）とする。 $\alpha$ レンサ球菌症やビブリオ病では脳を用いることもある。

採取する臓器の表面をアルコール綿等で消毒した後、一部を切り取って培地へ載せ、塗抹するか白金地で画線する。採材部分は細菌が確認された患部ごとに行う。



採取する臓器の表面をアルコール綿で消毒



寒天培地に塗抹する



一部を摘出



適温でインキュベートして菌の発育を確認する

### 細菌分離の手順

### ② 簡易的な薬剤感受性試験

**(注意：本手法は迅速・簡易的な手法で、正確に薬剤感受性を調べる手法ではない。)**

臓器を培地に塗布し、そこに生理食塩水を数滴加え、滅菌処理したコンラージ棒で塗り広げる。この際、ターンテーブル等を使用すると広げやすい。白金耳で展開する場合には白金耳を火炎滅菌し、十分冷やした後、採取した臓器から培地に画線する。使用が承認されている水産用医薬品のディスクを培地に載せる。

シャーレの周辺をパラフィルムで巻き、培地の乾燥を防ぐ。インキュベーター内で培養する。目的とする細菌の種類により、培養温度・時間等は異なる。



摘出した臓器を寒天培地にコンラージで一様に塗り広げる。



薬剤感受性ディスクを置いて、適温でインキュベートする。



ディスク周囲の阻止円の形成度合いで薬剤感受性を判断する。

### 簡易的な薬剤感受性試験方法



隆起が少ない正円状で縁辺が円滑なコロニーである。

ハートインフュージョン寒天培地

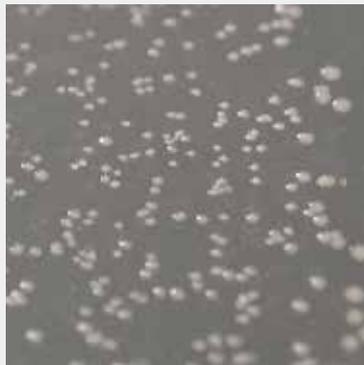
$\alpha$  溶血性連鎖球菌症原因菌  
*Lactococcus garvieae*



表面が粗く形状が不規則な薄茶色から淡黄色のコロニーである。

7H11 培地

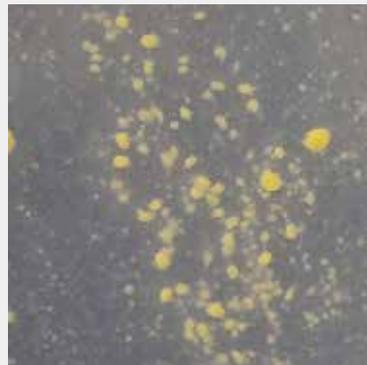
ノカルジア症原因菌  
*Nocardia seriolae*



隆起が少ない正円状で縁辺が円滑なコロニーである。

ハートインフュージョン寒天培地

新型連鎖球菌症原因菌  
*Streptococcus dysgalactiae*



7H11 培地での長期間の培養で、表面が粗く形状が不規則な薄茶色のコロニーである。

7H11 培地

抗酸菌症原因菌  
*Mycobacterium* sp.



中央部がやや隆起した正円状で円滑。光沢かつ透明感がある灰白色のコロニーである。

ハートインフュージョン寒天培地

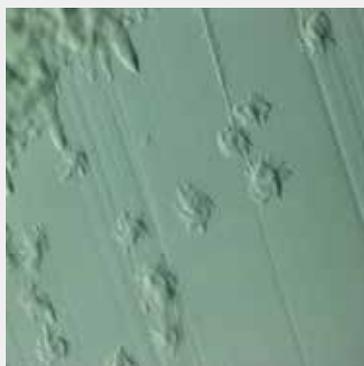
ビブリオ病原菌  
*Vibrio* sp.



正円状で円滑かつ、半透明で無色、粘稠の強いコロニーである。

ハートインフュージョン寒天培地

類結節症原因菌  
*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*



表面が粗で縁辺が樹根状の扁平なコロニーである。

海水サイトファーガ培地

滑走細菌症原因菌  
*Tenacibaculum maritimum*

### 各種細菌のコロニー像

## 2. API20E による細菌（グラム陰性菌）の同定

分離された細菌を必要に応じて細菌同定キットの API 20E で同定を行う。詳細はキットに添付する使用説明書を参照のこと。

### (1) 試薬・消耗品等：

- a. API 20E (シスメックス・バイオメリュー (株)、code 20107)
- b. 0.85% 滅菌生理食塩液 5mL (〃、code 20230)
- c. TDA 試薬 (〃、code 70402)
- d. VP 1+2 試薬 (〃、code 70422)
- e. NIT 1+2 (〃、code 70442)
- f. Kovac's Reagent for indoles (100mL Sigma code 60983)
- g. チトクローム・オキシダーゼ試験紙「ニッスイ」(日水製薬(株)、code 05180)
- h. 流動パラフィン (ナカライテスク (株)、code 26114-75)
- i. apiweb™ 同定ソフトウェア (シスメックス・バイオメリュー (株)、code 40011)



### (2) 方法：

#### ① 準備：

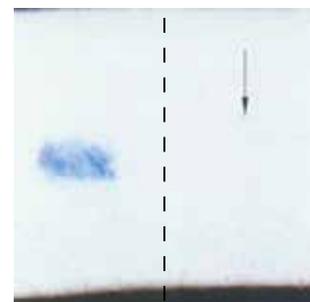
- ・ 検査対象の分離菌を純培養して、培養後 18 ~ 24 時間のものを使用する。
- ・ 培養時の保湿のため、培養容器のトレーの窪みに蒸留水をいれる。サンプル名は外側のスペースに記入する。
- ・ 検査用のプレートを取り出して包装を取り除き、トレーに設置する。
- ・ 純培養した分離菌のコロニーを、かすかに白濁する程度に滅菌生理食塩液 5mL に懸濁させて菌液を調製する。



トレーの窪みに DW を入れる

#### ② オキシダーゼ試験：

オキシダーゼ試験のみ試験紙で判定する。蒸留水 10  $\mu$  L をチトクローム・オキシダーゼ試験紙(ろ紙)に染み込ませて湿らせた後、滅菌した白金耳(爪楊枝でもよい)を用いて分離菌のコロニーをろ紙に塗抹する。30 秒以内に明瞭な青紫色に変色したら 陽性と判定する。結果は成績記入用紙の 21 番目の試験項目として記入する。



オキシダーゼ試験  
陽性(左)と陰性(右)

#### ③ 菌液の接種：

- ・ 気泡が入らないよう注意して、菌液を検査用プレートに接種する(カップの開口部を上にして傾け、ピペットの先をカップの側面に軽く押し付けて菌液を流し込む)。

- ・試験項目の CIT、VP、GEL は、チューブとチューブ開口部のカップ一杯に菌液を接種する。
- ・試験項目の ADH、LDC、ODC、H<sub>2</sub>S および URE は、菌液を接種した上に流動パラフィンを重ねてカップを満たす。
- ・その他の項目は、チューブ部分のみに菌液を接種する。



チューブへの菌液接種

④ 培養：検査用プレートの入ったトレイに蓋をし、分離菌を培養した温度で 18～24 時間培養する。

⑤ 判定:キットの“判定表”を参照して判定を行う。(陽性と陰性の色見本は apiwebTM で確認することができる。) GLU の項目以外の項目で 3 種類以上の陽性が示された場合は、TDA、IND、VP (添加試薬を用いる試験) 以外の項目の判定結果を成績記入用紙に記入する。



プレートのセット

⑥ 添加試薬を用いて以下の試験を行い、“判定表”を参照して判定し、判定用紙に記入する。

- ・TDA 試験：TDA のチューブに TDA 試薬を 1 滴添加。
- ・VP 試験：VP のチューブに VP 1 試薬および VP 2 試薬を 1 滴ずつ滴下し、10 分以上静置。
- ・IND 試験：IND のチューブに Kovac's 試薬を 1 滴添加 (全ての判定終了後に実施)。



⑦ GLU 以外の項目で陽性が示されたものが 3 種類未満であった場合は、そのままさらに 24 時間培養を継続し、その後添加試薬を用いる試験を行う。

⑧ 得られた結果を同定ソフトウェア (apiweb) に入力して同定する。もしくは、書籍 (Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals) に掲載されている魚病細菌の性状 (Table 4.23) を参考に同定する。



検査結果の例  
(最下段は結果の記入例)

### 3. ウイルスの分離培養（細胞による分離）

推定診断あるいは病原体検査によって原因と考えられる寄生虫や細菌が検出されず、臨床症状や疫学情報からウイルス病の可能性が疑われる場合、ウイルスの分離・培養や PCR 検査が必要となる。カンパチのウイルス病は現状では限られているが、ウイルスの分離には生きた培養細胞を用いるので、ウイルスや細胞の特性をよく理解して実施する必要がある。

#### 1) ウイルス分離に必要な細胞の培養

##### (1) 材料：

###### ・器具・消耗品

- a. 10mL ディスポーザブルピペット 1本
- b. 先曲リピペット（滅菌済み）。細胞分散と溶液用で2本
- c. 細胞培養マイクロプレート（24 ウェル）2枚
- d. 培養フラスコ 25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup> 各1本
- e. ピペット台
- f. オートピペッター
- g. 滅菌ガラスビン



組織培養用の器具・消耗品

###### ・培地成分

- a. Minimum Essential Medium 液体培地 (MEM) 500mL (Gibco<sup>®</sup> 500mL Cat. No.11575-032)
- b. Fetal Bovine Serum (FBS: ウシ胎児血清) (濾過滅菌済み) 50mL
- c. 1 M Tris 水溶液 pH8.0 、5～7mL
- d. 7.5% 炭酸水素ナトリウム (重曹) 5mL
- e. 抗生物質 (Penicillin - Streptomycin - Neomycin 100X Solution : Gibco<sup>®</sup> 100mL Cat.No.15640)



MEM と V/T 液

###### ・その他

- f. 培養細胞 (BF-2, EPC, CHSE-214, FHM, KRE-3 など) 75cm<sup>2</sup> フラスコ 1本
- g. ベルセン / トリプシン (V/T 液) : 0.25% Trypsin-EDTA 1mL (Gibco<sup>®</sup> 100mL Cat. No. 25200-056)
- h. ベルセン : 0.02% EDTA 液 5mL

##### (2) 方法：

- ① 細胞培養は全てクリーンベンチ内で実施する。
- ② 培地の調製として、MEM 液体培地 (500mL) に 7.5% 炭酸水素ナトリウム (重曹) 水溶液を 5mL、PSN を 5mL、Tris 溶液を 5mL、FBS を 50mL 加え、よく混合し、MEM 培養液とする。
- ③ MEM 培養液を滅菌ビーカーに必要量 (75cm<sup>2</sup> フラスコの培養細胞 1本で 50mL : 古い培養液の 3～5 倍程度まで) 分



クリーンベンチ内に機材をセット

注する。

- ④ 培養に使用する十分に細胞が増殖した培養フラスコ（75cm<sup>2</sup>）から培地を先曲りピペットで吸い出して捨て、EDTA 溶液 3mL を細胞に直接触れないように入れ、細胞をリンスした後に吸い出す。ついで新しい EDTA 溶液 1 mL を同様に入れ、再度この操作を繰り返す。
- ⑤ ついで、細胞分散用 V/T 液 0.5mL を同様に入れ、細胞表面をリンスして 2 分間静置し、フラスコ表面の細胞シートが白濁し、わずかに剥離が見られたところで V/T 液を静かになに抜き取る。キャップをしてフラスコの側面を手のひらで軽くたたき、細胞の剥離を確認する。
- ⑥ フラスコに MEM 培養液を 2 ~ 3mL 入れ、先曲りピペットで 50 回程度、泡立てないようにピペッティングし、細胞の物理的分散を行い、剥離した細胞を培養液を入れた滅菌ビーカーに全て移し、ゆっくりと攪拌する。
- ⑦ 10 mL のメスピペットを用いて、24 ウェルプレートに細胞懸濁液を 1mL ずつ、全てのウェルに分注し、プレートに細胞名、継代番号・年月日等を記入したラベルを貼り、使用するまで 20℃ のインキュベーターで静置保存する。なお、ウイルス接種は、細胞継代後 1 日以内を目途に実施し、保存期間を超えた場合は再度新しいプレートに調製する。
- ⑧ 24 ウェルプレート及びその他の容器で細胞を継代する際に必要とする細胞懸濁液の分量の目安は、24 ウェルプレート 1 枚約 25mL（1mL/ ウェル）、96 ウェルプレート 1 枚約 10mL（100 μ L/ ウェル）、25 cm<sup>2</sup> フラスコ 1 本 5 mL、75 cm<sup>2</sup> フラスコ 1 本 15-20 mL である。



細胞表面のリンス



ピペッティング



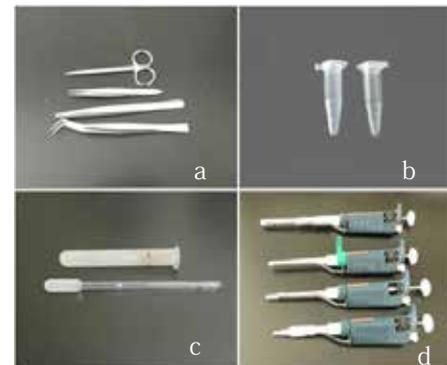
プレートへの分注

## 2) 細胞を用いたウイルス分離手順

### (1) 材料：

#### ・器具・消耗品

- a. 解剖器具（滅菌済み） 1 セット
- b. マイクロチューブ（1.5mL、滅菌済み）
- c. ガラスホモジナイザー（滅菌済み） 1 組
- d. マイクロピペット（200 μ L、1,000 μ L） 各 1 組
- e. 滅菌チップ（200 μ L、1000 μ L 用、滅菌済み）
- f. 1.5 μ L マイクロチューブ（滅菌済み）
- g. シリコンチューブ（2mL、滅菌済み）
- h. 電子天秤（0.01g 単位）



検査用器財

## ・その他

i. 培養細胞（24 ウェルプレート） 1 枚

j. 抗生物質溶液（Antibiotic-Antimycotic（100 ×）；Gibco<sup>®</sup> x100 Cat.No.15240-062）

k. Hanks' BSS（Gibco<sup>®</sup> 500mL Cat.No.24020-117）



抗生物質溶液

## (2) 方法：

- ① ウイルス分離には主に腎臓、脾臓を用いる。また、腹水が貯留していた場合は、それを検査に用いることもある。できるだけ雑菌の混入がないように、臓器の摘出時はアルコール綿などで臓器の表面を消毒する。摘出した臓器を眼科用ハサミまたは未使用のメスで細切し、ピンセットでマイクロチューブ（滅菌済み）に取る。試料は直ちに氷冷して、以後のウイルス分離に用いるが、すぐ使用しない場合は -80℃で凍結保存する。
- ② ガラスホモジナイザーをあらかじめ氷冷しておく。摘出した臓器から、およそ 100mg の組織を切り取り、電子天秤で重量を測定して検査試料とする。
- ③ ガラスホモジナイザーに検査試料を入れ、さらに検査試料の重量の 9 倍量の Hanks BSS を加え、組織が乳化するまでよく磨砕する。
- ④ 磨砕液の全てを 1.5mL のマイクロチューブに入れ、4℃で 2,500rpm・5 分間遠心分離し、100 μ L の上清をシリコンチューブに取る。
- ⑤ あらかじめ Hank's BSS で 10 倍量に希釈しておいた 100 × 抗生物質溶液 900 μ L をシリコンチューブに加えて混合し、4℃で 1 晩、抗生物質を反応させて滅菌する（この段階で検査試料は、当初の 100 倍に希釈された状態となる）。
- ⑥ 検査試料、培養細胞の 24 ウェルプレート及び器具類をクリーンルームに搬入する。クリーンベンチ内で培養細胞の 24 ウェルプレートの蓋を開け、マイクロピペットを用いて検査試料を 100 μ L 取り、ウェルに接種する。各検体ごとに、この操作を 2 回（2 ウェル）実施する。
- ⑦ 全検査試料の接種が終了したら、蓋とプレートをビニールテープ等で封をして、20℃のインキュベーターに収容し、7-10 日間、CPE（= Cytopathic Effect：細胞変性効果）の発現の有無を観察する。



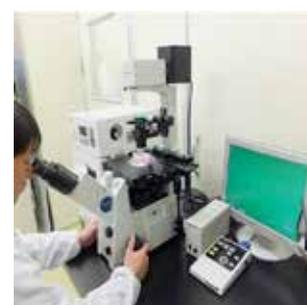
解剖して臓器を摘出



ホモジナイザーによる磨砕



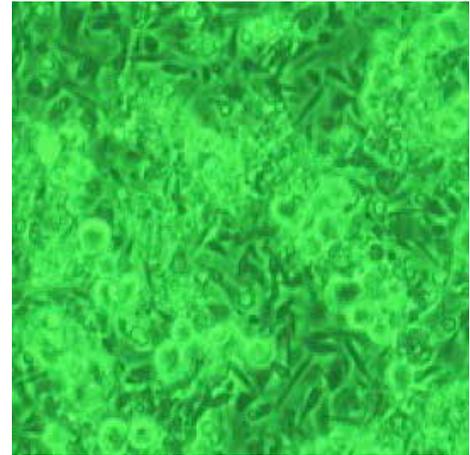
細胞へのサンプルへの接種



CPE の観察

## (盲継代)

- ① 7-10 日後に CPE が観察されなかった場合、盲継代を行う。盲継代は 1 検体の 2 ウェルからそれぞれ 100  $\mu$  L ずつをマイクロピペットで取り、新しい細胞培養プレート (24 ウェル) の 1 ウェルに接種する (計 200  $\mu$  L)。
- ② なお、CPE が観察されたら、培養上澄について各ウイルス検出用のプライマーを用いた PCR 検査を実施する。(PCR 検査の頁参照)



マダイイリドウイルスの CPE

### \*付録 1 : Tris 調製方法 (1M Tris 溶液 200mL)

M = mol/L : (121.14g Tris/L)  $\rightarrow$  24.228g/200mL

- トリス 24.228 g を滅菌 DW150mL に溶解する。
- 0.1N HCl で pH を調整 (約 pH7.6 ~ 7.8) し、滅菌 DW を加えて 200mL とする。
- GS フィルター (0.22  $\mu$  m、ミリポア) を付けた大型シリンジ (20 ~ 50mL) を用いて濾過滅菌し、新しい滅菌ボトルに入れる。
- 製造年月日、Tris と明記して冷蔵庫に保存する。

### \*付録 2 : 7.5%炭酸水素ナトリウム溶液の調製 (100mL)

- 炭酸水素ナトリウム NaHCO<sub>3</sub> 7.5 g を滅菌 DW に溶解し、GS フィルター (0.22  $\mu$  m、ミリポア) を付けた大型シリンジ (20 ~ 50mL) を用いて濾過滅菌する。培地添加時の最終濃度は 750mg/L となる。調製後は冷蔵に保存する。

### \*付録 3 : 0.02% EDTA 含む PBS 液の調製

- 2NA (EDTA-2NA) 0.1 g を PBS 4.8 g 溶液に溶解し、全量を 500mL にする。
- 10mL のスクリーキャップ付きガラス容器に分注し、高圧滅菌をする。常温で保存する。

### III. PCR による病原体の検出

PCR 法は様々な病原体の検出に用いられ、検出感度も高い検査法である。しかし、コンタミネーションにより誤判定してしまう恐れもあるので、検査部位の採取や DNA 抽出、反応液の調製時には細心の注意が必要である。

#### (1) 材料：

##### • 器具・消耗品

- a. 解剖器具（滅菌済み）
- b. ホモジナイザー（マイクロチューブ用）
- c. マイクロピペット（10、200、1,000  $\mu$ L）
- d. フィルターチップ（10、200、1,000  $\mu$ L 用）
- e. マイクロチューブ（0.2、1.5mL）
- f. チューブ立て（0.2、1.5mL 用）
- g. コニカルビーカー（200mL）
- h. パラフィルム
- i. 小型冷却遠心機
- j. 卓上ミニ遠心機
- k. サーマルサイ클ラー
- l. ブロックインキュベーター
- m. 電子レンジ
- n. 電気泳動槽
- o. トランスイルミネーター
- p. 記録撮影装置
- q. ボルテックス

##### • DNA 抽出用試薬

- a. DNA 抽出キット（例）：Gentra Puregene Tissue Kit  
（4g 用 キアゲン Code: 158667）  
参考：プロテナーゼ K (Takara 20mg / mL)
- b. 2- プロパノール（特級）
- c. 70% エタノール（特級を dDW で希釈）

##### • PCR 反应用試薬

- d. Takara Ex Taq Hot Start Version (Takara Code: RR006A)
- e. dDW (DNase free) (Gibco® Cat.No. 10977015)
- f. プライマー：検査対象による。



主要な PCR 用機器類



DNA 抽出キット



dDW  
(DNase free)



Taq 酵素

## ・電気泳動用試薬

- g. 電気泳動用アガロース S もしくは HS (ニッポンジーン)
- h. 10 x TAE バッファー (Gibco® Cat.No.15558-042)
- i. エチジウムブロマイド液 (10mL Gibco® Cat.No.15585-011): 染色液:  
蒸留水 500mL に対しエチジウムブロマイド原液 25  $\mu$  L を注入
- j. 分子量マーカー (100bp ラダー: ロッシュ 50  $\mu$  L)



アガロース



エチジウム  
ブロマイド液

## 1) テンプレートの作製

(Puregene Cell and Tissue Kit を用いた DNA の抽出)

### (1) サンプルの採取：

病魚の組織をサンプルとして PCR 検査を行う場合は、ウイルスの分離培養と同様に腎臓、脾臓を採材する。採集する組織は少量 (10mg 程度) でよい。

PCR 法は検出感度が高いためコンタミネーションが起りやすいので、使用する器具 (ハサミやピンセット) は検査する個体ごと、臓器ごとに交換する必要がある (アルコール綿による滅菌では防げない)。使用済みの器具は塩素で DNA を分解する必要がある。なお、オートクレーブ処理では DNA の分解は不十分である。



解剖器具は検体ごとに交換

### (2) DNA の抽出：

- ① オートクレーブで滅菌済みの 1.5mL マイクロチューブに、lysis buffer (キット付属) を 300  $\mu$  L の入れる。
- ② 採材した臓器から、さらに約 5 ~ 10mg (米粒半分程度) を切り取り、lysis buffer を入れたマイクロチューブに臓器片を入れて、オートクレーブ滅菌済みのホモジナイザーで磨砕する。
- ③ 磨砕した組織をブロックインキュベーターを用い、65°C で 30 分間加温する。
- ④ プロテナーゼ K (5 倍希釈液) を 15  $\mu$  L 添加し、ボルテックス (攪拌機) で強く混合する。なお、コンタミネーションを防ぐために、マイクロチューブの蓋を開ける前には、必ず卓上ミニ遠心機でマイクロチューブの内壁についた水滴を落とす (=スピンドウン)。
- ⑤ ブロックインキュベーターを用い、55°C で 30 分間以上加温して組織を完全に溶解させる。チューブをスピンドウンして、Protein Precipitation Solution (PPS) (キット付属) を 100



検査試料のホモジナイズ



検査試料のインキュベート

$\mu$  L 入れて攪拌機で 20 秒間程度よく混合する。

- ⑥ 冷却遠心器で、4℃で 13,500rpm・3 分間遠心分離する。上清を 350  $\mu$  L 吸い取り、あらかじめ 2-プロパノールを 350  $\mu$  L 入れた別の 1.5mL マイクロチューブに添加する。上清を吸い取る際、不溶解物を吸わないよう注意する。なお、不溶解物が多く、上清だけが吸い取れないものは、ピペッティングで混合して再度遠心分離する。
- ⑦ 上清を添加後、攪拌機でよく混合し、室温で 2 分間放置して DNA を析出させる。
- ⑧ 4℃で最大回転数 (14,000rpm)・5 分間遠心分離し、チューブの底に白色のペレットがあることを確認する。
- ⑨ 1,000  $\mu$  L のマイクロピペットを用いて上清を除去し、70% エタノールを 500  $\mu$  L 加える。再度、4℃で 14,000rpm・3 分間遠心分離し、上清を除去する。
- ⑩ 37℃のブロックインキュベーターで軽く乾燥させた後、DNA Hydration Solution (キット付属) を 100  $\mu$  L 加え、チューブの底を指で弾いてペレットをよく溶かす。ペレットが溶けない場合は、スピンドウンしてから再度 37℃で温めると溶けやすい。テンプレートが完成。
- ⑪ ペレットが溶けたらテンプレートが完成。-20℃で保存する。



冷却遠心



沈殿した DNA

\*注意. 使用した器具および廃棄物は滅菌缶に入れてオートクレーブ滅菌をする。病魚の輸送に使用した発泡スチロール等は廃棄用の袋に入れ、焼却処分する。

## 2) PCR 反応

- ① PCR 反応液の調製は、氷上などで低温に保ちながら行う。
- ② オートクレーブ滅菌済みの PCR 用 0.2mL マイクロチューブを準備し、サンプル番号を記入する (チューブの数は陽性対照 (=ポジコン) と陰性対照 (=ネガコン) を含めて、サンプル数+2 本)。
- ③ PCR 反応酵素は Takara Ex Taq Hot Start Version を使用する。下表を参考に、酵素、付属する緩衝液、プライマー等を混合して、必要本数分の PCR 反応液を調製する (泡立てないようにしてよく混合する)。
- ④ 調製した PCR 反応液を PCR チューブに 19.0  $\mu$  L ずつ分注する。
- ⑤ 1  $\mu$  L のテンプレート (検体から抽出した DNA) を、それぞれを PCR チューブに加え、キャップをしっかりと閉める。



PCR 反応液の調整

- ⑥ スピンドアウンして、液をチューブの底に集める。
- ⑦ サーマルサイクラーのヒートブロックに PCR チューブをしっかりと挿入する。蓋を閉め、サーマルサイクラーのプログラムを確認して直ちにスタートさせる。



サーマルサイクラーへのセット

### PCR 反応液の調製例

試薬名	(1 検体分の量)
10 × EX 緩衝液	2.0 μ L
2.5mM dNTP Mix	1.6
Takara EX Taq 酵素	0.1
プライマー 1 (10pmol/ μ L)	0.2
プライマー 2 (10pmol/ μ L)	0.2
dDW	14.9
合 計	19.0
テンプレート	1.0

\*プライマーは検査対象により異なる。

## 3) 電気泳動

- ① 適当量の 1 × TAE 緩衝液に、1% となるように電気泳動用アガロースの粉末を加え、電子レンジで完全に溶解させる。溶解中の突沸に注意する。
- ② アガロースの溶液が 60℃程度になるまで冷却し、ゲルメーカーに流し込む。コームを差し込む際、気泡がコームの周辺に残らないように注意する。ほこりが入らないよう注意して冷却する。
- ③ 十分に冷却したらコームを抜き、1 × TAE 緩衝液を入れた電気泳動槽にセットする。
- ④ 反応が終了した PCR チューブに 3 μ L の電気泳動用ローディングバッファーを入れて混合する。7 μ L の混合液を泳動槽にセットしたアガロースゲルのウェルに入れる。なお、分子量マーカーも同様にウェルに入れる。
- ⑤ 泳動槽の蓋を閉じ、100V (定電圧) で電気泳動を行う (負電荷の核酸が泳動されるためサンプル側の電極はマイナスであることを確認する)。
- ⑥ 先行の色素マーカーがゲルの中央かそれ以上まで泳動 (20 ~ 30 分間程度) したところでスイッチ切り、ゲルを取り出す。
- ⑦ 染色液 (臭化エチジウム溶液) の入ったプラスチック容器に



アガロースゲルの作製



泳動サンプルのウェルへのアプライ

15～30分入れて染色し、トランスイルミネーター上にのせ、トランスイルミネーターの電源を入れて観察する（UV波長は300nm付近）。臭化エチジウムは発ガン性があるので作業する際は手袋を着用する。また、UV観察は裸眼で見ると危険なので防護めがねを使用する。

\*なお、染色液を使わず、染料を混合したゲルを使用する方法もある。その場合は、ゲル作製時に20倍希釈臭化エチジウム溶液をアガロース100mLに対して20 $\mu$ L加える。

#### 4) 判定

- ① 陽性の場合には目的とする分子量に病原体遺伝子由来の増幅産物のバンドの出現を確認し、泳動像をデジタルカメラ等で記録する。
- ② 得られたバンドの分子量は、分子量マーカの位置から測定し、予想されるPCR産物の分子量であることを確認するとともに、陽性対照のバンドの位置と比較して同じであれば陽性と判定する。

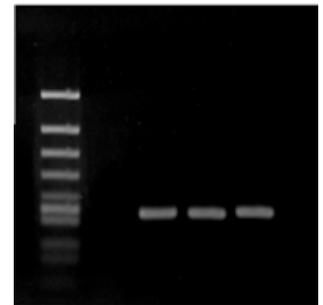
なお、陽性対照にバンドが出ない、陰性対照に陽性バンドが出た場合は、操作の不備やコンタミネーションが疑われるため、手順や試薬を点検して、再度やり直すなど、検討が必要となる。



電気泳動中の様子



トランスイルミネーターに載せたゲル



電気泳動の結果例  
(左側は分子量マーカ)

## IV. 固定法・標本作製法

カンパチには様々な分類群の寄生虫が寄生する。それぞれの分類群あるいは寄生虫の大きさによって標本作製法や観察法は異なるので、その寄生虫に適した手法を用いることが肝要である。そのためにも、最初の推定診断でできるだけ的確な診断が必要となる。

### 1. 大型寄生虫の固定・標本作製法

一般に大型寄生虫（単生虫、吸虫、条虫、線虫、鉤頭虫、甲殻類の寄生虫）は固定法や標本の作製方法が異なり、適切な固定を施さないと標本としての利用価値がなくなってしまう。例えば、一般的に生物標本の保存に用いられる10%ホルマリン液浸固定を甲殻類以外の寄生虫で行うと、体が収縮して後々の観察ができなくなるので注意すること。

#### 1) 圧平固定

単生類（エラムシやハダムシ）や吸虫類、条虫類、鉤頭虫類は、体の各種器官の構造や形態の観察を容易にするため、スライドガラスとカバーガラスで挟み、背腹に薄く伸ばした状態で固定する「圧平固定」を行う。固定後、染色を施して永久プレパラート標本作製する。

#### (1) 材料：

- ・スライドガラス（エタノールに浸けて脱脂したもの）
- ・カバーガラス（対象の大きさに応じて18mm×18mmもしくは24mm×24mm）
- ・3~5mm×20mm程度の短冊状に切った薬包紙（通称：枕）
- ・海水または生理食塩水（外部寄生虫では海水。内部寄生虫では生理食塩水を使う）
- ・パスツールピペット2本（水用・固定液用）
- ・濾紙
- ・木綿糸
- ・AFA固定液（200mL程度のサンプル瓶で保存）：70%エタノール 20：ホルマリン 1：酢酸 1

#### (2) 方法：

- ① 固定する寄生虫が外部寄生虫（主に単生虫）であれば海水、内部寄生虫（吸虫、条虫等）であれば生理食塩水を用いて、寄生虫の表面についた宿主の粘液や組織片をピペットティングによる水流でよく洗い流す。
- ② スライドガラス上に少量の水と寄生虫を載せ、湿らせた枕を虫の上下に置く。枕はスライドガラスとカバーガラスの隙間を確保して虫体がつぶれるのを防ぐ。単生虫や吸虫類では薬包紙一枚の厚さで十分だが、鉤頭虫のように厚みのある虫体では複数枚重ねて

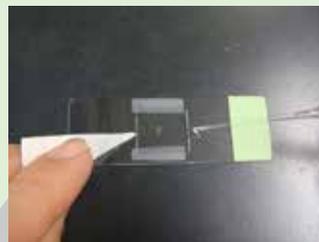
使用する。

- ③ カバーグラスを静かに被せる。この際、寄生虫がカバーグラスの隅に移動しないように注意する。
- ④ カバーグラスの片側から徐々に AFA 固定液を隙間に流し込む。同時に反対側から濾紙で水を吸い取り、隙間にあった水が固定液に置き換える。虫体の中心が白濁するまで続ける。
- ⑤ カバーグラスが外れぬように、木綿糸でしっかりスライドグラスに括り付け、AFA 固定液の瓶に入れて、数日間固定する。

※専門家へ鑑定依頼のためサンプルを送付する場合は、AFA 固定液に収容した状態で送るのが良い。緩衝材でボトル内の隙間をうめてスライドグラスが動かないようにして、液漏れがないように密封する。



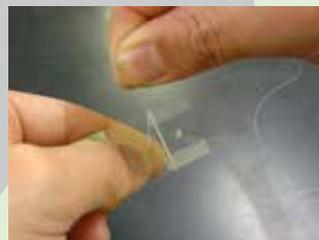
ピペティングで虫体に付着しているゴミを取り除く。



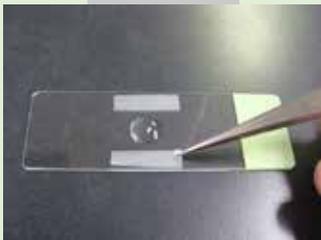
カバーグラスの片側から徐々に固定液を流し、反対側から濾紙で吸い取ることで、カバーグラス下の水を固定液に置き換える。寄生虫の体の中まで白くなれば固定完了。



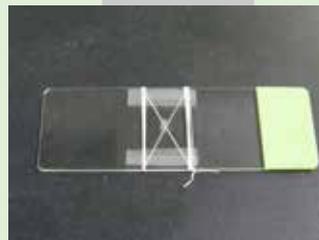
少量の水と寄生虫をスライドグラスに載せる。



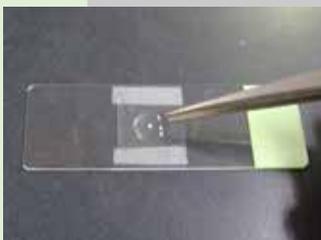
木綿糸でカバーグラスをスライドグラスに括り付ける。



寄生虫を上下に挟むように「枕」を載せる。枕を湿らせてから載せると動かない。



圧平固定完了。



静かにカバーグラスを被せる。この時点でカバーとスライドグラスで圧平される。寄生虫がつぶれない程度にカバーグラス下の水を濾紙で吸い取り、さらに圧平する。



AFA 固定液の入った瓶に入れて、さらに数日間固定する。

### 圧平固定の手順

## 2. 染色（アラムカーミン染色）

圧平固定された寄生虫は、そのままでは体が白濁しており観察は難しいため、染色を施して永久標本を作製する。アラムカーミン染色では器官ごとに赤紫色の濃淡に染め分けられるため、観察が容易になる。

### (1) 材料：

- ・染色瓶（染色液用1本、分別用1本、脱水系列4本、透徹用2本）
- ・アラムカーミン染色液：カーミン2gと5%カリみょうばん液100mLを混ぜ、30分間煮沸する。蒸発した水分は足す。冷却後にチモールを1g加えて原液とする。使用時は5倍程度に薄める。
- ・塩酸アルコール：70%エタノールに1%の割合で塩酸を加えたもので、染色後の分別（脱色）に使用する。
- ・エタノール：各種濃度（70%、90%、100%、無水エタノール）の系列を準備し、染色後の脱水に使用する。
- ・キシレン：脱水後の透徹に使用する。
- ・封入剤：カナダバルサム等。
- ・カバーガラス：虫体の大きさにより選ぶ。

### (2) 方法：

- ① 十分に固定された圧平標本を水を張った大型シャーレに入れ、糸を切り、注意深くカバーガラスを取り除く。カバーガラス側に虫がついた状態で剥がれた場合は、虫側を表にして、スライドガラスに括り付ける。虫が剥がれてしまったら、小型のシャーレなどに入れて、以後の操作を行う。
- ② 再度、固定液に1日間浸けて完全に固定する。
- ③ 水で染色液を洗い流す。
- ④ アラムカーミン染色液に1日間浸けて染色する。染色後は寄生虫全体が濃い赤紫色に染まった状態である。水で染色液を洗い流す。
- ⑤ 塩酸アルコールの入った染色瓶に染色後のスライドガラスを浸けて分別する。数秒ごとに取り出して、顕微鏡で染色の具合を確認しながら進める。全体が濃く染色されていた虫体が、塩酸アルコールにより脱色されるので、寄生虫の内臓器官とその他の組織でコントラストがはっきりした段階で分別を終了する。
- ⑥ エタノール系列にそれぞれ半日程度浸けて、脱水する。
- ⑦ キシレンに半日程度浸けることを2回行い、透徹する。
- ⑧ 封入剤で封入し、永久標本とする。

## 3. 液浸固定

### 1) 線虫類の固定

線虫類は体表面がクチクラで覆われており、圧平することはできない。また、直に固定液に投入してしまうと、コイル状に丸まって固定されてしまうため、標本としての価値がなくなってしまう。そのため、固定の前に熱した生理的食塩水に投入して体を伸ばした状

態で固定したのち、液浸標本として保存する。

**(1) 材料：**

- ・70% エタノール
- ・グリセリン・アルコール溶液（70% エタノール1：グリセリン2の割合の混合液）

**(2) 方法：**

- ① 生理食塩水中でピペッティングにより虫体の表面についた粘液や宿主の組織等を洗い流す。
- ② 生きた線虫を70℃程度に熱した生理食塩水に線虫を投入すると、瞬時に体を伸張させた状態で死ぬ。直ちに引き上げて70%エタノールで固定して、液浸標本として保存する。

**(3) 観察：**

70% エタノール中で保存していた標本を、グリセリン・アルコール溶液に移す。グリセリンが浸透するに従って、徐々に標本が透明になるので顕微鏡で観察する。観察後は70% エタノールに戻して保存する。

**2) 甲殻類の固定**

甲殻類の外骨格は硬いキチン質なので、直に固定液で固定して差し支えない。ただし、固定前の洗浄は入念に行い、宿主の組織や粘液のかたまりは取り除くこと。

**(1) 材料：**

10% 緩衝ホルマリン

**(2) 方法：**

海水中でピペッティング等により虫体の表面についた粘液や宿主の組織等を洗い（流した後、10% 緩衝ホルマリンで固定して、液浸標本として保存する。

**(3) 観察：**

観察時は固定液から取り出して、観察する。観察後はもとの固定液に戻す。

## 4. 病理組織観察のための組織固定法

病理組織の観察・判定には高い専門性が必要となるため、専門機関に依頼する。ここでは、現場での作業として、病理組織標本用の試料採取と固定方法を紹介するにとどめる。病理組織標本作製のための固定液には種々あるが、Davidson 固定液による固定法を紹介する。

### (1) 材料：

・Davidson の固定液（1L の処方）

エタノール：330 mL

ホルマリン：220 mL

氷酢酸：115 mL

蒸留水：335 mL

・サンプル瓶：サイズは固定する組織の量による。密栓できるものが望ましい。

### (2) 固定方法：

- ① サンプルを採取する魚は必ず生きた個体とする。また、サンプリング前にできるだけ脱血を行う。
- ② 病魚の皮膚や鰓、内臓、筋肉、脳などを観察し、肉眼的に明らかな異常があれば、その部分を採取する。サンプル採取時には周辺の正常部分もある程度含まれるように切り出すこと。
- ③ 可能であれば、固定液はあらかじめ冷蔵庫や氷で冷やしておくが良い。
- ④ 固定液の浸透を良くするため、組織は丸ごと固定せず、必ず鋭利なカミソリやメスで切断する。ただし、小さすぎたり、もろすぎたりして切断できない場合はそのまま固定する。
- ⑤ 固定する組織の厚さはなるべく薄くし、3~5mm 以下になるようにする。
- ⑥ サンプル瓶に入れる組織の量は、必ず固定液の量の 1/10 以下になるようにする。
- ⑦ 組織を固定液に投入直後から 30 分～1 時間程度までは頻繁に振盪機などで振盪する。振盪機がない場合は組織周辺の固定液が交換されるよう、数分おきにサンプル瓶をゆっくり上下にひっくり返す。特に、組織試料を投入直後は頻繁にこの操作を行う。また、固定後、移動する際には、固定液がよく動くようにサンプル瓶を横にして持ち運ぶと良い。

※（独）水産総合研究センター増養殖研究所 HP「病理組織標本固定法」

(<http://nria.fra.affrc.go.jp/sindan/kotei.htm>) を参考としました。

# 第4章

## カンパチの魚病

ウイルス病	マダイイリドウイルス病
細菌病	ビブリオ病 ビブリオ・ハーベイ感染症 類結節症 $\alpha$ 溶血性レンサ球菌症 新型レンサ球菌症 滑走細菌症 ノカルジア症 抗酸菌症 エピテリオシスチス症
真菌病	イクチオホヌス症
寄生虫病	脳微胞子虫症 べこ病 白点病 心臓クドア症 奄美クドア症 ハダムシ（ベネデニア）症 ハダムシ（ネオベネデニア）症 エラムシ（ゼウクサプタ）症 エラムシ（ヘテラキシネ）症 住血吸虫症 ヒルディネラ類吸虫による幼虫移行症 カンパチ筋肉条虫症 ウズムシ症 アニサキス症 鰓カリグス症 皮膚カリグス症
その他の病気	ヒドラの着生 オヨギイソギンチャクの刺症 腎腫大症



## マダイイリドウイルス病 (Red seabream iridoviral disease)

高水温期に発生するウイルス病で、1990年の初発以降発生地域、魚種が拡大し、病名のマダイばかりでなく、カンパチを含めたブリ類等でも重要な病気となっている。対策は不活化ワクチンの注射による予防が有効である。



写真1 マダイイリドウイルス病魚  
鰓や内臓（肝臓・脾臓）の貧血が顕著である。

### ○病原体と分類学的位置○

イリドウイルス科に属するDNAウイルスで、red seabream iridovirus (RSIV) と呼ばれる。本病原体は1990年に四国の養殖マダイ当歳魚で最初に発生し、その後、西日本を中心として全国に広がり、30を超える魚種で発生が確認されている。特にマダイ、ブリ、カンパチ、スズキ、シマアジ、インダイなどの主要な養殖対象魚種での被害が大きい。

本病は初発から短期間で多魚種へ広がったことから、海外からの輸入種苗の導入に伴ってわが国へ侵入したものと考えられているが、発生源・感染源は不明である。

### ○発生時期○

おおむね水温が20℃を超える7月から10月にかけての高水温期に発生し、25℃を超える期間が長くなると被害が大きくなる傾向にある。一方、20℃を切る時期においても発生がみられる。

### ○症状○

**外部症状：**病魚は体色が黒化し、力なく水面を遊泳する。眼球は軽度の突出や出血、水晶体の白濁が観察される。鰓は貧血のため褪色し、鰓弁の点状出血や先端部からの出血が観察される。

**内部症状：**内臓諸器官の褪色、脾臓の顕著な褪色と肥大、囲心腔の出血などが観察される。

**組織病変：**脾臓、心臓、腎臓、肝臓、鰓に、細胞質が塩基性色素で均一に濃染もしくは顆粒状に染まる大型の類円形を呈する細胞（肥大細胞）が出現する。特に、病理組織学的には脾臓で顕著な変化が認められ、広範な組織の空疎化と多数の肥大細胞が観察されることから、本病の診断には主に脾臓を対象とする。

## ○診断方法○

**簡易診断法 1：**鰓のウェットマウント標本を 40 倍程度の低倍率で観察する。鰓の組織中に散在している多数の小黑（褐色）点を確認する（写真 2）。

**簡易診断法 2：**脾臓のスタンプ標本を作製し、ギムザ染色を施し、光学顕微鏡で観察する。本病に特徴的な肥大細胞を確認する（写真 3）。

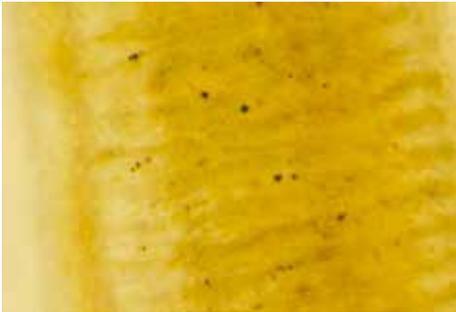


写真2 マダイイリドウイルス罹病カンパチの一次鰓弁のウェットマウント標本像。鰓弁中に黒点がみられる。

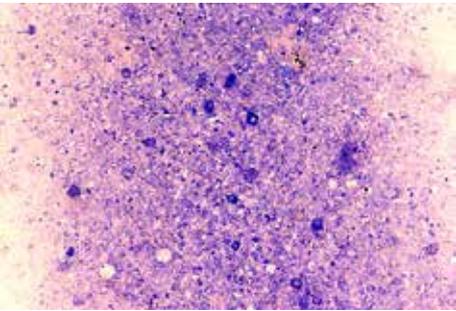


写真3 マダイイリドウイルス罹病カンパチ脾臓のスタンプ標本のギムザ染色像。大型の肥大細胞がみられる。

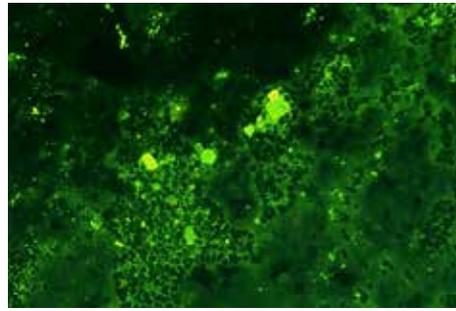


写真4 マダイイリドウイルス罹病カンパチ脾臓のスタンプ標本の蛍光抗体染色像。特異蛍光を発する肥大細胞がみられる。

**確定診断法 1：**脾臓のスタンプ標本を作製し、抗マダイイリドウイルスモノクローナル抗体による蛍光抗体法によりウイルス感染細胞を検出する（写真 4）。抗体は（独）水産総合研究センター増養殖研究所で配付している。

**確定診断法 2：**脾臓から抽出した DNA テンプレートとして、マダイイリドウイルス特異的プライマーを用いた PCR 法により、ウイルス遺伝子を検出する。

Forward Primer: 1-F (5'-CTC-AAA-CAC-TCT-GGC-TCA-TC-3')

Reverse Primer: 1-R (5'-GCA-CCA-ACA-CAT-CTC-CTA-TC-3')

反応条件： 94°C (2分)

94°C (30秒) , 58°C (30秒) and 72°C (1分) を 30 cycles

72°C (5分)

PCR 産物：570bp

## ○対策○

ウイルス病であるために薬剤による治療法はない。1999年にマダイを対象とした注射ワクチン「イリドウイルス感染症不活化ワクチン」が市販された。現在は、ブリ属魚類等にも対象魚種が拡大され、病気予防対策の根幹となっている。

## ビブリオ病 (Vibriosis)

主に稚魚から若齢魚に発生する病気で、稚魚では滑走細菌症などを併発して死亡することも多い。成魚では冬季に低温性のビブリオ病が発生することもある。



写真1 口吻部に発赤症状がみられる。



写真2 眼球が突出している。

### ○病原体名と分類学的位置○

病原体はグラム陰性の短桿菌で、血清学的には *Vibrio anguillarum* J-O-3 とそれに類似する *Vibrio* spp. に分類されるが、特定（一種類）の *Vibrio* 属細菌を指すものではない。

### ○発生時期○

春から初秋にかけて水温上昇とともに発生し、この時期に発生する他の細菌性の病気と併発することが多い。ビブリオ病単独の場合は薬剤効果が高い病気ともいえる。また、冬から早春に発生するいわゆる低温ビブリオ病は、薬剤を投与しても血中濃度があがらないため、効果が得られないことが多い。

### ○症状○

**外部症状:** ブリでは駆幹の浮腫、貧血による褪色、黒化、眼球の突出、眼窩周辺の出血および充血、角膜の白濁等、体表のスレおよび糜爛、鰭条の欠損や崩壊、鰭基部の発赤、肛門部の発赤症状を呈する。カンパチでは特徴的な外観症状を伴わないものも多いが、鰓の著しい貧血や鬱血がみられることもある。ハダムシ寄生により体表の擦過傷や糜爛を呈することもある。口吻部の発赤を伴う症状で、鰭の欠損を伴う場合、滑走細菌症と誤診することもあるので注意が必要である。

### ○診断方法○

**外部観察:** 駆幹（浮腫、痩せ）、体色（褪色または黒化）、各鰭（欠損）、眼球とその周辺、体表（スレ・糜爛）などの異常の有無を観察する。つぎに鰓の状態（貧血、鬱血、鰓腐れな

どの有無)とエラムシ、住血吸虫卵、その他の寄生虫(トリコジナなど)の寄生の有無を観察する。

**内部観察:** 内臓を傷つけないように腹壁を切開し、肝臓、腎臓、脾臓、幽門垂、消化管を観察して各臓器の肥大、結節の有無(ビブリオ病では結節の形成はまれである)、出血や貧血の有無を観察する。

**簡易診断法:** 臓器(主に脾臓と腎臓)の肥大が観察された場合、臓器のスライド塗抹標本またはスタンプ標本を作製し、ディフ・クイック染色あるいはグラム染色を施して光学顕微鏡で短桿菌の有無を観察する。

**細菌の分離:** 塗抹標本で短桿菌が確認された場合、2%NaCl加BHI寒天培地およびTCBS寒天培地に臓器片を直接塗抹するか、白金耳で臓器に穿刺して塗抹することにより細菌分離を行う。2%NaCl加BHI寒天培地で25℃、24時間培養し、増菌、発育したコロニーから白金耳で釣菌し、抗血清に対する凝集の有無を観察する。

*Vibrio anguillarum* J-O-3は、TCBS寒天培地で白糖分解性を示し、黄色コロニーを形成することから診断の目安になる。その他のビブリオ菌もTCBS寒天培地で黄色コロニーを形成することが多いので診断の目安と考えてよい。

## ○対策○

聞き取り調査および現場調査により、飼育管理状況、飼育密度、取扱状況などを把握し、問題点があればその改善を指示する。特に、飼育密度とハダムシ駆除、餌の鮮度・給餌量などは重要である。病原菌対策としてビブリオ病用に開発、承認された薬剤に対する感受性試験を実施し、感受性の高い薬剤を選定して決められた用法・用量で通常給餌量の8割程度のMPに混入して投与する。また、*Vibrio anguillarum* J-0-3に対して承認されたビブリオ病不活化ワクチンを稚魚期の水温が上昇する前に接種することで発病を軽減することができる。ただし、効果があるのは*Vibrio anguillarum* J-0-3による感染症のみであり、他の血清型のビブリオ病には効果がない。

## *Vibrio harveyi* 感染症 (*Vibrio harveyi* infection)

西日本の養殖カンパチで2011年頃から、夏から秋にかけて上皮組織の剥離や尾鰭欠損といった既存のビブリオ病 (*Vibrio anguillarum* 感染症) に類似する症状を特徴とする病気が発生した。本症は市販ビブリオ病ワクチン接種済のカンパチでも発生し、*Vibrio* 属細菌の一種である *V. harveyi* が原因である。また *V. harveyi* は養殖カンパチで問題となる眼球炎の発生に関与するとされる。一部の分離細菌では薬剤の耐性化が確認されることから、今後の被害拡大が懸念される。



写真1 上皮組織の剥離。



写真2 尾鰭の欠損。



写真3 腹水の貯留。



写真4 眼球炎の症状。  
左：眼球表面の白濁  
右：角膜消失と水晶体の脱落

### ○病原体名と分類学的位置○

病原細菌はグラム陰性運動性の短桿菌である。臓器の病巣部（腎臓、脾臓等）からスタンブ標本を作製しグラム染色を施すと多数のグラム陰性短桿菌が観察される。原因細菌は *V. harveyi* である。1.5%NaCl 添加ブレインハートインヒュージョン寒天培地, TCBS 寒天培地など、ビブリオ属細菌が培養可能な培地であれば分離培養できる。TCBS 寒天培地で培養すると本種

はスクロース（白糖）分解性のため、黄色いコロニーを形成する。TCBS 寒天培地で 27℃，一晚培養した場合，類似種の *V. anguillarum* と比べ大きなコロニーを形成することが多い。

### ○発生時期○

6月頃から10月頃までの発生が多く，高水温期である7-9月に多発する。稚魚期での発生が多いが，まれに1kg以上のサイズでも発生する。眼球炎は8-9月を中心に7-11月にかけて発生し，当歳魚の発生が多いものの，出荷サイズでの2年魚以上でも発生する。

### ○症状○

**外部症状：**稚魚では頭部や体表の上皮組織の剥離（写真1），尾鰭の欠損（写真2），腹水の貯留（写真3）が確認される。比較的大型のサイズ（1kg以上）では上皮組織の剥離が多い。養殖カンパチでは高水温期に眼球炎を発症する（写真4）。

**内部症状：**一般的に腎臓や脾臓の肥大が観察される。外部症状の進行した病魚では腹水の貯留が観察される。まれに腎臓や脾臓に膿瘍状の小白点が観察される。

### ○診断方法○

**外部診断：**J-O-3型ビブリオ病市販ワクチン接種済の病魚であり，かつ既存のビブリオ病と類似する症状（上皮組織の剥離他）を呈し死亡する場合は本症を疑う。また高水温期に養殖カンパチで眼球炎を呈する場合は本症の関与を疑う。

**簡易診断：**脾臓や腎臓をスライドグラスにスタンプした後に乾燥し，グラム染色を施して顕微鏡観察しグラム陰性短桿菌が多数観察されるか確認する。TCBS 寒天培地を用いて腎臓から釣菌し，25-27℃で一晩培養する。*V. anguillarum*，*V. harveyi* □ *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* の3種の細菌を同定できるマルチプレックスPCR（現在，論文投稿中）が開発されたことから，このPCR法を用いて分離細菌を同定すると良い。

### ○対策○

対策は基本的に既存のビブリオ病と同じであるが，本症はJ-O-3型ビブリオ病市販ワクチンの効果が期待できないことから，診断にあたっては分離細菌の同定と薬剤感受性の把握を可能な限り迅速かつ正確に行い，適切に投薬治療を指導することが重要である。

表1 マルチプレックスPCRに使用するプライマー一覧

標的種	標的遺伝子	プライマー名	配列 (5'-3')	予想産物(bp)
<i>V. anguillarum</i>	HlyA	VA1186-F	CGCATTAAACCCGATTGGTTACGC	350
		VA1535-R	TCATCACAGCTTGAGGCAGAGAG	
<i>V. harveyi</i>	SuB	VH298-F	AGCTATTATTCCGCGCCATCTTG	545
		VH842-R	AGGACGATCACTTCTACCACCG	
<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	ureC	PD785-F	CCATTGGTGATCGTGTTATCCACGTA	887
		PD1671-R	CTCTGTGGCTGGCTCACAAAGTTA	
	16S rRNA		CCTGGTAGTCCACGCCGTAA CGAATTAACACATGCTCCA	168

## 類結節症 (Pseudotuberculosis)

1969年(昭和44年)6月に、西日本各地のブリ養殖場で、餌付け後まもないブリ幼魚が突然、大量死する病気が発生した。本症は、現在までカンパチを含めた養殖ブリ類の幼魚に大きな被害をもたらしている病気である。



写真1 類結節症罹病魚の外観。体色の褪色と脱鱗がみられる。

### ○病原体名と分類学的位置○

病原菌はグラム陰性、大きさは  $0.8\sim 2.6 \times 0.6\sim 1.2 \mu\text{m}$  の両極染色性を示す短桿菌で、アメリカのチェサピーク湾でホワイトパーチが大量死した際の原因菌 (*Pasteurella piscicida*) と同一の細菌であることが明らかにされた。その後、この細菌の分類学的位置が見直され、現在は *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* とされている。

### ○発生時期○

養殖種苗を導入後の6月から7月に、梅雨等の長雨が続く、水温が  $20\sim 25^\circ\text{C}$  前後の時期に発生しやすい。また、当歳魚や越年魚が9月以降の水温が低下する時期に発病することもある。発生当初の昭和40年代は、 $25^\circ\text{C}$  前後が好適発病水温であったが、現在は発病水温域が広がっている。

### ○症状○

生簀内を遊泳中の病魚を見分けるのは難しいが、緩慢遊泳や摂餌不良などの症状が観察されるようになり、朝、生簀の底に死魚が発見されて発病に気付くことが多い。死魚は口と鰓蓋を開け、体色の褪色や黒化が認められる。稚魚では躯幹がややくびれて、腹側に張りがない状態になる。鰓蓋骨接合部の発赤や脱鱗、鰓の貧血や鬱血も観察される。

死魚を剖検すると、脾臓や腎臓に白点(結節)が形成されていることが多い。死因は原因菌が血中で増殖し、血管が栓塞を起こして血流が止まるためといわれている。

### ○診断方法○

**外部観察:** 朝、網底に静止した魚や大量死が観察された場合は、本病が疑われる。前記の発生時期、病魚の症状から推定することも可能である。

解剖して臓器の肥大、萎縮、貧血状態等を観察するとともに、腎臓や脾臓の白点状の結節の有無を調べる。

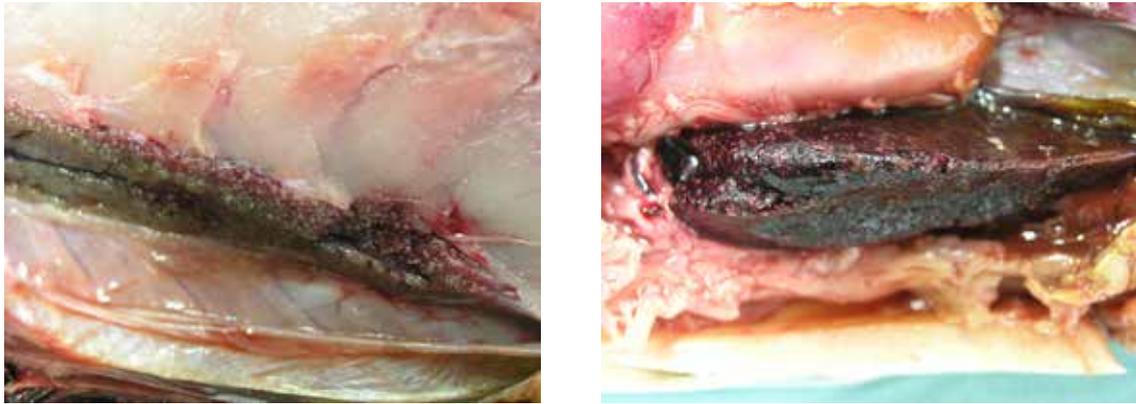


写真2 病魚の腎臓（左）と脾臓（右） 白色の結節がみられる。

**簡易診断：**臓器の貧血、肥大と結節形成を確認し、腎臓や脾臓のスライド塗抹標本またはスタンプ標本を作製してディフ・クイック染色あるいはグラム染色を施し、光学顕微鏡下で細菌を確認する。ディフ・クイック染色では臓器中や貪食細胞中の細菌を、グラム染色ではグラム陰性の短桿菌を確認する。

**細菌検査：**無菌的に採取した腎臓や脾臓片を、2%NaCl加HI寒天培地もしくは2%NaCl加BHI寒天培地に直接塗抹するか、白金耳で臓器を穿刺して培地に塗抹し、25℃で24時間培養して細菌を分離する。細菌分離後、コロニーから白金耳で釣菌し、抗血清によるスライド凝集反応を行って細菌を同定する。なお、急性の場合は臓器に結節を形成しないこともあるので、大量死の場合には類結節症を疑い、臓器の塗抹標本、またはスタンプ標本による細菌の観察と細菌検査による分離細菌の確認を行う必要がある。

## ○対策○

水温が20℃を越え、梅雨等の長雨が続く時期には類結節症の発生に注意する。そのためには、日ごろから魚の行動を観察し、緩慢遊泳魚や死魚の観察、また、必要に応じて解剖検査を実施する。餌からの滲出液が、海水中での類結節症原因菌の生存を助長するともいわれており、感染予防のためには漁場汚染対策も必要である。

死魚から細菌を分離・同定し、感受性の高い類結節症用の薬剤を選定して、決められた用法・用量で通常給餌量の8割程度のMPに薬剤を混合して投与する。現在では類結節症の予防ワクチンが開発され、種苗導入後の発病期前に接種することで予防が可能になったが、未だ完全には普及していない。

なお、類結節症治療薬であるアンピシリン・アモキシシリン等製剤に対する感受性を確認する迅速検査方法として、 $\beta$ ラクタマーゼ法がある。 $\beta$ ラクタマーゼ（耐性因子）を産生する類結節症原因菌は、ペニシリン・アモキシシリンを不活化するため耐性となる。非産生菌は感受性がある（簡易判定法としてセフィナーゼディスクを使用する）。

詳細は「細菌性魚病迅速診断マニュアル」農林水産技術会議事務局・水産庁養殖研究所編を参照。

## 滑走細菌症 (Gliding bacterial disease)

ビブリオ病とともに養殖魚の病気として古くから知られており、稚魚から成魚にいたるまで発病する。この病気は鰓組織に障害を起こし、組織の壊死・欠損や粘液の異常分泌により呼吸機能の障害を併発して死に至る。また、口周辺、体表、鰭等への感染により、出血や皮膚組織の崩壊、糜爛、穴あき、鰭の欠損等の症状を呈し、ビブリオ菌などの感染門戸にもなる。



写真1 病魚の外観 尾柄部の糜爛と鰭の欠損が観察される。

### ○病原体名と分類学的位置○

滑走細菌はその名のとおり *gliding bacteria* と呼ばれ、滑走運動により盛んに動き回る。原因菌はグラム陰性の長桿菌である。従来は粘液細菌類の *Flexibacter maritimus* と呼ばれたが、現在は分類学的位置が変更されて *Tenacibaculum maritimum* と命名されている。

### ○発生時期○

水温が上昇する5月以降に発生することが多く、特に飼育開始後まもない稚魚期や幼魚期は過密養殖になりがちのため、魚体の接触による損傷やストレスにより細菌に対する感受性が高まることで感染する。ハダムシ寄生が多い場合も発生しやすい。また、過密養殖の越年魚や成魚では低水温期でも発病することがある。

### ○症状○

**外部症状：**小型魚では体色が黒化し、口吻部の発赤や糜爛、鰭の先端部の壊死や欠損、体側の体表部のスレ、糜爛、穴あきなどの多様な症状がみられる。成魚でも体表のスレや糜爛、潰瘍、穴あきなどの症状を示すこともある。エラムシ寄生などによって鰓に損傷があると感染しやすく、貧血や鰓組織の壊死・崩壊（鰓腐れ）、粘液の異常分泌などの症状がみられる。



写真2 体表に穴あき症状がみられる。



写真3 口吻部にスレ症状がみられる。



写真4 鰓腐れを呈した鰓。

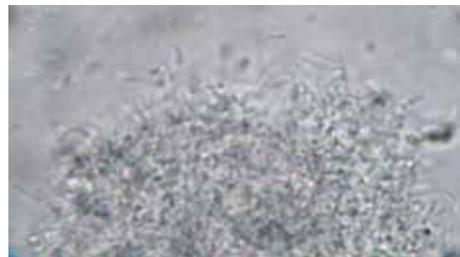


写真5 鰓腐れ部位の鰓弁にみられた長桿菌の菌叢。

### ○診断方法○

**外部診断：**体表のスレ、穴あき、糜爛などの病巣部をスライドグラスにスタンプ、あるいは塗抹して、風乾後、ディフ・クイック染色、グラム染色、あるいはギムザ染色を施して検鏡すると、グラム陰性の長桿菌が容易に観察される。鰓のウエットマウント標本では鰓葉表面に菌集落や、活発に運動する長桿菌が観察される。患部を海水サイトファーガ寒天培地や TCY 寒天培地に塗抹して培養すると、辺縁が樹根状の黄淡色コロニーの原因菌が分離される。

### ○対策○

滑走細菌症のために開発された治療薬はないので、本症発生の主原因である過密養殖を避け、ハダムシの駆除を行うなどの飼育環境の改善が最も有効な対策となる。本症はビブリオ病等の他の細菌病と合併症を起こしていることも多いため、ビブリオ病を治療することによって滑走細菌症の発症もなくなることがある。

## $\alpha$ 溶血性レンサ球菌症 (*Lactococcus garvieae* infection)

1974年(昭和49年)頃に西日本のブリ養殖場で突然発生した病気で、当初、原因菌の形状と生化学的性状からレンサ球菌の一種と考えられ、その溶血性が $\alpha$ 型であったことから $\alpha$ 溶血性レンサ球菌症と呼ばれた。発生当初は死亡率の高い病気であったが、 $\alpha$ 溶血性レンサ球菌症不活化ワクチンが開発されたことにより被害は減少した。

しかし、2012年の夏季以降、西日本の数県において従来の診断用抗血清(抗KG-型血清)に凝集反応を示さない変異株が出現し、当該変異株は既承認ワクチンによる予防効果が低いため、本症が再び増加する傾向にある。



写真1 眼球の白濁、眼窩周辺の発赤、鰓蓋の出血がみられる



写真2 *Lactococcus garvieae* の電子顕微鏡像

### ○病原体名と分類学的位置○

原因菌はグラム陽性で、大きさが  $0.7 \times 1.4 \mu\text{m}$  の二連または連鎖状の球菌であり、 $\alpha$ 溶血性を示すことから当初は *Streptococcus* sp.( $\alpha$ ) と呼ばれたが、その後分類学的位置が変わって腸球菌の一種の *Enterococcus seriolicida* となり、現在は *Lactococcus garvieae* と命名されているが、それまでの経緯から、現在でも $\alpha$ 溶血性レンサ球菌症の病名が使用されている。

2012年の夏季以降、西日本の数県において発生した変異株は、福田らにより *L.garvieae* II型、対して従来株は *L.garvieae* I型として血清型呼称の提案がなされ、養殖現場においてその発生動向が注視されている。光学顕微鏡による形態的な観察では、II型の菌はI型に比べ、菌の径が一回り大きい印象である。

### ○発生時期○

当歳魚(0年魚)では、春から夏にかけて発生するビブリオ病や類結節症が終息する夏から晩秋にかけて発生するが、水温下降期にかけても発病することがある。越年魚では夏季の発生が多いが、冬の低水温期でも発病がみられる。

## ○症状○

**外部症状：**感染初期には体色が黒化することが多い。鰭基部の発赤や潰瘍形成、尾柄部では血膿を含んだ潰瘍が形成される。眼球の突出や出血、角膜の白濁・肥厚、眼窩の出血・充血もみられる。鰓蓋の裏側にも出血や膿瘍が形成されることが多い。

**内部症状：**心臓外膜の炎症や白濁・肥厚がみられる。肝臓、腎臓、脾臓、幽門垂、腸管には出血点が観察される。原因菌は脳にも感染し、脳炎を起こして脳全体が著しい充血症状を呈する。ブリでは視葉から中脳にかけて膿瘍が形成されることがあり、第4脳室で膿瘍が形成されると躯幹が湾曲するため、粘液胞子虫の脳寄生による側湾症と間違えることがある。

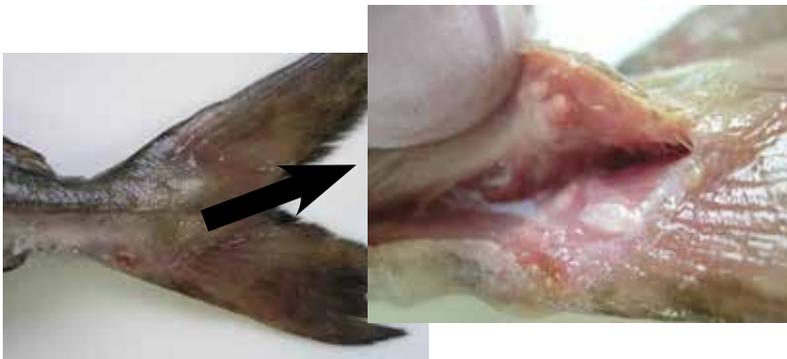


写真3 病魚の尾柄部外観(左)と切開した図。尾柄部に潰瘍がみられ、切開すると膿瘍の形成がみられる。

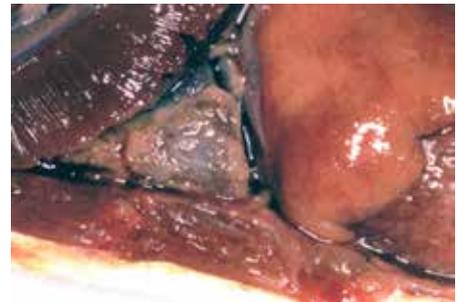


写真4 病魚の心臓。心臓外膜の炎症がみられる。

## ○診断方法○

**外部観察：**体色の黒化、眼球の突出や出血・白濁、眼窩の充血などの眼の異常、鰭基部の発赤や潰瘍形成の有無を観察する。

**内部観察：**開腹して内臓諸器官の異常の有無を観察する。特に腎臓と脾臓の肥大、心臓については心外膜炎の有無、脳については脳炎の状況を観察する。

**簡易診断：**スライドグラスに脳、腎臓または脾臓のスタンプ標本を作製し、ディフ・クイック染色あるいはグラム染色を施して、二連もしくはレンサ状の球菌の有無を確認する。

**細菌検査：**各臓器あるいは潰瘍患部から BHI 寒天培地、HI 寒天培地、0.5% グルコース加 HI 寒天培地などに塗抹し、25℃、24 時間培養して細菌分離を行う。菌の分離培養後、抗 KG ー型血清凝集タイプと抗 KG ー型血清非凝集タイプのそれぞれの抗血清によるスライド凝集反応を行って *Lactococcus garvieae* の血清型を識別する。なお、PCR 法による確定診断法も開発されている。

## ○対策○

レンサ球菌症治療薬として開発された抗生物質および合成抗菌剤がある。原因細菌を分離後、

定法に従って薬剤感受性試験を実施し、感受性のある薬剤を選択して投薬治療を行う。原因菌は多剤耐性となりやすいため、投薬効果が得られないこともある。近年、不活化ワクチンの開発・普及により投薬機会が減少した結果、耐性菌も減少し、投薬効果も現れている。この病気は、鮮度の低下した餌や栄養バランスの悪い餌の投与により発病が助長される傾向がある。治療効果を高めるためには、投与する飼・餌料の鮮度管理と栄養バランスにも気をつけることが必要である。投薬に際しては決められた用法・用量で、他の細菌病の治療と同様に通常の8割程度のMPに薬剤を均一に混合して投与する。

### ○予防対策○

栄養バランスのとれた鮮度のよい餌の投与が大事である。また、細菌感染の門戸となる寄生虫対策も十分心がける必要がある。現在は $\alpha$ 溶血性レンサ球菌症不活化ワクチンの接種により予防が可能である。2016年にはI型とII型を含むワクチンが承認され、現場における普及および効果が期待されている。

## 新型レンサ球菌症 (*Streptococcus dysgalactiae* infection)

2002年（平成14年）頃から西日本の養殖場において、越年魚や出荷前のカンパチ3歳魚を主体に、尾鰭の発赤と尾柄部の潰瘍を特徴とする病気が発生し、養殖漁家に大きな損害をもたらした。

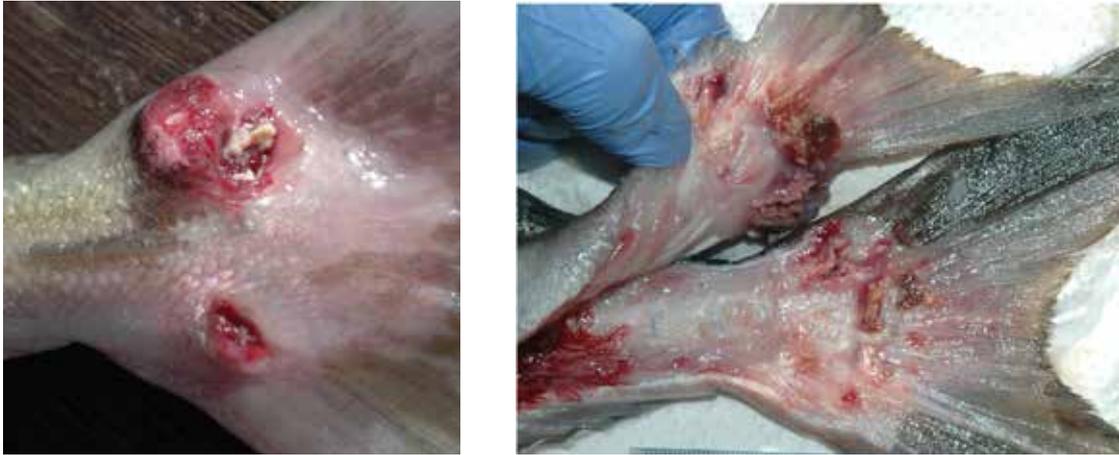


写真1 病魚の尾柄部外観（左）と切開した図。尾柄部に潰瘍がみられ、切開すると膿瘍の形成がみられる。



写真2 *Streptococcus dysgalactiae* の電子顕微鏡像

### ○病原体名と分類学的位置○

原因菌はグラム陽性の連鎖球菌の *Streptococcus dysgalactiae* である。本菌は  $\beta$  溶血性を示し、ランスフィールドC群の抗血清に反応することから、C群レンサ球菌症とも呼ばれている。

### ○発生時期○

主に越年魚が感染する病気で、当初は水温の上昇する5月頃から病魚が観察されたが、近年では水温の低下する10月頃でも越年魚、2歳魚、3歳魚に発生し、周年化の傾向が強くなっている。出荷前の3歳魚に発生すると経済的な損失が大きい。

### ○症状○

病魚が大量に発生することは少なく、寄生虫の駆除作業中や出荷作業中に発見され、多い場合で1日数尾程度の病魚が見つかる。尾柄部の糜爛、潰瘍形成が特徴であり、 $\alpha$  溶血性レンサ球菌症にみられる眼球異常や、その他の症状はほとんどみられず、脳から細菌が分離されることは少ない。

## ○診断方法○

**外部診断：**尾柄部の潰瘍形成が特徴であり、そのため遊泳能力が低下し、網生簀の周辺部を力なく遊泳する個体がみられる。

**細菌検査：**潰瘍患部から、2% NaCl 加 BHI 寒天培地あるいは 2% NaCl 加 HI 寒天培地に塗抹して細菌を分離し、グラム陽性の連鎖球菌を確認する。腎臓あるいは脾臓からも同様の細菌が分離される。この細菌の選択培地にはクーマシー・ブリリアント・ブルー（CBB）含有の寒天培地があり、発育したコロニーが青色に染まることから判断することができる。

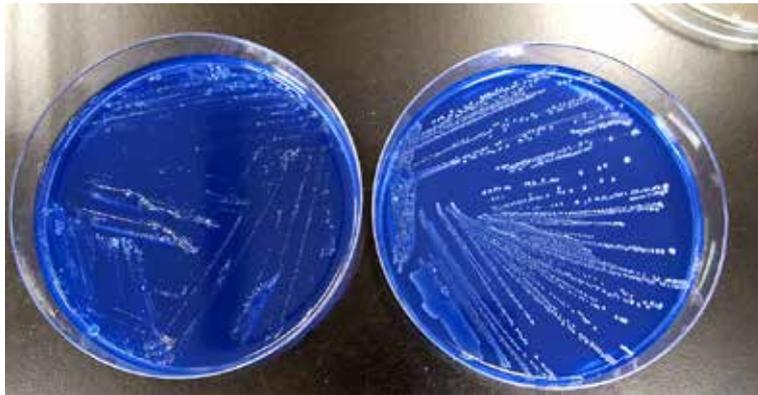


写真3 クーマシー・ブリリアント・ブルー（CBB）含有培地で培養した *Streptococcus dysgalactiae* (左) と *Lactococcus garvieae* (右)。*S. dysgalactiae* は青い、*Lactococcus garvieae* は白いコロニーを形成するため、判別できる。

## ○対策○

発症した病魚の治療は困難である。直後に出荷をひかえていない越年魚や2歳魚などの群で原因菌が確認された場合、分離菌の薬剤感受性試験を実施し、感受性のある抗菌剤を選択して投薬治療を行い、感染の拡大を防ぐ。また、病魚からの感染を防ぐために、病魚は適宜取り上げて処分することも大切で、特に治療投薬ができない出荷時期の成魚に対しては重要である。

## ノカルジア症 (*Nocardiosis*)

ブリ類の養殖が盛んになった1966年(昭和41年)頃から、秋から冬にかけて体表の潰瘍や膿瘍の形成、腎臓や脾臓などの内臓諸器官に白い粟粒状結節の形成を特徴とする病気が発生した。また、鰓に膿瘍結節を形成する事例も報告されている。この病気は抗酸菌の一種であるノカルジア菌が原因であり、薬剤による治療効果が少ないことから、産業的にも重要な病気の一つとなっている。



写真1 膿瘍の形成による体表の凹凸。



写真2 鰓に形成された結節。

### ○病原体名と分類学的位置○

病原菌はグラム陽性非運動性の長桿菌(糸状細菌)で、菌体の幅は0.5~1.0  $\mu\text{m}$ である。臓器の病巣部には分枝状の糸状菌が観察される。原因菌は弱い抗酸性を示し、カンパチから分離されたことから当初は *Nocardia kampachi* と命名されたが、その後 *Nocardia seriolae* に変更され、現在に至っている。小川培地でよく発育するが、BHI 寒天培地、7H11 寒天培地などでも分離培養できる。中国からの輸入カンパチ由来と考えられているノカルジア菌は  $\alpha$ -グルコシダーゼ陽性であり、従来型は陰性であることから異なるタイプであることが明らかになっている。

### ○発生時期○

従来型のノカルジア症は、9月以降、水温が低下する晩秋から初冬にかけて発生し、水温が15~16℃に低下する時期には終息するが、海域によっては越年し、2月頃まで発生することがある。中国由来と考えられているノカルジア菌は、カンパチ種苗が搬入された後、水温が25℃前後になる6月以降に発生する。

### ○症状○

**外部症状：**体表の赤斑症状や皮下に数mm程度の膿瘍が形成され、部分的に瘤状に膨隆して切開すると膿汁が出てくる(膿瘍型)。また、口吻部の糜爛や潰瘍(口紅型)、鰓弓部から鰓葉にかけて膿瘍結節(鰓結節型)が観察されることもある。

**内部症状：**幽門垂や消化管に腹膜が癒着し、腎臓や脾臓が肥大するとともに、1mm以下の小さなものから3mm程度の大きなものまでさまざまな白点状の結節が形成される。

結節は癒着した腹膜、消化管、肝臓、心臓にも観察される。

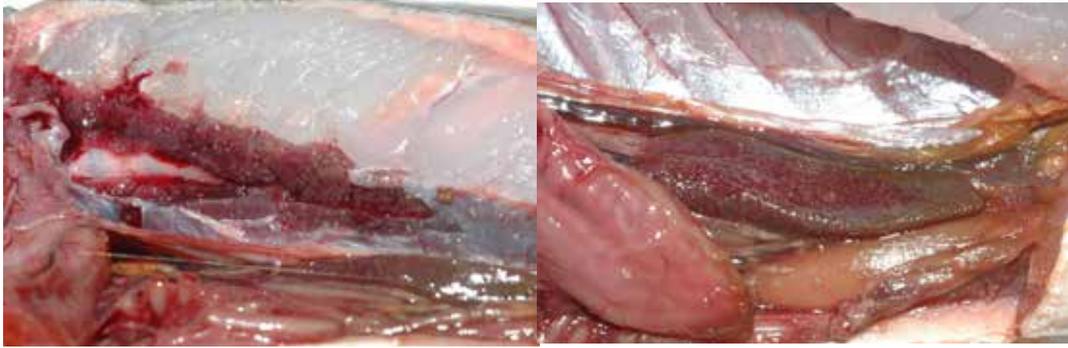


写真3 病魚の腎臓(左)と脾臓(右)。結節がみられる。

### ○診断方法○

**外部診断：**外部症状（体表の膨隆や膿瘍形成、鰓の結節形成）によってノカルジア症を疑う。

**簡易診断：**体表の膨隆患部を切開して膿汁を、あるいは結節の形成された脾臓や腎臓をスライドグラスに塗抹もしくはスタンプした後に乾燥し、チール・ネールゼン染色（抗酸菌染色）、またはグラム染色を施して光学顕微鏡で観察する。チール・ネールゼン染色では赤色の分枝した糸状菌が、グラム染色ではグラム陽性の糸状菌が観察される。

### ○対策○

病原菌は海水中に溶出した投与餌料の浸出液中で生残することができるので、生餌の投与は控えることが感染防止につながる。また、感染門戸は体表の傷や消化管の炎症などであることから、適正な飼育管理を行うとともに、餌の管理や寄生虫の駆除作業などによって、魚体に損傷を与えないよう注意する。発病が6月以降の場合は $\alpha$ グルコシダーゼ陽性菌が、9月以降、冬季までは従来型のノカルジア症が発症し、ほぼ周年ノカルジア症はみられるので飼育管理は重要である。ノカルジア症用に承認された薬剤はスルファモノメトキシソーダ製剤のみであり、発病時期によって効能が異なることがあるので注意が必要である。

## 抗酸菌症 (Mycobacterium infection)

本病は1985年(昭和60年)の9月に、高知県宿毛湾の養殖ブリで初めて確認された病気であるが、1986年には西日本各地の養殖場で流行するようになった。それ以来、毎年水温が最も高くなる夏の終わり頃から初冬にかけて流行していたが、1990年頃からほとんどみられなくなった。しかし、1998年頃から養殖ブリで再度多発するようになり注目されている。なお、カンパチでの発生も少数ではあるが確認されている。



写真1 病魚の腎臓と脾臓には結節(ノカルジア症より粒が大きい)がみられる。



写真2 鰓弁のウエットマウント標本像。黒点がみられる。

### ○病原体名と分類学的位置○

抗酸菌の1種(*Mycobacterium* sp.)が原因である。これまで多くの抗酸菌が魚類から報告されているが、魚類の病原菌として国際的に認められている種は *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* の3種である。ただし、本病の原因種については諸説があり、人畜共通感染である *M. marinum* ではなく、*M. pseudoshottsii* との報告もある。

### ○発生時期○

夏から秋の高水温時に発生する。最近では慢性化して、ブリにおいては冬期でも散発的に発生がみられることがある。

### ○症状○

**外部症状：**病状の進行した病魚では、腹部が著しく膨満し、肛門が発赤して大きく開口するのが特徴である。

**内部症状：**解剖的には腹腔内に血液の混じった腹水が貯留し、腹腔壁や各臓器表面が血糊で覆われる。脾臓と腎臓は肥大し、それらの臓器には無数の粟粒状結節が形成される。また各臓器の癒着がみられる。

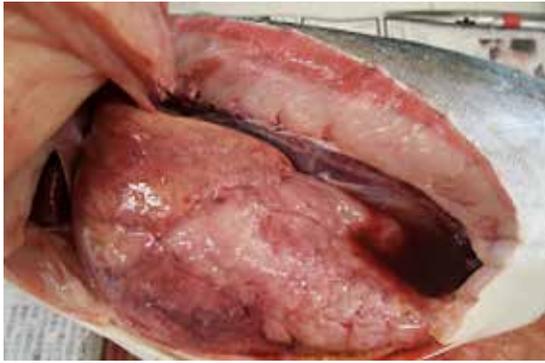


写真3 腹水の貯留と肝臓のうっ血がみられる。

## ○診断方法○

**簡易診断法1：**鰓のウェットマウント標本を40倍程度の低倍率で観察して、鰓の組織中に散在している多数の小黑(褐色)点を確認する。

**簡易診断法2：**脾臓のスタンプ標本を作製して抗酸菌染色を施し、光学顕微鏡で観察する。本疾病に特徴的な短桿菌を確認する。

## ○対策○

現状では効果・使用のできる薬剤等がないため、病死魚を早期に発見して除去し、伝播・拡大を最小限に抑えることが肝要である。

# エピテリオシスチス病 (Epitheliocystis disease)

本病は西日本各地のカンパチ養殖場において稚魚期に散発的に発生している。近年、愛媛県では本病の発生が増加傾向にあり、特に2010年は数日間で累積死亡率が40%を超えるような重篤事例もみられるなど、被害の拡大が懸念されている。

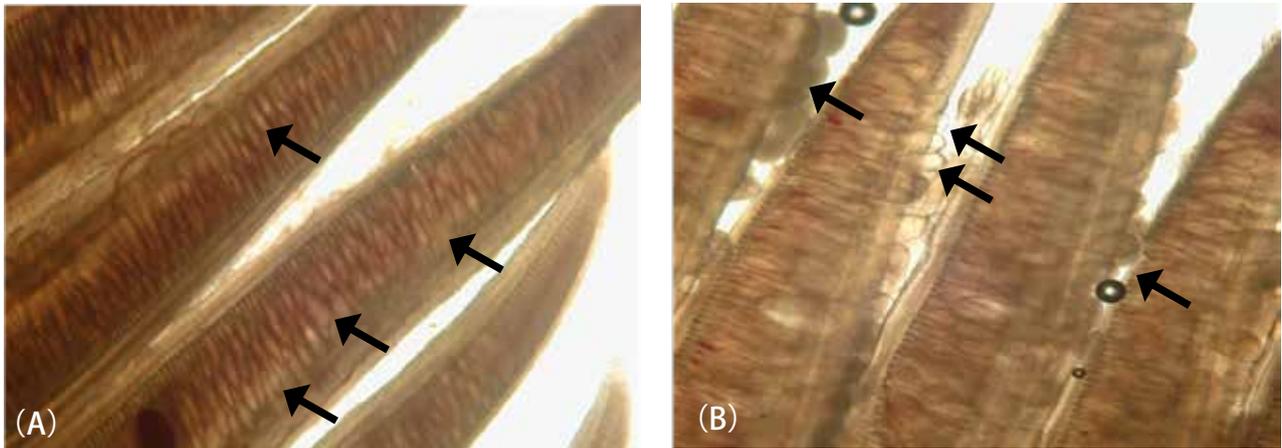


写真1 本病に感染したカンパチ鰓の顕微鏡写真

(A) 鰓弁の肥大が顕著にみられる。(B) 重篤なものでは、シストの集塊が鰓弁の外にもみられる。矢印:シスト

## ○病原体名と分類学的位置○

病原体はクラミジア類に近いものと考えられている。大量死を引き起こしたカンパチの鰓を検鏡すると、シスト中の細菌は細胞が小さく、光学顕微鏡では解像されがたいことから、マダイのエピテリオシスチス原因菌と同じか、それに類縁の細菌によるものと推定されている。

## ○発生時期○

5～8月にかけて発生し、盛期は7月である。

## ○症状○

**外部症状:**異常遊泳はみられないが、寄生虫消毒時に死亡が増加するケースが観察されている。

鰓に顕著な貧血症状は認められないが、鰓葉は過剰な粘液に覆われていることが多い。ウェットマウント法により一次鰓弁を検鏡すると、鰓弁の肥大が顕著であり、肥大部にシスト(矢印)が多数観察される。鰓の組織切片標本(HE染色)を観察すると、鰓弁上皮の肥厚や癒合が認められ、細菌のシスト(矢印)も観察される。

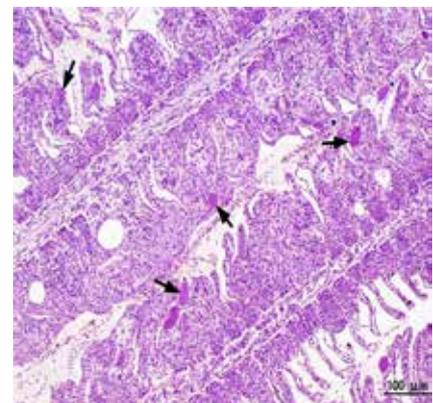


写真2 鰓にみられる顕著な病変(HE染色)

鰓弁上皮が肥厚し、癒合しているが、細菌のシスト(矢印)は比較的少ない。

## ○診断方法○

ウェットマウント法により鰓を検鏡し、鰓弁の肥大を確認するとともに、肥大部のシストの有無を確認する。シストは無色で半透明の大小不同の円形物として認められる。より信頼性の高い診断を行うためには、鰓の組織切片標本を作製し、HE染色あるいはギムザ染色を施し、シストの構造を観察する必要がある。確定診断のためには感染組織の電子顕微鏡観察が必要である。

## ○対策○

本病に処方できる承認薬はない。

## イクチオホヌス症 (Ichthyophonosis)

春に中国からカンパチ種苗が輸入されて1ヶ月が経過する頃、やや腹部が膨満し、体色が褪色して、体表につやのない種苗が観察される。開腹すると腹腔には腹水が貯留し、内臓器官が膨潤し、臓器の内外に粒状の構造物が観察されることがある。

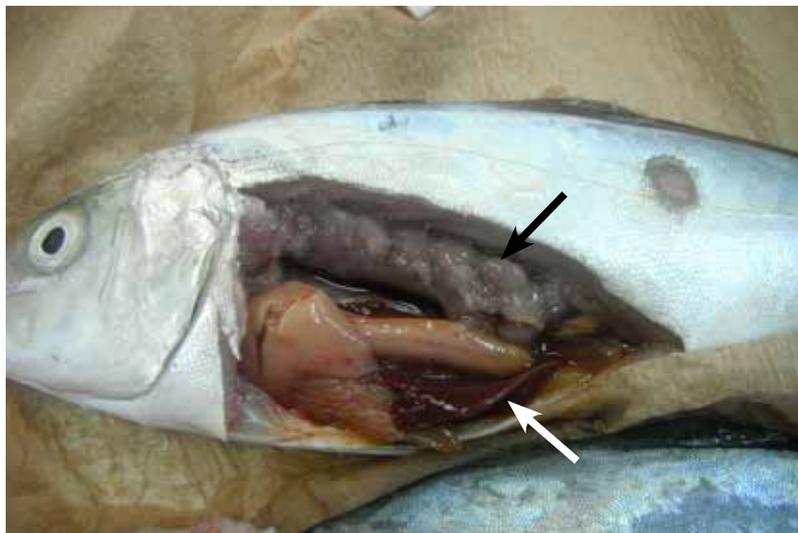


写真1 イクチオホヌス症病魚の解剖像。腎臓と脾臓の腫大がみられる。

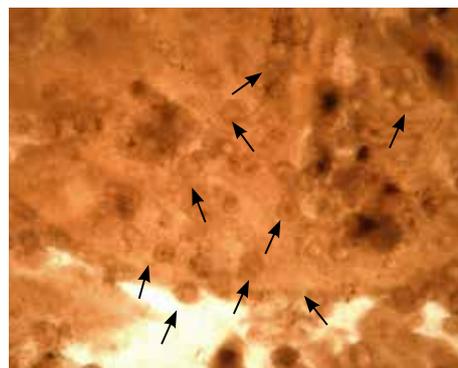


写真2 腎臓組織中の多核球状体（ウエットマウント標本）

### ○病原体名と分類学的位置○

病原体は *Ichthyophonus hoferi* であり、かつては真菌類の接合菌の一種とされていたが、現在は、オピストコンタ（後方鞭毛類）、イクチオスポア綱に属する原虫に分類されている。カンパチだけでなくブリ等のさまざまな魚種で感染が報告されている。通常、魚体内では、直径が  $140 \mu\text{m}$  ほどの厚い細胞壁を持つ多核球状体として存在する。これが発芽して菌糸状の糸状体となり、内部に孢子（糸状体孢子）が形成される。孢子は血流によって宿主体内各所に運ばれ、そこで発育し、再び多核球状体となる。

### ○発生時期○

この病気の発症時期は水温が  $20^{\circ}\text{C}$  以下である。ブリではモジャコの餌付けが終了し、順調に魚体が成長し始める頃に発症し、類結節症の発症が懸念されはじめる時期と重なることから、類結節症と見誤ることがある。カンパチでも中国から輸入後 1~2 ヶ月が経過する頃に発症する。やがて水温が  $20^{\circ}\text{C}$  以上に上昇し、本格的に類結節症が発症する時期には終息する。

### ○症状○

体色が褪色して体表につやがなくなり、しばしば腹部の膨満がみられる。開腹すると腎臓、脾臓は腫大し、肝臓その他の臓器とも膨潤している。臓器の表面は粒状物が観察され、一見結節のようにみえる。腹腔内には漿液性の腹水が貯留することも多い。外観症状が類似する病気として、ノカルジア症、類結節症があげられる。

## ○診断方法○

**生標本検査：**膨潤、腫大した臓器の一部をスライドグラスに取り、カバーグラスで上から圧平し光学顕微鏡の低倍率で観察する。球形の構造物（多核球状体）やそれから発芽した糸状体が多数観察される。

**確定診断法：**患部をチオグリコレート培地で培養し、糸状体やその内部の胞子の形成を確認する。

**病理組織学的検査：**臓器患部の組織標本を光学顕微鏡で観察し、多核球状体を確認する。

## ○対策○

イクチオホヌス症の病原体は生餌から経口的に感染するといわれている。そのため、20℃以下の水温の時期に生餌の給与を控える。ブリ稚魚の場合、天然種苗の餌付けの際に、生餌のミンチ肉を用いることが多いため、条件がそろえば感染個体が増加することがある。中国産カンパチ種苗では、現地での餌付けの状況によって後の発症が左右される。人工種苗では生物餌料を投与後、EP等の配合飼料で飼育されるため、感染機会はほとんどない。MPを投与する場合でも、配合飼料の比率を高めることが有効である。

# 脳微胞子虫症 (Microsporidian encephalomyelitis)

中国海南島から輸入されたカンパチ幼魚がキリキリ舞い状態で泳ぐという、特徴的な病徴を示すことが知られていた。長く原因が不明であったが、脳内に寄生するある種の微胞子虫の寄生が原因とほぼ特定された。



写真1 キリキリ舞い症状を示すカンパチ

## ○病原体と分類学的位置○

原因寄生虫は微胞子虫門に属し、小サブユニット rDNA 領域の遺伝子解析の結果では、キアンコウの神経系に寄生する *Spraguea* 属微胞子虫にもっとも近縁とされている。胞子は塊で中枢神経系（脳および脊髄）に寄生している。組織切片上では、細長い洋梨型で長径 2.4-2.8  $\mu$  m × 短径 1.4-1.9  $\mu$  m の胞子と、ほぼ球形で直径 2.2-2.5  $\mu$  m の胞子の 2 型が観察されている。

## ○発生時期○

平成 20 年のケースでは、輸入直後の 5 月中旬から下旬の、水温が 20-23℃ の時期に発生したが、自然終息した。

## ○症状○

**外部症状：**頭部と鰭の先端にスレがみられることがある。生簀網に衝突したために生じたと考えられる。一方、キリキリ舞いを示しても、外観にまったく病徴がみられない個体もあった。



写真2 キリキリ舞い症状を示したカンパチ。左：生簀網に衝突したために生じたと考えられる頭部と鰭の先端にスレを持つカンパチ。右：外観には特に病徴を示さないカンパチ。

**内部症状：**特に特徴はない。

**組織病変：**延髄を中心とする中枢神経系に炎症が認められる。

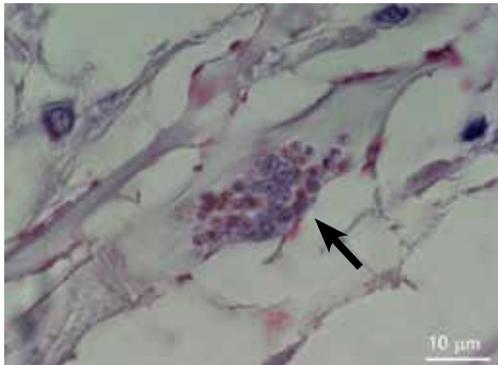


写真3 キリキリ舞い症状を示したカンパチの脳組織像 (H&E 染色)。微胞子虫の孢子 (矢印) が観察される。

### ○診断方法○

**簡易診断法 1：**病魚はキリキリ舞い状態を示す。

**簡易診断法 2：**病魚の脳または脊髄の組織切片を観察して、孢子や孢子芽細胞を確認する。

**確定診断法：**中枢神経系組織から抽出した DNA をテンプレートとして、本病原微胞子虫の特異的プライマーを用いた PCR 法により検出する。

Forward Primer: Kanmic-172 (5'-GCA-TGT-GAT-GAG-AAC-GTA-TGT-GTA-GG-3')

Reverse Primer: Kanmic-569r (5'-CTC-CTC-ATT-CTG-AAC-TCT-TCT-CGT-TC-3')

反応条件：98° C (10 秒) , 55° C (30 秒) and 72° C (1 分) for 30 cycles

PCR 産物：398 bp

### ○対策○

生活環が不明であり、治療薬も開発されていない。輸入前の中国ですでに感染していることから、対策は立っていない。発生した事例では、同一ロットの 10%が死亡した後、終息した。

## べこ病 (Beko disease)

微孢子虫が感染することにより、体表が不規則な凹凸を呈する病気である。



写真1 重篤寄生魚の外観（左）と解剖所見（右）（魚はブリ）

### ○病原体と分類学的位置○

微孢子虫門に属する *Microsporidium seriolae* が原因である。体側筋肉内に白色のシストを形成する。シストは不定形で多くは細長く、大きい物では 1 cm を超えるものもある。シストは無数の孢子（長径 2.9-3.7  $\mu$  m、短径 1.9-2.4  $\mu$  m）を包含している。孢子形成を終えたシストは崩壊し、周囲の筋肉組織が融解するため、魚は凸凹の外観を呈する。軽度の寄生では魚の成長につれてシストは消失していくが、重度寄生を受けた魚では一部が残存する。何らかの中間宿主の存在が示唆されているが、特定されていない。ブリにもみられる。

### ○発生時期○

寄生は幼稚魚期に起こると推定されている。シストは次第に萎縮していくが、長期間筋肉内に残存する。したがって、寄生は 0 歳の夏にもっとも顕著であるが、魚が成長すると、シストは季節に関係なく検出される。

### ○症状○

**外部症状：**シスト数の少ない魚では、外観的な異常はみられない。重度の寄生を受けた魚では不規則な凸凹の外観を呈する。

**内部症状：**体側筋肉に白く不定形なシストが確認できる。その他の組織・器官には異常はみられない。

**組織病変：**組織像では、シストは大小のシストが集まったものであることがわかる。シストは宿主組織に被包され、発育中のシストでは辺縁部で活発な分裂増殖、中心部に孢子がみられる。発育が終了すると、シストは崩壊し、孢子は宿主細胞に貪食される結果、シストは萎縮する。

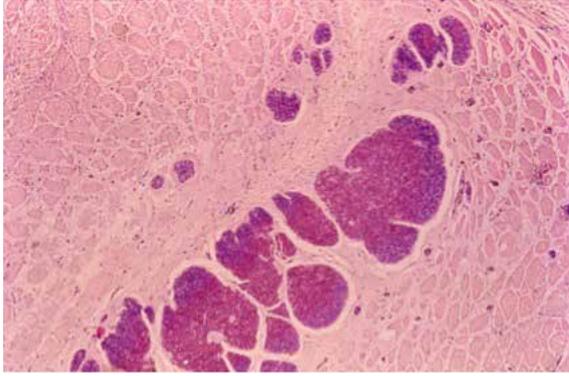


写真2 発育中のシストを含む患部。  
(ヘマトキシリン・エオシン染色)

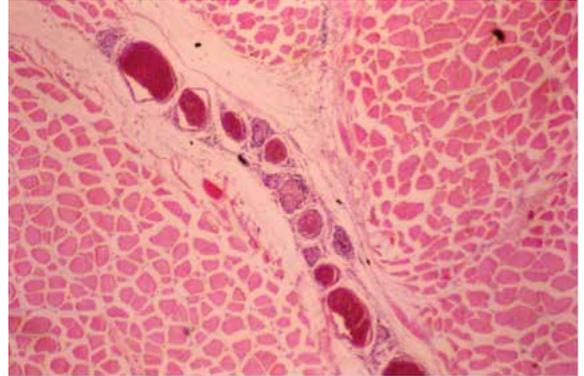


写真3 発育を終了し、萎縮したシスト。  
(ヘマトキシリン・エオシン染色)

### ○診断方法○

**簡易診断法：**解剖して、筋肉組織に白色のシストがあれば、その一部を取り、シストをつぶしてウェットマウントで胞子を確認する。胞子数が少ない場合や宿主の組織から胞子を検出する場合は、患部の塗抹標本を Uvitex 2B で染色し、紫外光で蛍光顕微鏡観察すると、胞子が青い蛍光を発して観察しやすい。類似の寄生虫は知られていない。

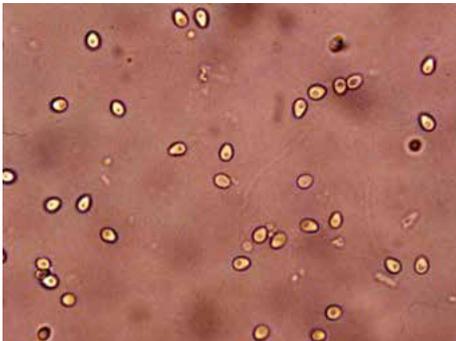


写真4 胞子のウェットマウント標本の顕微鏡写真。



写真5 Uvitex 2B 染色を施した胞子の蛍光顕微鏡写真

### ○対策○

生活環が不明であるため、従来は感染魚からシストが消滅するのを待つ以外なかった。最近、アルベンダゾールやフェバンテルなどの化学物質が発病を予防する効果があると発表されたが、まだ開発途上である。

## 白点病 (White spot disease)

秋、養殖場で白点虫の大量寄生が起こると、体表が粉をふいたように白くなり、遊泳が不活発になることがある。こうした状態になると体表上皮は剥離を起こし、きわめて致死性が高い。



写真1 カンパチ罹病魚の体表。皮膚と眼球に白点虫の寄生がみられる。

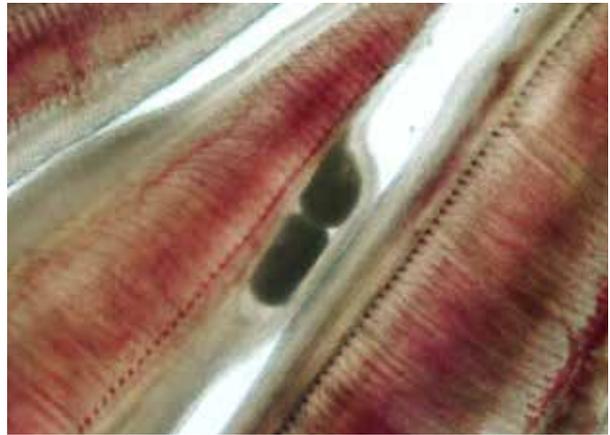


写真2 カンパチ罹病魚の鰓のウエットマウント標本像。鰓弁上皮組織内に寄生したトロホント。

### ○病原体と分類学的位置○

繊毛虫門前口綱海産白点虫科に属する *Cryptocaryon irritans* (和名はシオミズハクテンチュウ) が原因の寄生虫である。体表や鰓の上皮組織内に寄生する。長球形で長径は最大で 0.5 mm 程度に達する。その後、魚体を離れ、水底でシストを形成し、分裂増殖して、感染期の仔虫セロントが遊出する。宿主特異性は低い。

### ○発生時期○

養殖場では、秋口に底層よりも表層の水温が低くなって、海水の垂直移動が起こった時や、台風で海水の攪拌が起こった後にしばしば白点病の大発生がある。これは海水の移動によって水底のシストからセロントの遊出が促進されたためと考えられる。

### ○症状○

**外部症状:** 寄生が急激に進行すると、魚の行動が緩慢になったり、突然餌を摂らなくなったり、という変化が現れることが多い。また、上皮増生によって、鰓や皮膚が肥厚する。多量の粘液の分泌もみられる。

**内部症状:** 鰓、皮膚、鱗の寄生部位を除けば、異常は認められない。

**組織病変:** 寄生部位の鰓や皮膚では、寄生刺激によって上皮増生がみられる。寄生が急激に起こった場合は、上皮剥離を起こすことがあり、浸透圧調節機能が破壊され、呼吸障害も伴って致命的になる。

## ○診断方法○

**簡易診断法:**鰓や皮膚の上皮を掻き取って、実体顕微鏡で観察し、繊毛運動する虫体を確認する。

## ○対策○

カンパチに使用できる水産用医薬品はない。養殖場で寄生を確認した場合、生簀を潮通しのよい海面に移動させることが有効な対策である。

## 奄美クドア症 (Kudoosis amami)

鹿児島県奄美地方と沖縄県の一部の海域でのみ発生がみられる風土病である。寄生を受け魚は商品価値を失うので、発生海域では養殖ができない。もともとブリの寄生虫病として知られていたが、カンパチも同様に感染する。



写真1 アマミクドア罹病カンパチの解剖図。  
体側筋中にシストが多数がみられる。

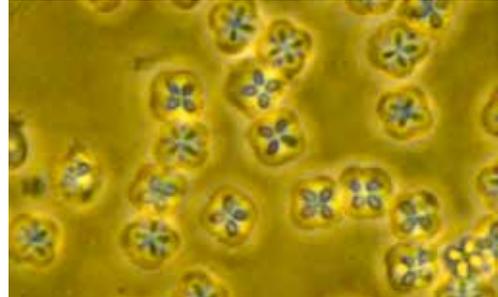


写真2 奄美クドア胞子のウェットマウント標本  
(位相差顕微鏡写真)。4個の極嚢が明瞭に観察される。

### ○病原体と分類学的位置○

病原体はミクソゾア門粘液胞子虫綱多核目に分類される奄美クドア *Kudoa amamiensis* である。筋肉に最大で数 mm に達するシストを形成する。奄美と沖縄の一部の海域に限って感染がみられる。生活環に關与する無脊椎動物(交互宿主)は特定されていない。感染後、シストが可視大に成長するのに3カ月を要するとされる。魚は年齢に關係なく寄生を受ける。

### ○発生時期○

夏から秋にかけて魚は感染を受けることが経験的に知られているが、そのほかの季節にも感染が起こるかは不明である。いったん形成されたシストは1年以上経過しても消滅しない。

### ○症状○

**外部症状:** 目立った病徴は認められない。重度の寄生魚では皮膚や鰭にシストがみられることがある。

**内部症状:** 体側筋肉に可視大の白色シストがみられる。

### ○診断方法○

**簡易診断法:** 筋肉組織に可視大の白色シストを確認する。筋肉組織以外には寄生しない。

**確定診断法:** nested PCR や胞子を抗原としたウサギ抗血清による間接蛍光抗体法が開発されている。特に nested PCR によって、まだ可視大にシストが成長していない、感染1ヶ月の段階での早期検出が可能である。

## ○対策○

生活環が不明であり、発生海域での養殖を避けることが第一である。ただし、ブリの陸上養殖においては、用水を紫外線照射することで感染を防除できたとの報告がある。

## 心臓クドア症 (*Kudoa shiomitsui* infection)

無数のシストが囲心腔に集積することがあるが、目に見える害作用は確認されていない。

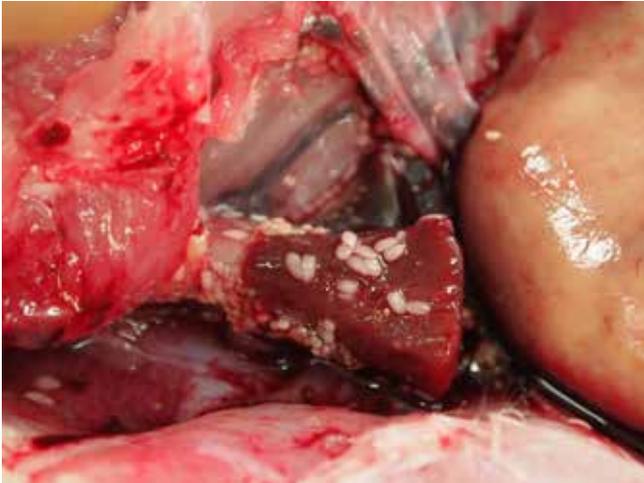


写真1 カンパチの囲心腔内に形成されたシスト

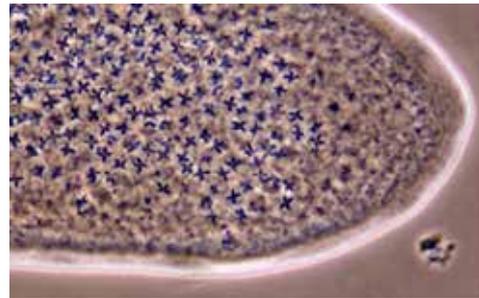


写真2 シストのウェットマウント標本  
(位相差顕微鏡写真)

### ○病原体と分類学的位置○

病原体はミクソゾア門粘液胞子虫綱多核目に分類される *Kudoa shiomitsui* である。囲心腔に楕円形のシストを形成する。害作用は不明である。生活環に關与する無脊椎動物（交互宿主）は特定されていない。多くの海産魚に寄生することが知られている。魚は年齢に關係なく寄生を受ける。

### ○発生時期○

シストは周年みられる。

### ○症状○

外部症状：特に異常はみられない。

内部症状：囲心腔内にしばしば無数のシストが認められる。

組織病変：検討されていない。

### ○診断方法○

簡易診断法：囲心腔にシストを確認した場合、ウェットマウント標本で孢子を確認する。

### ○対策○

生活環が不明、治療薬も開発されていないことから、対策は立てられていない。



## ハダムシ（ベネデニア）症 (*Benedenia seriolae* infection)

ブリ養殖が始まって以来、知られている寄生虫病であり。ブリハダムシ症とも呼ばれる。ブリにも寄生するが、経験的にカンパチのほうが寄生を受けやすいとされる。対策はいくつかあるが、寄生を受けても免疫ができないため、駆虫を繰り返す必要があり、養殖業者の負担は大きい。



写真1 体表や眼球に寄生する *Benedenia seriolae*



写真2 寄生によって生じた皮膚のびらんと潰瘍

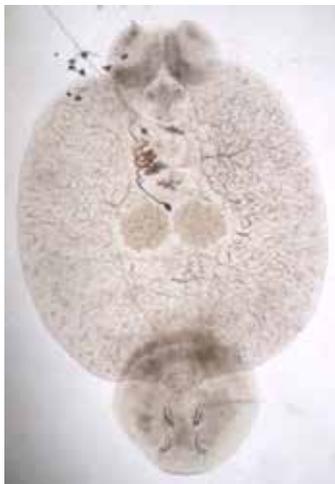


写真3 *Benedenia seriolae*



写真4 *Benedenia seriolae* の前端部。吸盤の間（矢印部）が盛り上がるのが特徴。

### ○病原体と分類学的位置○

扁形動物門単生綱カプサラ科に属する。和名はブリハダムシ、学名は *Benedenia seriolae* という。体は扁平な小判形で、成虫の体長は 5-12 mm に達する。後端の固着盤と前端の 1 対の吸盤によって宿主の皮膚に吸着し、上皮を摂食する。ブリ属魚類（ブリ、カンパチ、ヒラマサ、ヒレナガカンパチ）に寄生する。他のハダムシ、*Neobenedeniagirellae* との混合寄生も起こるため、両種の鑑別が必要となることがある。

## ○発生時期○

寄生は周年みられるが、水温 29℃が寄生の高温限界とされる。

## ○症状○

**外部症状：**虫体は透明のため、網生簀内では確認しにくい。寄生部位周辺の皮膚が白く変色していることが多い。取り上げられた魚では、寄生部位周辺の皮膚は食害や寄生によって皮膚のびらん、潰瘍が認められる。出血していることもある。

**内部症状：**特に認められない。

## ○診断方法○

**簡易診断法：**虫体を傷つけないように魚体から採集して、その形態を観察する。*Neobenedenia girellae* と混合寄生している場合があるが、*B. seriolae* では前端の 1 対の吸盤の間の部分が盛り上がるか、平らに見えるのに対し、*N. girellae* では同じ部分がへこんで見えることで簡易鑑別が可能である。寄生を受けた魚は虫を落とそうとするためか、網地に体をこすりつけるような行動をとることがある。

**確定診断法：**AFA などを用いて圧平固定して、染色標本作製し、膻の存在を確認する。

## ○対策○

魚を淡水に 5-10 分間浸漬する淡水浴が行われる。また、水産用医薬品として、過酸化水素を有効成分とする薬浴剤、プラジクアンテルを主成分とする経口投与剤がある。再寄生を受けるので、駆虫を繰り返す必要がある。虫卵は 0.1~0.2mm の四面体を呈し、一端に備わるフィラメントによって、生簀網に付着する。そのため、駆虫時には網生簀も交換することが有効である。

## ハダムシ（ネオベネデニア）症 (*Neobenedeniagirellae* infection)

1990年代からカンパチや他の養殖魚に寄生して被害を与えるようになった外来のハダムシである。淡水浴が有効であるが、すぐに再寄生するため、繰り返し駆虫する必要がある。



写真1 ハダムシが寄生している輸入カンパチ種苗（ホルマリン固定標本）



写真2 *Neobenedenia girellae*



写真3 虫体の前端部。吸盤の間（矢印部）が凹むのが特徴。

### ○病原体と分類学的位置○

扁形動物門、単生綱カプサラ科に属する。学名は *Neobenedenia girellae*。体は扁平な小判形で、成虫の体長は4-6 mmほどで、*Benedenia seriola* よりはかなり小型である。後端の固着盤と前端の1対の吸盤によって宿主の皮膚に吸着し、上皮を摂食する。中国から種苗として輸入されたカンパチとともに日本に持ち込まれた。カンパチ以外に多くの海産魚にも寄生する。他のハダムシ、*B. seriola* との混合寄生も起こるため、両種の鑑別が必要となることがある。

## ○発生時期○

本来、亜熱帯水域の魚に寄生するため、冬の低水温期には寄生が少ない傾向がある。

## ○症状○

**外部症状：**取り上げられた魚では、寄生部位周辺は食害や寄生によって皮膚のびらん、潰瘍が認められる。出血していることもある。

**内部症状：**特に認められない

## ○診断方法○

**簡易診断法：**虫体を傷つけないように魚体から採集して、その形態を確認する。*Benedenia seriolae* と混合寄生している場合があるが、本種では前端の1対の吸盤の部分へこんで見えるのに対し、*B. seriolae* では同じ部分が盛り上がるか、平らに見えることで簡易鑑別が可能である。

**確定診断法：**本種の属の特徴である、腔がないことを確認する。生体では観察しにくいので、AFAなどを用いて圧平固定して、染色標本作製し、形態を確認する。

## ○対策○

魚を淡水に5-10分間浸漬する淡水浴が行われる。再寄生を受けるので、駆虫を繰り返す必要がある。*Benedenia seriolae* に用いられる水産用医薬品（過酸化水素製剤とプラジクアンテル製剤）は本種の駆虫には使用できない。虫卵には一端に備わるフィラメントによって、生簀の網地に付着する。そのため、駆虫時には網地も交換することが有効である。本種はしばしば眼に寄生して、傷つけ、放置すると失明に至ることがあるので、こまめに駆虫することが重要である。

## ゼウクサプタ症 (*Zeuxapta japonica* infection)

カンパチには周年みられる寄生虫病で、カンパチのエラムシ症ともいう。ヒラマサにも寄生する。しばしば大量寄生して、被害があるが、有効な対策は知られていない。

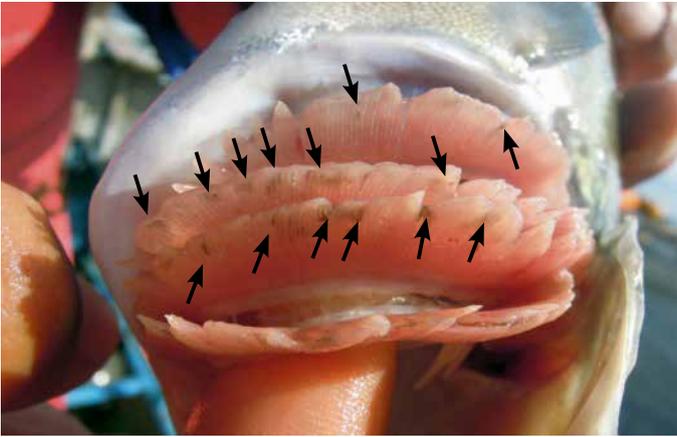


写真1 多数寄生によって貧血を呈した鰓。鰓弁中に黒く見えるもの(矢印)はゼウクサプタの虫体。

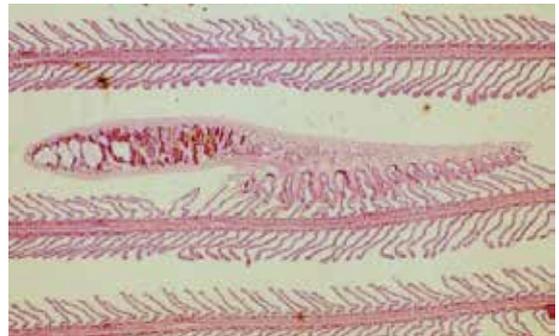


写真2 カンパチの鰓弁を把握器でつかんで寄生している虫体。(ヘマトキシリン・エオシン染色)



写真3 虫体の全体像(左)と後端部の拡大図(右)。この虫体では固着盤の把握器列の長い方(左側)では47個、短い方(右側)では42個の把握器がある。

### ○病原体と分類学的位置○

多後吸盤類ヘテラキシネ科に属する単生類で、カンパチやヒラマサのエラムシと呼ばれる。学名は *Zeuxapta japonica* という。体長は 4-9 mm で、後端はやや尖り、前方に向けて細くなるが前端は断ち切ったような形を呈する。後端の固着盤には、鰓弁をつかむ把握器が 2 列ある。片側の列が他の列より把握器数が多く (39-42 個に対して 45-47 個)、把握器もやや大きい。したがって、体後部は左右不相称となる。カンパチが幼稚魚の時には、別種のエラムシ *Heteraxine heterocerca* も寄生するが、固着盤の形態で区別できる。すなわち、*H. heterocerca* の把握器数は 24-32 個と 3-14 個と列による差が大きく、把握器の大きさの差も大きいため、よ

り不相称性が明瞭である。

### ○発生時期○

寄生は周年みられるが、寄生の季節性については不明である。

### ○症状○

**外部症状：**鰓は貧血のために褪色し、大量に寄生を受けた魚は活力の低下が認められる。

**内部所見：**内臓諸器官が褪色する。

**組織病変：**虫体後部の把握器によって、カンパチの鰓薄板をつかんで寄生するが、寄生による病変は認められない。鰓に出血も認められない。

### ○診断方法○

鰓弁から虫体を採集して、上記の形態を確認する。寄生数が少ないと、顕著な貧血は認められない。

### ○対策○

ほとんど知見がない。卵の一端に長いフィラメントが付属している。産卵の時には、フィラメントでお互いに絡まりあった卵塊として産み出される。そのため、卵塊は生簀の網地に絡まりやすい。したがって、定期的な網替えは虫卵の除去に有効と考えられる。ハダムシ駆除に用いられる淡水浴は、カンパチのエラムシの駆除には効果がない。

## ヘテラキシネ症 (*Heteraxine heterocerca* infection)

ブリに周年みられる寄生虫病として知られるが、カンパチには幼魚期のみ寄生する。通常、本種は *Zeuxapta japonica* と混合寄生している。

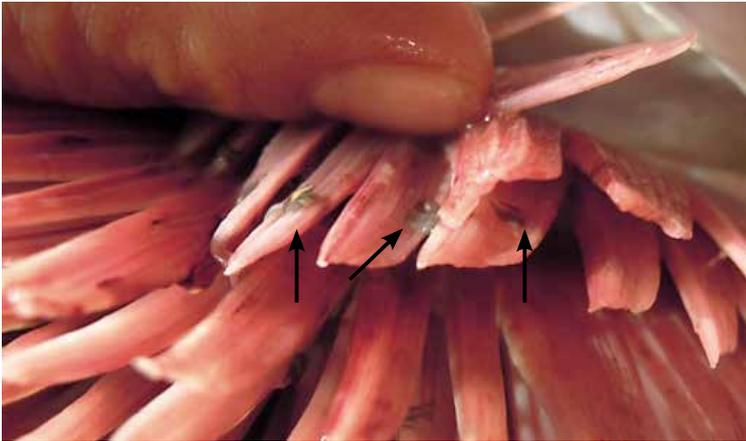


写真1 鰓弁上の *Heteraxine heterocerca* の虫体 (矢印)。体中央の黄色部分は虫卵の充満した子宮である。



写真2 虫体の全体写真 (糸状に連なった卵を産卵する)

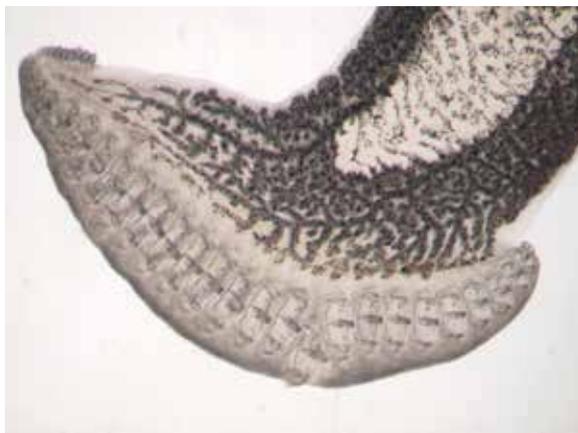


写真3 虫体後端部の拡大。この虫体では固着盤の把握器列の長い方(下側)に29個、短い方(上側)に9個の把握器がある。

### ○病原体と分類学的位置○

単生類の多後吸盤類ヘテラキシネ科に属する単生類で、ブリのエラムシとして知られる。カンパチには幼魚期にのみ寄生がみられる。学名は *Heteraxine heterocerca*。成虫の体長は 5-17 mm で、おおよそ三角形を呈する。後端の固着盤には、鰓弁をつかむ把握器が2列ある。片側の列が他の列より把握器数が多く (24-32 個に対して 3-14 個)、把握器も数の多い列のものが少ない列のものに比べて格段に大きい。したがって、体後部は左右不相称となる。カンパチには *Zeuxapata japonica* も寄生するが、固着盤の形態で区別できる。詳細はゼウクサプタ症の項を参照されたい。

## ○発生時期○

輸入カンパチ種苗が導入される春にみられる。

## ○症状○

**外部症状**：多数の寄生を受けた魚の鰓は、貧血のため褪色している。

**内部症状**：特に目立った病徴は認められない。

**組織病変**：特に目立った病変は認められない

## ○診断方法○

鰓弁から虫体を採集して、上記の形態を確認する。寄生数が少ないと、顕著な貧血は認められない。

## ○対策○

卵塊は一端に長いフィラメントを持ち、子宮内で互いに絡み合った卵塊は産出後に生け簀の網地に絡まりやすい。したがって、定期的な網替えは虫卵の除去に有効である。かつて、本虫を駆除するために、食塩を6-9%添加した海水にブリを浸漬する濃塩水浴が行われていたが、魚体に与える影響が大きいため、現在ではほとんど行われない。カンパチに対して濃塩水浴を行ったという記録はない。ハダムシ駆除に用いられる淡水浴はカンパチのエラムシの駆除には効果がない。

## 住血吸虫症 (Blood fluke infection)

虫卵が鰓血管を閉塞するため、死亡率の高い寄生虫病である。国産種苗、中国産種苗にかかわらず発生がみられる。中間宿主は不明である。養殖場内で感染環が成立していると考えられる。



写真1 窒息を起こして死亡した幼魚。口と鰓蓋をあけて死ぬのが特徴である。

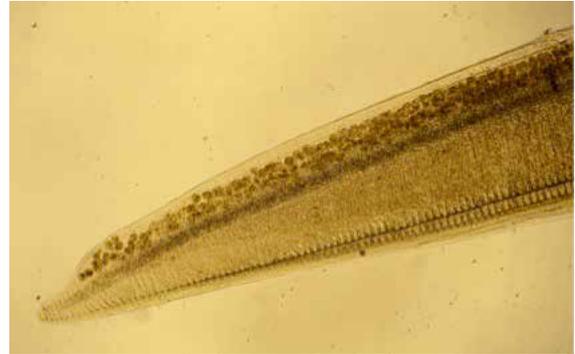


写真2 鰓のウエットマウント標本の顕微鏡写真。虫卵は小入鰓動脈内にあり、鰓薄板内には認められない。



写真4 血管系から採集した虫体。小型の *P. grandispinus* と大型の *P. kampachi*

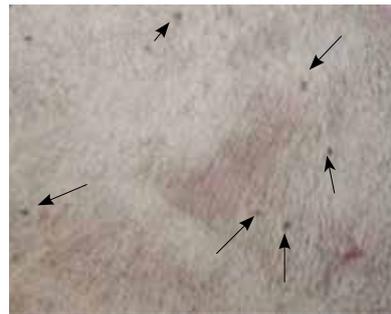


写真3 心筋の圧平標本の顕微鏡写真。(矢印は虫卵)

### ○病原体と分類学的位置○

吸虫類アポロコチレ科の *Paradeontacylix grandispinus* (体長 2-3 mm) と *P. kampachi* (体長 5-8 mm) が心臓から入鰓動脈にかけての血管系に寄生する。中間宿主は特定されておらず、生活環は不明である。ブリにも類似の住血吸虫が寄生するが、別種である。

### ○発生時期○

国産のカンパチ稚魚を養成した場合、セルカリアの侵入はその年の9月に始まった。虫体の成熟、産卵に伴い、鰓の虫卵集積によって死亡がみられるのは、12月から4月であった。中国産種苗では、6月に大量死を引き起こしたことがあり、発症は冬から初夏に及ぶと考えられる。1歳魚以上では発病の記録はない。



写真5 *P. grandispinus* の後端部の棘（ピクリン酸アンモニウム・グリセリン液固定標本）



写真6 *P. kampachi* の後端部の棘（鉄ヘマトキシリン染色標本）

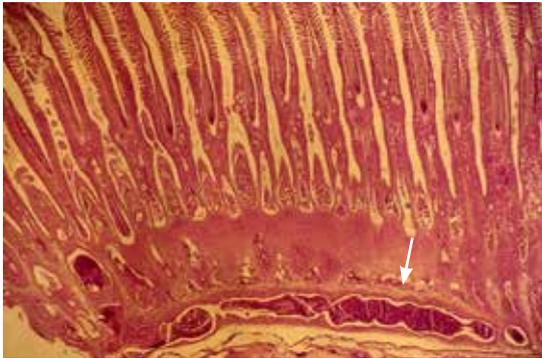


写真7 入鰓動脈内の *P. kampachi* (矢印) (ヘマトキシリン・エオシン染色)

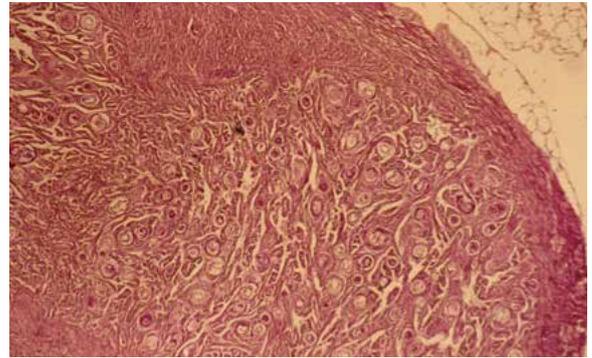


写真8 心筋内の虫卵結節（ヘマトキシリン・エオシン染色）

## ○症状○

外部症状：特徴的な症状はみられない。窒息を起こしていれば、口と鰓蓋が開いた状態で死亡する。

内部症状：軽度の寄生例では、解剖による特徴的な症状は認められない。重度の寄生では、虫卵の集積によって鰓弁の肥厚がみられる。

組織病変：心室、鰓弁に虫卵結節が認められる。鰓血管内にしばしば虫体がみられる。内臓には変化は認められない。

## ○診断方法○

簡易診断法：鰓弁を切り出して、ウェットマウント標本を作製し、検鏡して小入鰓動脈側に虫卵を確認する。虫卵の形態によっては *Paradeontacylix grandispinus* と *P. kampachi* の卵を鑑別することはできない。

確定診断法：血管系から虫体を採集し、形態によって寄生種を同定するが、虫体の採集は容易ではない。

## ○対策○

生活環は不明であり、駆虫薬も開発されていないため、有効な対策はない。

# ヒルディネラ類吸虫による幼虫移行症 (Hirudinellid larva migrans)

輸入カンパチの体腔や筋肉内に、広範囲に広がる黒い粘液状の異物とともに赤い大型の寄生虫がみられる。



写真1 病魚の解剖写真。腹腔内は虫体の排泄物である黒色の粘液状の異物で覆われる。矢印は虫体



写真2 虫体の全体像



写真3 病魚の外観。体表面に凹凸と穴あき症状がみられる。



写真4 カンパチ筋肉中に見られた、ヒルディネラ寄生が原因と思われる黒色異物

## ○病原体と分類学的位置○

ヒルディネラ類に属する吸虫と考えられるが、未成熟であるため同定されていない。虫体は全体に分厚く、赤色を呈する。生きている時の体長は2-3 cmに達する。体前半より後半のほうが太い。体前端に口吸盤、体の前半部分に腹吸盤があるが、口吸盤よりも大きい。体後半の消化管内容物が黒く見える。魚食性の大型魚が終宿主として推定されるが、特定されていない。

カンパチが終宿主として適当でないため、カンパチ体内で成熟できずに体内を移動し続ける(幼虫移行症という)。同様な寄生は国内の数種の天然海水魚にもみられる。

### ○発生時期○

日本に輸入された時点ではすでに寄生を受けていたと考えられるが、中国国内でいつ寄生を受けたか、寄生後いつ頃に発症するかは不明である。

### ○症状○

**外部症状：**躯幹部の筋肉組織内を移動する際、皮膚を内側から破る場合がある。その際は体側に不規則に穴がみられる。

**内部症状：**虫体は体腔内や筋肉内を移動する。虫体が移動した後には黒い異物が観察されるが、これは虫体の排泄物である。

### ○診断方法○

**簡易診断法：**体腔内や筋肉内が黒変していることを確認する。

**確定診断法：**体腔内や筋肉内に可視大の虫体を探し出し、上記の形態的特徴を持つことを確認する。

### ○対策○

特に検討されていない。国産種苗を用いたカンパチには寄生例はない。

## カンパチ筋肉条虫症 (Muscle plerocercoid infection)

2011年に鹿児島県と宮崎県で養殖されたカンパチを出荷の際、3枚におろしたところ、筋肉内に従来未知の四吻目条虫幼虫の寄生が確認された。魚体に与える影響は軽微であるが、商品価値を損なう寄生虫として今後も注意をする必要がある。



写真1 筋肉内に寄生する尾胞



写真2 筋肉内から取り出した尾胞

### ○病原体と分類学的位置○

ラシストリンクス科 (Lascistorhynchidae) グリロチア亜科 (Grillotinae) に分類される、四吻目条虫 (*Trypanorhyncha* gen. sp.) の入った管状構造物 (尾胞; ブラストシスト) が筋肉に寄生する。尾胞内に存在するはずの条虫の頭節が未発見のため、属種は未同定。尾胞は非常に細長く (45-55 cm)、絡まりあうように塊状で存在している。寄生虫は擬充尾虫で、終宿主はサメ類である。生活環は不明であるが、カンパチは中間宿主の甲殻類または魚類を捕食して寄生を受けたものと考えられる。カンパチにおける寄生はきわめてまれで、これまで3例が国内で確認されたのみであり、他の魚種での寄生は確認されていない。

### ○発生時期○

おそらく、カンパチが幼稚魚の時に感染を受けたと考えられる。魚体内では終宿主に捕食されるのを待つことになるので、特に寄生に季節性はない。

### ○症状○

**外部症状:** 特に異状は認められない。

**内部症状:** 3枚におろすと、体側筋肉内に白く、塊状の細長い管状構造物 (ブラストシスト) が確認できる。

組織病変：病理組織学的知見はない。

### ○診断方法○

**簡易診断法：**ブラストシストは肉眼で十分に確認できる。ブリ筋肉線虫 *Philometroides seriolae* と外見や寄生状態が類似するが、本種の体幅は一様ではなく、断面は正円ではないので、容易に区別できる。なお、ブリ筋肉線虫はカンパチでは確認されていない。

**確定診断法：**小サブユニット rDNA の塩基配列を決定する（本種に特異的な塩基配列は特定されていない）。

### ○対策○

未検討。

## ウズムシ症 (Paravortex infection)

中国から輸入されたカンパチの鰓に大量に寄生していた例がある（未発表）。カンパチでは被害は未報告であるが、オニオコゼでは感染魚に死亡がみられるので、注意を要する。



写真1 鰓弁組織内のウズムシ虫体

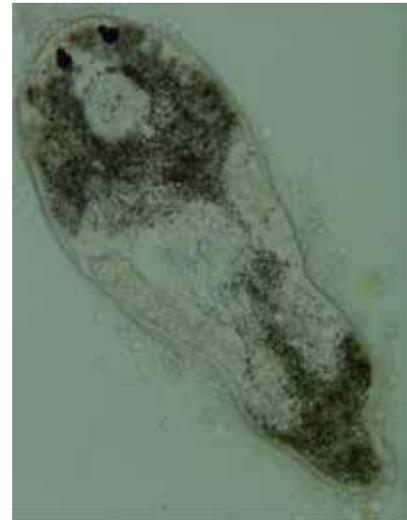


写真2 ウズムシの顕微鏡写真

### ○病原体と分類学的位置○

扁形動物門渦虫綱に属する。オニオコゼに寄生するウズムシ *Paravortex* と形態が類似しているため、ここでは仮に *Paravortex* sp. とする。宿主特異性については不明である。体長は 1 mm 程度（オニオコゼ寄生種の場合）で、前端に 1 対の眼点がある。鰓組織内に寄生する。この属のウズムシは胎生で、成長すると魚体を離れ、水底で産仔する。

### ○発生時期○

6月に寄生が確認されたが、季節性については検討されていない。

### ○症状○

**外部症状：**鰓の粘液の多量分泌がみられる。

**内部症状：**検討されていない。

**組織病変：**寄生の刺激によって鰓の上皮増生や粘液分泌の亢進がみられる。

### ○診断方法○

**簡易診断法：**鰓組織のウェットマウント標本を作製し、1対の眼点のある虫体（体長 ≤ 1 mm）を確認する。

### ○対策○

検討されていない。



## アニサキス症 (Anisakiasis)

2005年に中国から輸入されたカンパチの中間種苗（尾叉長 40-43 cm）の内臓に寄生していた。餌としてアニサキスの寄生した生魚（おそらくはカタクチイワシ）を投与されたことが原因と考えられる。一部の魚では筋肉に寄生していたため、アニサキスの寄生した魚は冷凍または加熱処理をしなければ出荷できなくなった。その後は輸入カンパチ種苗に寄生は確認されていない。

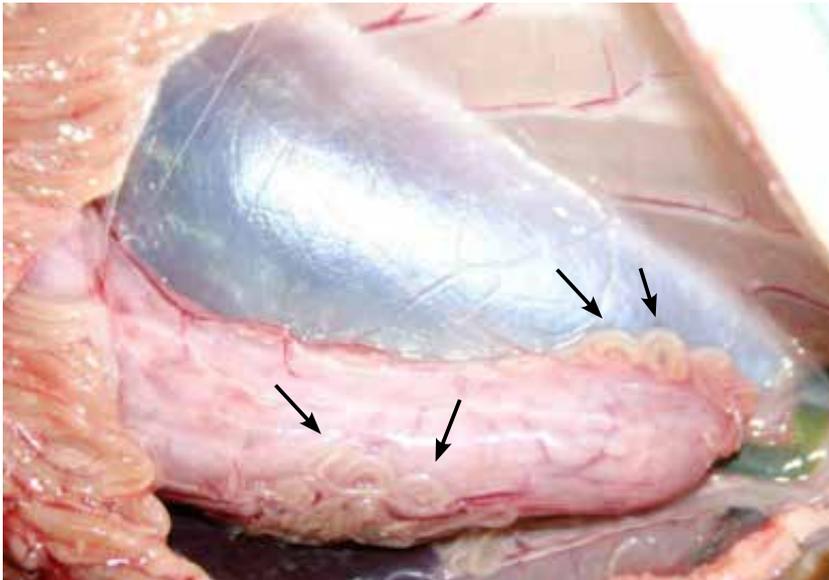


写真1 病魚の腹腔内に寄生する虫体



写真2 虫体の全体像

### ○病原体と分類学的位置○

アニサキス科の線虫で、学名は *Anisakis pegreffii* という。魚に寄生しているのは第3期幼生である。人体寄生虫として知られるが、寄生は一過性で、人間の体内では成虫にはなれない。終宿主は海産哺乳類と考えられるが、特定されていない。2005年のカンパチの寄生事例では、虫体は多くはとぐろを巻いた状態で宿主由来の鞘内に納まっていた。体長は 16.4-25.0 mm の範囲であった。

### ○発生時期○

2005年に輸入された種苗の一部に寄生がみられただけで、以降は確認されていない。魚に寄生するとその体内で長期間生存するため、寄生に季節性はない。

### ○症状○

**外部症状：**特に病徴は認められない。

**内部症状：**虫体は胃の表面、胃の粘膜下層内、胃後部の漿膜内に多く、腸間膜にもみられる。多数寄生を受けた胃では、後半部が反転して前半部に入り込み、胃腔がほとんどなくなった例もあった。

組織病変：胃壁の虫体の周囲にはほとんど宿主反応を認められない。



写真3 重篤寄生魚の胃の断面（固定標本）

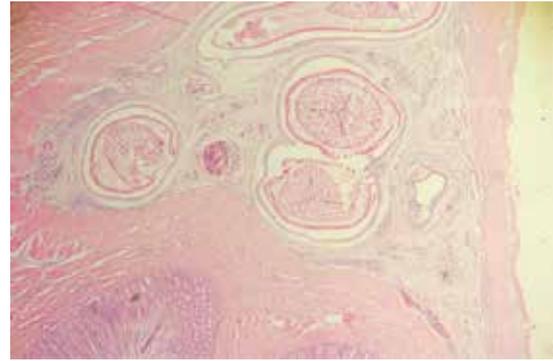


写真4 重篤寄生魚の胃の断面（ヘマトキシリン・エオシン染色）

### ○診断方法○

簡易診断法1：胃壁や内臓表面に虫体を確認する。

簡易診断法2：虫体を熱ホルマリン等で固定し、虫体長を測定する。グリセリン・アルコール等で虫体を透明化し、腸盲嚢と胃盲嚢を欠くこと、尾端突起があることを確認する（*A. pegreffii* を含むアニサキスI型幼生の特徴）。

確定診断法1：rRNAコード領域の一部（ITS1-5.8S-ITS2）のPCR-RFLP解析を行う。

確定診断法2：同領域の塩基配列を決定する。



写真5 虫体の前半部分（矢印は胃）

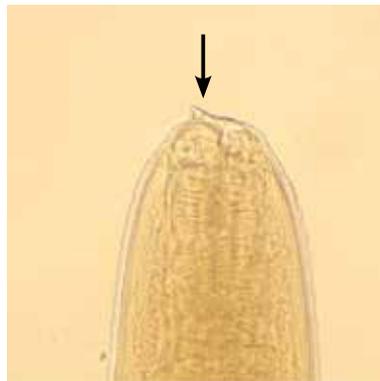


写真6 虫体の前端部（矢印は穿歯）

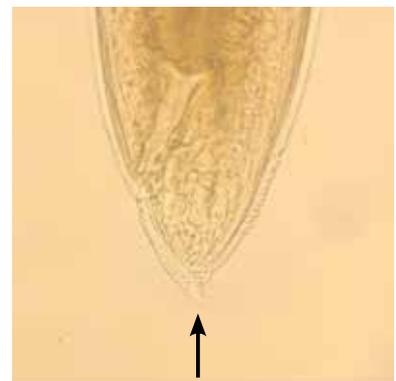


写真7 虫体の後端部（矢印は尾端突起）

### ○対策○

国産のカンパチ種苗には寄生例はない。生餌を与えない限り、寄生の危険性はない。中国産カンパチにも近年は寄生の報告はない。特に対策を講じる必要はない。

## 鰓カリグス症 (Gill Caligusiasis)

ブリ類に寄生する寄生性カイアシ類で、古くから知られており、しばしば大量寄生して、寄生部位に出血や炎症を引き起こす。

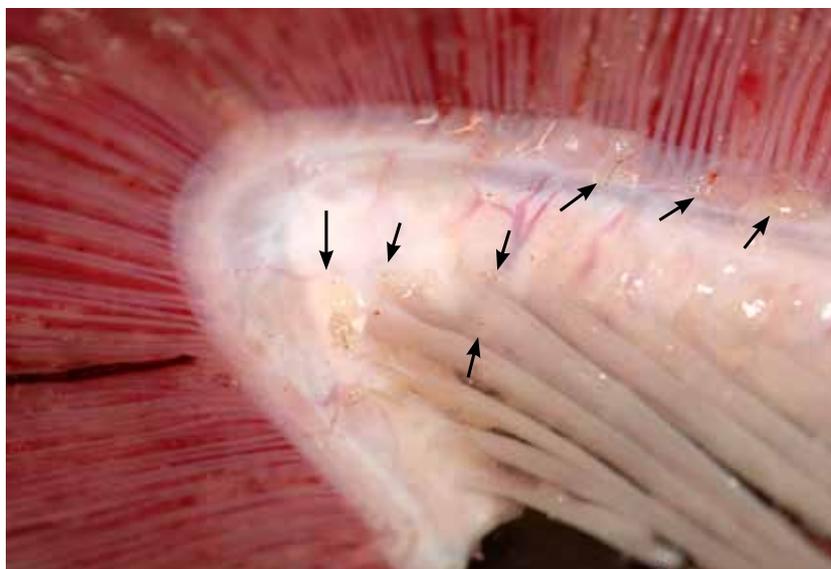


写真1 カリグス(矢印)の大量寄生を受けたブリの鰓耙



写真2 雄成虫(左)と雌成虫(右)

### ○病原体と分類学的位置○

節足動物門甲殻綱カイアシ亜綱ウオジラミ目で学名を *Caligus spinosus* という。雌の体長は 3-5 mm、雄はやや小型で体長 2-4 mm ほどである。雌は 1 対の卵嚢を備える。一つの卵嚢には 10-20 個の卵が一行に入っている。成虫は主に鰓弓と鰓耙に寄生するが、大量に寄生した場合は鰓蓋内側や口腔壁にもみられる。ふ化幼生ノープリウスは水中で脱皮してコペポデイドに変態し、魚に寄生する。寄生後はカリムス幼生となって前額糸を打ち込んで鰓弁に寄生する。ブリやヒラマサにも寄生する。

## ○発生時期○

寄生は周年みられるが、季節性の詳細は不明である。

## ○症状○

**外部症状：**寄生部位は鰓、鰓腔内、口腔内であり、外部に異常はみられない。大量に寄生すると摂餌不良となり、痩せ症状が現れる。

**内部症状：**少数の寄生では目立った症状をみられないが、大量に寄生すると寄生部位は出血を伴って赤く爛れ、激しい炎症を示す。内臓には異常は認められない。

**組織病変：**組織学的知見はない。

## ○診断方法○

鰓弓と鰓耙等に寄生する虫体と鰓、鰓腔壁、口腔壁の炎症を確認する。

## ○対策○

使用できる水産用医薬品はない。対策は検討されていない。



写真3 ブリ鰓弁上のカリムス幼生。

## 皮膚カリグス症 (Skin Caligusiasis)

日本では 1989 年に初めて知られるようになったブリ類の寄生性カイアシ類で、寄生部位にスレがみられる。

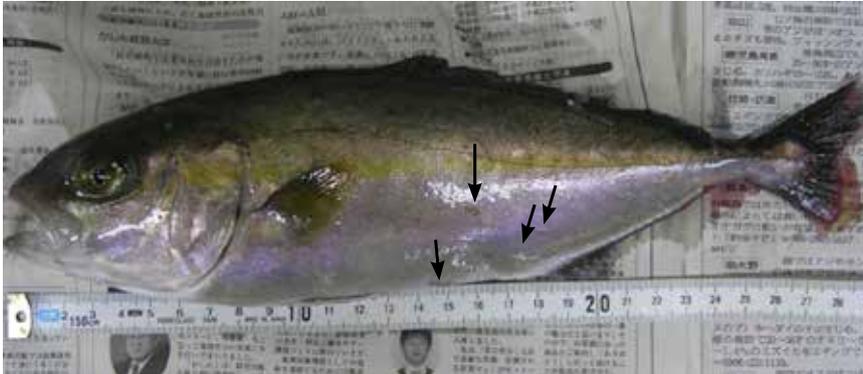


写真1 カンパチ体表上の成虫 (矢印)



写真3 雌成虫



写真2 魚体表上の雄成虫 (矢印)

### ○病原体と分類学的位置○

節足動物門甲殻綱カイアシ亜綱ウオジラミ目で学名を *Caligus lalandei* という。雌の体長は 8-9 mm、雄はやや大きく、体長 11-19 mm ほどである。雌は 1 対の卵嚢を備える。雄では尾肢(尾端の枝状突起)が 4 mm と極端に長い。発育過程は鰓寄生の *C. spinosus* と同じと考えられるが、記載されていない。コペポディドの寄生部位も知られていない。ブリやヒラマサにも寄生する。

### ○発生時期○

季節性の詳細は不明である。

### ○症状○

**外部症状：**寄生部位にスレがみられる。重度寄生例は記録されていない。

**内部症状：**内臓には異常は認められない。

組織病変：組織学的知見はない。

### ○診断方法○

簡易診断法：皮膚から虫体を採集する。鰓寄生の *Caligus spinosus* より大型である。雄では尾肢が極端に長いことを確認する。

### ○対策○

使用できる水産用医薬品はない。対策は検討されていない。

## ヒドラの着生 (Hydra)

春先に中国海南島で飼育中のカンパチ幼魚の体表面にヒドラの着生が確認された(未発表)。国内のカンパチでは未確認である。



写真1 皮膚や眼にヒドラの着生したブリ。



写真2 中国海南島で飼育中のカンパチ幼魚の体表にみられたヒドラの実体顕微鏡写真。



写真3 ブリに着生したヒドラの茎の先端部に形成された無数のポリプ。



写真 ヒドラの茎から離れた水母(クラゲ)。

### ○病原体と分類学的位置○

刺胞動物のヒドラの仲間には魚体表面に着生する数種が知られているが、分類学的検討はされていない。ポリプが集まって群体を形成し、小動物を捕食する。着生している魚から栄養を摂取するわけではない。ポリプは水母(クラゲ)となって魚体を離れ、いずれ茎部ごと脱落して、自然治癒するものと考えられる。ブリにも同様なヒドラが着生するが(田中真二、未発表)、カンパチのものと同種かどうかの確認はされていない。

### ○発生時期○

中国では3月、日本(ブリ)では5月に確認されている。季節性の詳細については不明。

### ○症状○

**外部症状:** 着生によって魚が死亡したり、衰弱することは確認されていない。

**内部症状**：検討されていない。

**組織病変**：着生部位に病変があるかどうか、検討されていない。

### ○診断方法○

**簡易診断法**：魚体表面に茶褐色ないしオレンジ色を呈する房状の群体の着生を確認し、実体顕微鏡によって、ポリプを確認する。

### ○対策○

病害性は確認されていない。おそらく水温の上昇とともに群体は脱落すると思われるので、自然治癒を待つ。

## オヨギイソギンチャクの刺症 (Jellyfish stings)

夏、生簀の網地上に大発生し、生簀内の魚が刺胞によって刺され、そのために死亡することもあるといわれる。



写真1 オヨギイソギンチャク

### ○病原体と分類学的位置○

病原体は刺胞動物門花虫綱イソギンチャク目オヨギイソギンチャク科のオヨギイソギンチャク *Boloceroides mcmurrichi* である。大きさは触手を含め、最大で直径3 cmほど。自然界では海藻に付着していることが多いとされるが、養殖網上に大発生することがある。再生力が強く、1本の触手からでも再生するといわれる。カンパチのほかに、ヒラメやトラフグに被害例が知られている。

### ○発生時期○

夏の高水温期が繁殖期と考えられる。

### ○症状○

外部症状：刺胞に刺された発赤がみられる。

内部症状：特に異常を認められない。

組織病変：検討されていない。

### ○診断方法○

簡易診断法：触手などの形態から鑑別する。

### ○対策○

ウマヅラハギやイシダイは好んで捕食するので、生簀内に混養すると、ある程度の効果が認められる。漁網防汚剤の塗布も繁殖抑制効果があるといわれる。網地上に大発生した場合、網替え時に網地を離れて、魚を刺すことがあるので、注意を要する。



## 腎腫大症

本病は、1996～2000年にかけてカンパチ養殖の主要産地である鹿児島県で多発していたが、その後は初期減耗の範囲で散発的に発生する程度であった。ところが、2008年に西日本の養殖場において、中国から輸入した種苗で本症が大規模に発生し、例年にない高い死亡率により大きな被害が生じた。

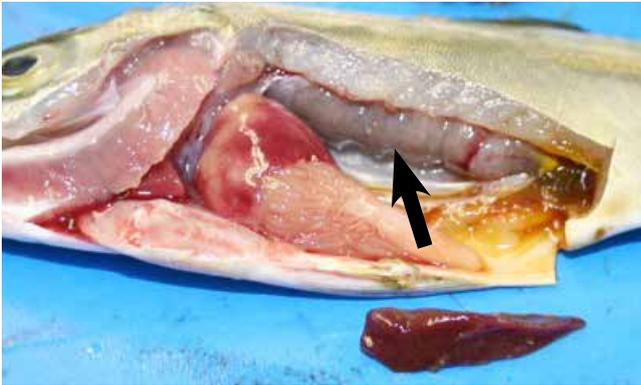


写真1 罹病魚の内部症状 鰓の褪色、腎臓の肥大(矢印)が観察される。

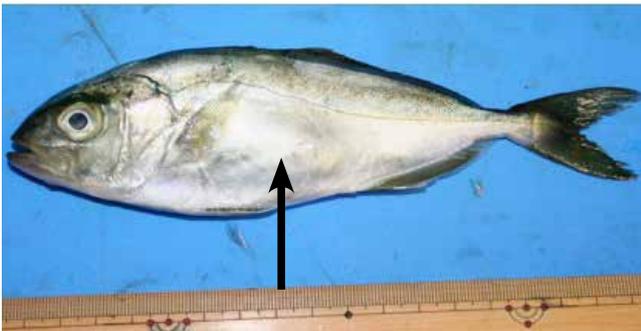


写真2 罹病魚の外観症状。側線下部の腎臓にあたる部分(矢印)が隆起している。

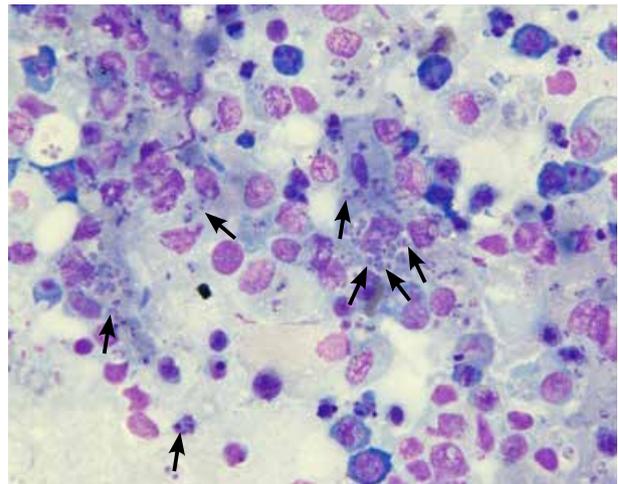


写真3 感染試験魚における原因生物の顕微鏡写真。感染試験魚の腎臓スタンプ標本にディフ・クイック染色を施し、顕微鏡で観察。写真全体に赤と青で染色された2～3 μmの類円形の微生物(矢印)が多数観察される。

### ○病原体と分類学的位置○

自然発病魚、感染実験により再現された魚の腎臓や脾臓に、2～3 μmの類円形の微生物が観察されるが、それが何であるかは明らかにされていない。

### ○発生時期○

5～9月にかけて発生するが、盛期は6～7月である。

### ○症状○

**外観症状：**顕著な外観症状は乏しいが、側線下部の腎臓付近が隆起し、触診すると張りが認められる(写真2)。

**内部症状：**腎臓全体の肥大に加え、頭腎や後腎の顕著な肥大が観察される(写真1)。腎臓が肥大している病魚では脾臓も同様に肥大していることが多い(写真1)。また、本症に罹病した魚は、鰓の褪色が顕著であり、採血するとRBC(赤血球)、Hab(ヘモグロビン)、Hct(ヘマトクリット)値が未発症魚よりも有意に低く、重度の貧血を呈する魚が観察される。さらに、

未発症魚に比べ、罹病魚の GOT（グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ）は有意に高く、電解質、浸透圧値にも異常が認められる。

### ○診断方法○

鰓の褪色、貧血、腎臓の肥大、脾臓の肥大を肉眼で確認後、脾臓ならびに腎臓のスタンプ標本を作製し、ディフ・クイック染色を施して、赤と青に染まる 2～3  $\mu$  m の類円形の微生物を確認する（写真 3）。種苗搬入直後には、腎臓が肥大するその他の疾病としてイクチオホヌス症、原虫（未同定種）が観察されることもあるため、診断の際には注意を要する。

### ○対策○

現在のところ、有効な対策は知られていない。

## ◎参考資料◎

### 報告書

「魚類等防疫指針 2 細菌病」,(1978),水産庁.

「平成4年度魚類防疫技術基盤確立事業 疾病診断マニュアル」,(1993) (社)日本水産資源保護協会.

「細菌性魚病迅速診断マニュアル」(1994),農林水産技術会議事務局・水産庁養殖研究所.

### 書籍

「魚介類の感染症・寄生虫病」(江草周三 監修,若林久嗣・室賀清邦 編)(2004),恒星社厚生閣,442. ISBN7699-1001-0

「ブリ類の魚病 カラーアトラス」(マーク・シェパード著、横山博訳)(2005),Sakana Veterinary Services Ltd, 60.  
ISBN 0-92022501502 (URL: <http://sakanavetservice.com/home.html>)

「新魚病図鑑 第2版」(畑井喜司雄・小川和夫監修). (2011),緑書房,296.  
ISBN978-4-89531-067-3

「改訂・魚病学概論第2版」(小川和夫・室賀清邦 編)(2012) 恒星社厚生閣,214.  
ISBN978-4-7699-1267-5

### Web

PCRによる診断のためのプライマー情報  
国立研究開発法人水産研究・教育機構 増養殖研究所 魚病診断・研修センター  
<http://nria.fra.affrc.go.jp/sindan/pcr.html>

水産食品の寄生虫検索データベース D-PAF  
<http://fishparasite.fs.a.u-tokyo.ac.jp>



## 魚類防疫技術書

# 養殖カンパチの魚病診断マニュアル (改訂版)

○魚類防疫技術書編集委員会 (H23 年度初版時) ○

委員:

小川 和夫 (財団法人 目黒寄生虫館)  
岩田 一夫 (宮崎県水産試験場)  
大迫 典久 (独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所)  
山下 亜純 (愛媛県農林水産研究所水産研究センター)  
村瀬 拓也 (鹿児島県水産技術開発センター)

(敬称略)

事務局: 養殖衛生対策推進協議会

○執筆者 (初版・改訂版) ○

### 第1章 カンパチ養殖の概要

山下 亜純 (愛媛県農林水産研究所水産研究センター)  
水野 芳嗣 (株式会社 媛すい)  
岩田 一夫 (宮崎県水産試験場)

### 第2章 魚病診断 概説

村瀬 拓也 (鹿児島県水産技術開発センター)

### 第3章 魚病診断 各論

大迫 典久 (独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所)  
湯浅 啓 (同 上)  
西岡 豊弘 (同 上)  
栗田 潤 (同 上)  
桐生 郁也 (同 上)  
嶋原 佳子 (同 上)  
村瀬 拓也 (鹿児島県水産技術開発センター)  
事務局

### 第4章 カンパチの魚病

山下 亜純 (愛媛県農林水産研究所水産研究センター)  
岩田 一夫 (宮崎県水産試験場)  
村瀬 拓也 (鹿児島県水産技術開発センター)  
小川 和夫 (財団法人 目黒寄生虫館)  
柳 宗悦 (鹿児島県水産技術開発センター)  
南 隆之 (宮崎県水産試験場)  
横山 博 (東京大学大学院農学生命科学研究科)  
事務局 (日本水産資源保護協会)

(敬称略)

○写真提供者ならびに機関○

小川 和夫 (財団法人 目黒寄生虫館)  
良永 知義 (東京大学大学院農学生命科学研究科)  
横山 博 (同 上)  
木南 竜平 (静岡県経済産業部水産業局)  
田中 真二 (三重県水産研究所)  
大迫 典久 (独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所)  
三輪 理 (同 上)  
山下 亜純 (愛媛県農林水産研究所水産研究センター)  
森実 庸男 (愛媛県愛南町水産課)  
黒原 健朗 (高知県水産試験場)  
福田 穰 (大分県農林水産研究センター水産試験場)  
木本 圭輔 (同 上)  
岩田 一夫 (宮崎県水産試験場)  
南 隆之 (同 上)  
平江 多績 (鹿児島県商工労働水産部水産振興課)  
福留 己樹夫 (鹿児島県水産技術開発センター)  
村瀬 拓也 (同 上)  
南 隆之 (宮崎県水産試験場)  
鹿児島県水産技術開発センター

(敬称略)

※所属は初版時のとおり。

平成30年3月

公益社団法人日本水産資源保護協会

〒104-0044 東京都中央区明石町1-1

東和明石ビル5F

TEL: 03-6680-4277 FAX: 03-6680-4128