

ブリ類のべこ病原因虫の 検出マニュアル

水産研究・教育機構 水産技術研究所 病理部

愛媛県農林水産研究センター

鹿児島県水産技術開発センター

近畿大学

令和3年4月

【まえがき】

本マニュアルは、ブリ類のべこ病の原因虫 (*Microsporidium seriolae*) の検出方法を取り纏めたマニュアルです。初期感染状態の個体からの高感度検出と漁場環境水中からのモニタリングを目的とした検出法を中心に取り纏めました。

【目次】

- 1 ベこ病について
- 2 遺伝子検査法による感染魚等から原因虫の検出
 - 2.1 検査材料の準備
 - 2.1.1 魚体からの検体採取
 - 2.1.2 海水からの検出
 - 2.2 DNA 抽出
 - 2.2.1 組織からの DNA 抽出
 - 2.2.2 海水ろ過したフィルターからの DNA 抽出
 - 2.3 遺伝子検査
 - 2.3.1 リアルタイム PCR 法
 - 2.3.2 PCR および Nested PCR 法による検出
 - 2.3.2-1 PCR 法 (Nested PCR 法の 1st PCR)
 - 2.3.2-2 Nested PCR 法の 2nd PCR
 - 2.3.3 LAMP 法
- 3 疫学調査情報について (事例紹介)
 - 3.1 海水からの検出
 - 3.2 初期感染動態の把握について

参考文献など

1. べこ病について

【原因微胞子虫】

ブリ類のべこ病は、ブリキンクビホウシチュウ *Microsporidium seriolae* の筋肉内寄生による疾病で、ブリ養殖の黎明期から知られており（横山、2013；横山、2015；横山、2017）、罹患魚は体側筋肉内に白色不整形の数mmから1cm程の寄生体の集塊（シスト）が形成されます。当該シストはメロント、スポロント、スポロブラストおよび孢子からなり、孢子の大きさは長径2.9~3.7 μ m、短径1.9~2.4 μ mとされています（江草、1998）。

本症の原因虫は、宿主ごとに大きさやリボゾーム遺伝子配列に若干差異が認められ、ブリ、カンパチ、ヒラマサ等のブリ属魚類の原因虫は *M. seriolae*（江草ら、1982）、マダイ等のタイ科魚類の原因虫は *Microsporidium sp.* RSB（江草、1988）、ホシガレイ等のカレイ科魚類の原因虫は *Microsporidium sp.* SH（Yokoyama *et al.*, 2008）、クロマグロ等のマグロ属魚類の原因虫は *Microsporidium sp.* PBT（Zhang *et al.*, 2010）として、それぞれ知られています。

これらの原因虫により生じる疾病は、いずれも木屑状のシストを作る点で類似していますが、これまでの形態学的、分子生物学的解析ではすべて別種と考えられており、それぞれ和名が提唱されています（横山・長澤、2014）。

一方、魚類の微胞子虫症の治療や予防に関する研究事例は、ウナギのべこ病（原因虫：ウナギイケイビホウシチュウ *Heterosporis anguillarum*）（Kano *et al.*, 1982）やアユのグルゲア症（*Glugea plecoglossi*）に対するフマジリンの投与効果（高橋ら、1976）が報告されているものの、海産魚のべこ病に対する駆虫剤や抗生物質の治療効果に関する研究事例は少なく、治療法に関しては研究の途上にあると言えます。

【症状】

筋肉中のシスト内で孢子形成が進行し、その過程でシスト周辺の筋肉が融解し、融解した部位の体表が陥没したように見え、外観的に体表に凹凸が生じることがべこ病と呼ばれるゆえんです。従来は限られた地域で稚魚期にのみ発生し、軽度な感染個体では成長に伴って自然治癒する一過性の風土病的疾病と考えられてきましたが（江草、1982；Sano *et al.*, 1998）、2012年頃から、原因は不明ではありますが、四国南西部や九州南部のブリ類の主要漁場である地域で、ブリの天然種苗やカンパチ、ヒラマサの人工種苗で重篤化する事例が多く確認されるようになり、感染種苗の成長不良や死亡、さらには出荷サイズまで育成した魚の体側筋中にもシストの痕跡が確認され、クレームの対象となり商品価値が低下するなどの経済的被害が発生しています（柳、2018）。

【病理】

べこ病を発症したブリの筋肉中に形成されたシスト内部では、*M. seriolae* の増殖生殖が観察され、シスト周辺部は、筋繊維の融解が観察されます。江草（1982）の報告

では、シスト辺縁部には、複数の核を有する多核体、その内側にはその分裂で生じたと考えられる一核体、次いでスポロブラスト（プラスモディウム）、そして成熟胞子の順に観察されます。最も症状が重い時期のシスト内部には、感染初期と同様の増員生殖が観察され、シスト周辺の筋繊維の融解は、より顕著になり、シスト周辺の融解部、その周囲の筋繊維間が染色される部分、その外側の正常の筋繊維部分が観察され、リング状に見られます。このような状態のシストに対しては、白血球の遊走などの免疫反応はほとんど見られないとされています。回復期のシスト内部には増員生殖像は見られず、多くのシストが崩壊し、内部の胞子の流出が観察されます。流出した胞子は貪食細胞によって盛んに貪食されます。シスト周辺の融解部には、肉芽組織に増生が顕著に見られ、以降シストの被包化が進行していきます。さらに、被包化によって胞子は局所に閉じこめられ、シスト周辺の筋肉融解も見られなくなり、治癒へ向かう様子が観察されていきます (Sano *et al.*, 1998; 写真参照)。治癒したシストは黒色筋状の痕跡としてみられる場合もあります。

【考えられる感染経路】

原因虫の生活環は未だ不明です (横山、2013; 横山、2015; Yokoyama, 2017)。魚から魚への感染は起こらないとされ、何らかの無脊椎動物が中間宿主として関与していると考えられていますが、未だ特定されていません。また、魚への感染体もみつかっておらず、人為感染は困難であります。ブリのべこ病については、これまで、発生時期は5~7月、特に6月にピークがあり、8月になると終息すると考えられていましたが (Sano *et al.*, 1998)、最近では秋~冬にも感染がみられ、ほぼ周年発生する可能性があります (柳ら、2021)。宿主サイズと寄生強度 (感染魚1尾当たりのシスト数) の関係性については、100g以上の大型魚 (123.8g) は中型 (45.8g) や小型 (27.0g) の魚と比較して感染はするものの寄生強度が顕著に低いことが報告されています (Yokoyama *et al.*, 2011)、詳細なことは分かっていません。

2 遺伝子検査法による感染魚等から原因虫の検出（特に初期感染期）

2.1 検査材料の準備

2.1.1 魚体からの検体採取

肉眼でシストが見られない、感染初期や軽度の感染個体については、原因虫の遺伝子を検出することで感染を確認できます。遺伝子検査用の検体の採取方法について以下に3つの手法を示します。いずれの方法も筋肉中の原因虫を検出することが可能ですが、それぞれメリット・デメリットがあります。

- ① ホモジナイズにより均一化した筋肉の一部を採取する方法（摩砕法）
- ② 半身のスライスから滲出した細胞を採取する方法（スライス法）
- ③ 筋肉表面に滲出した細胞を掻き取る方法（掻き取り法）

- ① 摩砕法は、筋肉組織を均一化するので、原因虫が局在している場合でも、検出できる確率が高くなります。ただし、組織摩砕に労力を要すること、また、筋肉そのものを採取するので検体量が多くなり、多くの検体を混ぜる（プールする）ことはできなくなります。そのため多検体（数十検体）の処理には労力と時間を要します。これを解消する方法として、フードプロセッサーを用いることもできますが、50g サイズまでのブリ稚魚の半身を5尾までのプールとすることを推奨します。
- ② スライス法は、切り身の表面あるいは滲み出した細胞を採取するので、比較的まんべんなく採取できる上に余計な筋肉組織が混入し難く、多検体処理の場合に効率的な方法です。ただし、筋肉組織は均一化されていないため、原因虫が微量な場合に検査漏れになる可能性はあります。また、高速遠心機が必要となります。
- ③ 掻き取り法は、筋肉表面の細胞あるいは表面に滲出してきた細胞を掻きとるため、特別な実験機器を必要とせず、もっとも簡便な方法です。ただし、原因虫が切断面ではなく、切り身の内部に局在している場合には検出することはできません。

各採材方法の特徴について

	検出感度	時間	労力	同時検出可能数
①	◎	△	○	5尾以内
②	○	○	◎	10尾以内
③	△	◎	◎	基本的に個別別

実験設備、労力あるいは検出感度などを加味して採取方法を選択してください。それぞれの採取方法の違いによる検出感度の比較は今後詳細に検証し、数値化していきたいと考えています。現在のところ、検出感度は高い方から、①-②-③の順であると推察されています。

☆コンタミ注意

【☆:以下の操作は、コンタミネーションの発生を防ぐため、十分量の器具等を準備する】

① 摩砕法

<必要な器具類>

- a. 解剖道具(包丁もしくはカッター、ハサミ、ピンセット)
- b. 破碎器具(ガラスホモジナイザー、☆乳鉢・乳棒、バイオマッシャー、フードプロセッサー等)

可能であれば鰓を切断し、脱血します。ペーパータオル等で魚体表面の汚れや水分をぬぐった後、脊椎骨に沿って尾柄部から頭部に向かって包丁を入れ、二枚におろします(写真1)。切り取った半身を解剖用ハサミでできるだけ細かく切断した後、サンプルバックや乳鉢に入れ、乳棒等を用いて摩砕し(写真2)、その一部(30 mg程度)をDNA抽出に用います。



写真1 二枚におろした魚体



写真2 筋肉の摩砕

② スライス法(凍結サンプルは推奨しません。)

<必要な器具類>

- a. 解剖道具(☆包丁もしくはカッター、ハサミ、ピンセット)
- b. [ストマフィルター](#)
- c. リン酸緩衝液(PBS)あるいは生理食塩水
- d. マイクロピペット
- e. 高速遠心機



写真3 半身のスライス



写真4 切り身へのPBS添加

上記と同様の方法で二枚におろした半身をハサミで3~5mmの短冊状に細切します(写真3)。この時、切れ味が悪いハサミを使用すると筋繊維がつぶれ、余計な筋組織が混入しますので、できるだけ切れ味の良いハサミをご使用ください。切り身をストマフィルターに入れ、全体が浸かる程度にPBSを加え、(切り身10gに対して3mLほど)30秒間ほど揉みこみます(写真4)。ストマフィルターをろ紙側に傾けて、切り込み部から1mLの細胞懸濁液を採取します(写真5)。細胞懸濁液を13,000~16,000 x gで5分間遠心し、上清を廃棄します(写真6)。沈査をDNA抽出に使用します。

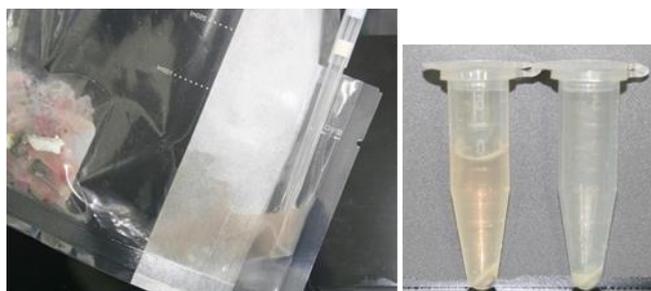


写真5 細胞懸濁液の採取 写真6 上清の廃棄

③ 掻き取り法

<必要な器具類>

- a. 解剖道具(☆包丁もしくはカッター)
- b. マイクロスパーテル(小型の葉さじ)あるいは耳かき棒

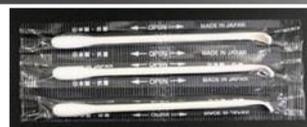


写真7 マイクロスパーテルと耳かき綿棒

上記と同様の方法で二枚におろします。マイクロスパーテルあるいは耳かき棒を用いて、切り取った側の半身の筋肉表面全体から、組織を採取します。その際、あまり力は加えずに、尾側から頭側に向けて、一方方向に30回程度、表面を撫でるようにこそぎます(写真8および9)。筋肉そのものを採取するのではなく、表面に滲出している細胞を回収するイメージです。耳かき綿棒の場合は、さじを寝かせて側面を使用すると採取しやすいです。



写真8 筋肉表面からの組織採取

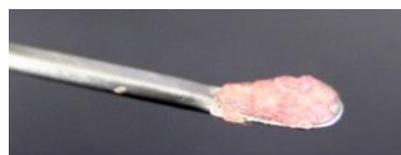


写真9 採取された組織

2.1.2 海水からの検出

・海水中から原因虫の遺伝子が高濃度・高率で検出される海域では、べこ病が発生する可能性が高いと考えられます。海水からは、吸引ろ過装置を用いメンブレンフィルターにより原因虫を捕捉し、フィルターごと核酸抽出に供します。これまでに孔径1.2μmのフィルター(Isoporeメンブレン/ミリポアなど)濾過で原因虫を検出できることを確認しています。

<採水>採水ポイント

- ・ 生簀内の表層・中層水など

- 係留ロープ等に繁茂する藻付近（付着生物が混入するイメージ）
- 採水量は 1~2L

〈海水の保存〉

- すぐに処理できない場合は、海水に防腐剤（ProClin300、シグマ）を 1/5000 量添加して冷蔵保存します。これまでに 52 日間冷蔵保存（4℃）したサンプルからも原因虫の遺伝子が検出できることを確認しています。

〈海水ろ過〉☆コンタミ注意

1. 海域により、海水の懸濁物の量が異なるため、プレフィルターの選択は適宜検討します。1L 海水を孔径 1 μm のフィルター 1 枚もしくは 2 枚程度でろ過可能なように設定します。（過去の例、1L 海水のろ過の場合 100→10→5→3→1.2 μm、各 1 枚）
2. 遺伝子検査には使用した全てのフィルターを使用します。
3. すぐに遺伝子検査を行えない場合は、フィルターを凍結保存します（-80℃推奨、-20~30℃でも可）。

2.2. DNA 抽出

2.2.1 組織からの DNA 抽出

高い検出感度が求められる場合には、QIAGEN の QIAmp mini kit あるいは DNeasy Blood and Tissue kit 等を推奨しています。

ここでは、検出感度はわずかに低くなりますが（検出感度については、サンプルの形態別に検討の余地は残されています）、迅速かつ簡便な、カネカ簡易 DNA 抽出キット version2（カネカ社）を用いた、DNA 抽出法を例に示します。

<DNA 抽出に必要な試薬および器具類>

- a. [カネカ簡易 DNA 抽出キット version2（カネカ社）](#)
- b. マイクロピペット
- c. フィルターチップ
- d. ヒートブロック
- e. 小型マイクロチューブ遠心機



写真10 DNA抽出キット

<①摩砕法・③掻き取り法の場合>

1.5 mL マイクロチューブにカネカ簡易 DNA 抽出キットの A 液 を 200 μ L 加えます。ここに筋肉組織(約 30 mg 程度)を懸濁させます(写真 11)。



写真11 組織の懸濁

<②スライス法の場合>

上清を廃棄した沈査に A 液 を 200 μ L 加え、ピペッティングでよく攪拌します。

(以下、①~③法に共通)

チューブを 98°C で 8 分間 加熱処理します。

室温まで放冷し、B 液 を 28 μ L 加え、ピペッティングでよく攪拌します。使用するまで室温で保存しておきます。下記遺伝子検査に DNA 溶液を添加する際には、再度ボルテックス等で攪拌し、スピンドウンを長めに行い、できるだけ沈殿物が入らないように上清を反応液に添加してください。

2.2.2 海水をろ過したフィルターからの DNA 抽出

DNA 抽出には、QIAGEN の QIAmp mini kit あるいは DNeasy Blood and Tissue kit を推奨します。同品質の DNA を抽出することができれば他社製品で構いません。

1. フィルターより若干大き目に加工したホモジナイズバッグもしくはサンプルバックにフィルターを入れます。
2. DNA 抽出キットの溶解用混液(ATL+Proteinase K)を加えたのち、バッグをシールし、軽く揉み込んでフィルターと溶解液を馴染ませ、55°Cで1時間から一晩加温します。
3. 溶解液を 1.5ml チューブに採取し、フィルターに残った液は 50ml 遠沈管の壁にフィルターを貼り付けた状態で遠心し回収します(目合い別に検査する必要が無ければ、フィルター2~3枚分の溶解液を一本の DNA 結合カラムに通してプールすることもできます)。
4. DNA は 50 μ l で溶出します。遺伝子検査には DNA 溶液 4 μ l で、2 反応実施することが望ましいです。

2.3 遺伝子検査

以下にリアルタイム PCR 法、PCR 法、Nested PCR 法および LAMP 法による遺伝子検査法を示します。いずれの検査法も増幅産物のキャリーオーバーによる誤判定を招く恐れがありますので、検査の実施に当たっては、フィルターチップの使用、実験台や器具などの定期的な DNA 除去剤(DNA AWAY など)による清掃、使用済みチップの速やかな廃棄などの対策を

講じる必要があります。特に、LAMP 法での反応後のチューブの蓋は絶対に開けないように注意してください。以下に、各検査法の特徴を示します。

各検査法の比較

	検出感度	迅速性
リアルタイム PCR 法	◎ ⁺	◎
PCR 法	○	○
Nested PCR 法	◎	△
LAMP 法	○	◎ ⁺

2.3.1 リアルタイム PCR 法による検出

反応試薬には様々なものが市販されていますが、基本的には通常使用しているもので問題ありません。ここでは TaKaRa の Probe qPCR Mix を使用する場合を例に示します。ただし、海水からの検出の際には、PCR 阻害物質の影響を受ける可能性がありますので、事前に複数の酵素で比較することを推奨します。

1) プローブ及びプライマーの配列

種類	プライマー名	配列
プローブ※	MsITSq_P	TAGTAGCCGCTGCCTCACCAAGGAGC (標識:5' FAM - 3' BHQ I a or TAMRA)
フォワード プライマー	MsITSq_F	TGCACAGGAACGAGGAATTG
リバー プライマー	MsITSq_R	ATAACGACGGGCGGTGTGTA

※当所では、ユーロフィンジェノミクス株式会社のダブル蛍光標識プローブ(5' FAM - 3' BHQ I)を使用しています。

2) 反応液の組成

(1反応分)

Probe qPCR Mix ※	10 μl
フォワードプライマー (10 pmol/μl)	0.6 μl
リバープライマー (10 pmol/μl)	0.6 μl
プローブ (5 pmol/μl)	1.0 μl
50X ROX reference ※※	0.4 μl (製品添付書を参照。)

DNA 溶液	0.5~4 μ l(通常 2 μ l)
D.W.	Total 20 μ lにあわせる

※ Probe qPCR Mix (TaKaRa, RR391A)

※※ 50X ROX reference は使用機器によって添加の必要性、濃度が異なります。

3) 反応条件 (使用酵素の製品マニュアルを参照。以下は Probe qPCR Mix の場合。)

①初期変性	95°C、30 秒
②変性	95°C、5 秒
③伸長	60°C、30 秒
④ ②と③を繰り返す	50 サイクル(蛍光測定は伸長ステップに設定)

注) プライマーおよびプローブの調整方法は、プライマー・プローブが 100 μ M の場合、以下のような希釈を行います。これらを、同じ割合で多めに (ml 単位) 希釈し、100 μ l 程度ずつ分注保存しておくこととコンタミネーションによる試薬汚染のリスクを分散することに繋がります。蛍光標識プローブは遮光保存してください。

プローブ: D.W. 95 μ l + プローブ 5 μ l

プライマー: D.W. 90 μ l + プライマー 10 μ l

また、標的遺伝子を定量する際はコピー数が既知のサンプルを陽性コントロールとして使用します。この反応には原因虫の遺伝子を人為的に環状 DNA に組込んだものを鋳型に用います。

検量線の作成のために、ルーチンワークでは $10^4 \sim 10^6$ の標準 DNA をデュプリケートで用いています。高い定量性が求められる場合は、 $10^2 \sim 10^8$ のトリプリケートで実施してください。多くの場合 10^1 は増幅されず、検出限界以下となります。定量する必要がない場合は、 10^5 を陽性対照としてください。

(この標準 DNA は、当所で作製したものを差し上げます。)

2. 3. 2 PCR および Nested PCR 法による検出

Nested PCR 法は一度 PCR によって増幅した遺伝子産物を再度 PCR に使用する方で、ワンステップの PCR に比べ検出感度の向上が見込まれます。しかしながら、Nested PCR 法はコンタミネーション発生のリスクが非常に高い方法ですので、増幅産物の取り扱いには十分注意してください。海水など目的の遺伝子量が微量であることが想定される場合には使用するメリットがあります。

2. 3. 2-1 PCR 法 (Nested PCR 法の 1st PCR)

反応試薬は様々なものが市販されていますが、通常使用しているもので問題ありません。ここではプロメガ社の GoTaq® Green Master Mix を使用する場合を例に示します。なお、海水からの検出の際には、事前に PCR 阻害物質の影響を複数の酵素を用いて評価することを推奨します。

1) プライマー配列

IstPCR	プライマー名	配列
フォワードプライマー	MS-F1*	CACCTGTCTGCAATGCGGG
リバースプライマー	MsITS_R1	ACTACTTTGCGGACTTAACCCAGAG

*Bell *et al* (1999)のプライマー;PCR 産物のサイズ:482 bp

2) 反応溶液の組成

反応溶液の組成の例は以下の通りです。陽性対照がない場合、リアルタイム PCR 用の鋳型 DNA (10 の 5 乗) を使用してください。

(1 反応分)

GoTaq® Green Master Mix、2X	7.5 μ l
フォワードプライマー (10 pmol/ μ l : 10 μ M)	1.5 μ l
リバースプライマー (10 pmol/ μ l : 10 μ M)	1.5 μ l
D.W.	3.5 μ l
DNA	1.0 μ l
Total	15.0 μ l

3) 反応条件

①初期変性	94°C、3 分
②変性	94°C、30 秒
③アニーリング	58°C、30 秒
④伸長	72°C、30 秒
⑤ ②～④を繰り返す	40 サイクル (感染魚の場合、30 サイクル)

4) 増幅産物の検出

・1.5%~2%アガロースゲル電気泳動により検出する(2%の方が好ましい)。

2. 3. 2-2 Nested PCR 法の 2nd PCR

1) プライマー配列

2ndPCR	プライマー名	配列
フォワードプライマー	MsITS_F2	AAGGACGTAGGCTGGAGGAT
リバースプライマー	MsITS_R2	CGGACTTAACCCAGAGGTCA

PCR 産物のサイズ:312 bp

2) 反応溶液の組成

(1反応分)

GoTaq® Green Master Mix、2X	7.5 μ l
フォワードプライマー (10 pmol/ μ l : 10 μ M)	1.5 μ l
リバースプライマー (10 pmol/ μ l : 10 μ M)	1.5 μ l
D.W.	3.5 μ l
1stPCR 産物 (10 倍希釈)	1.0 μ l
Total	15.0 μ l

3) 反応条件

①初期変性	94°C、3分
②変性	94°C、30秒
③アニーリング	58°C、30秒
④伸長	72°C、30秒
⑤ ②～④を繰り返す	20～30サイクル

4) 増幅産物の検出

・1.5%～2%アガロースゲル電気泳動により検出する(2%の方が好ましい)。

2.3.3 LAMP 法

様々な反応酵素が市販されていますが、ここでは、ごく最近開発された、色の変化により増幅結果を判定できる比色 LAMP 法を示します。反応酵素には [WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix \(N・E・B ジャパン社\)](#) を使用します。

(1) プライマーについて

べこ病用の LAMP 法では FIP (Forward Inner Primer) /BIP (Backward Inner Primer)、F3/B3 Primer および Loop F/Loop B Primer の合計 6 本のプライマーを反応液に加えます。通常の PCR では脱塩グレードのプライマーを用いることもありますが、FIP/BIP につきましては、上位グレード (HPLC やカラム精製) の使用をお勧めいたします。その他のプラ

プライマーにつきましてはカラム精製あるいは脱塩グレードで結構です。以下にプライマー配列を示します。

プライマー名	配列
Ms_FIP	ACACGGGGTATTAATCTTCCTTTAGAGACTAATAGCTGCTGAG
Ms_BIP	ATCACGAGCAAAGAAGTAGCAGAATTCGTTTTCTTAAGCGTTAA
Ms_F3P	GGCTTAGACAGAAATTAGAAAGT
Ms_B3P	AATTCTTGATGGCATTTCCTTAGC
Ms_LoopFP	GCTCTAAAGTAGCATAAAGGTCCCT
Ms_LoopBP	GGACGAAGATTCCAGTTAGCAGA

(2) 10×プライマーミックスの調整

以下を同じ割合で多めに調整し、50~100 μl 程度ずつ分注して冷凍保存しておきます。

<10×プライマーミックスの調整>

FIP (100 μM)	16 μl
BIP (100 μM)	16 μl
F3P (100 μM)	2 μl
B3P (100 μM)	2 μl
LoopFP (100 μM)	8 μl
LoopBP (100 μM)	8 μl
1M Tris-HCl (pH 8.0)*	1 μl
100 mM DTT**	1 μl
D.W.	46 μl
Total	100 μl

*1M Tris-HCl (pH 8.0) (ニッポンジーン 312-90061)

**100 mM DTT (プロメガ P1171)

※Tris-HCl および DTT は必須ではありませんが、凍結融解の影響の低減のため添加をお勧めいたします。添加されない場合は、D.W.で補ってください。

(3) 反応試薬調整

反応液の調整は室温で可能です。PCR チューブに以下のとおり反応液を加えます。複数検体ある場合は、反応数分を 1.5mL マイクロチューブ等で調整した後、ピペティングやタッピングで良く混合してからPCRチューブに分注します。

(1反応分)

WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix*	12.5 μl
LAMP Primer Mix (10X)	2.5 μl

D.W.	8.0 μ l
DNA 溶液	2.0 μ l

(4) LAMP 反応

サーマルサイクラーを用いて 以下の条件で反応します。ヒートブロックでも反応は可能ですが、温度制御の精度が高いものをご使用ください。

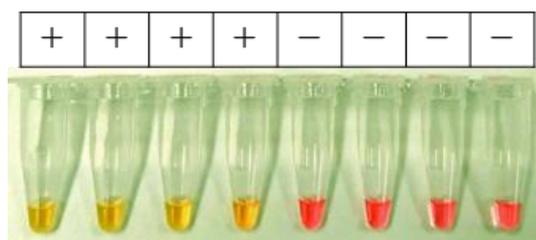
反応条件

①伸長	65°C、30 分
②反応停止	80°C、5 分

(5) 結果の判定

反応液の色調の変化により結果を判定します。陽性はピンクから黄色に変色します。

(反応例)



<注意点等>

- ✓ 反応後のチューブ内には極めて多量の核酸が存在しています。お取り扱いには十分ご注意ください。反応後のチューブを開けることは避けてください。
- ✓ オートクレーブは増幅産物がエアロゾルとなって拡散する恐れがありますので、避けてください。
- ✓ LAMP 法では稀に非特異的な増幅反応が確認される場合があります。
- ✓ 検出対象が微量の場合は、オレンジ色となる場合がございます。

3. 疫学調査とその情報について（事例紹介）

3.1 海水からの検出

<海水のろ過方法の一例>

採水層は水深 1~4m とし、各地点の生簀周辺から 1L の海水をサンプリングしました。



写真 6 吸引ろ過の一例

・直径 47mm の Omnipore Membrane Filter $1\mu\text{m}$ (ミリポア製:親水性 PTFE (テフロン) で海水を吸引濾過後、フィルターは個別にユニパックなどに入れ、 -30°C で一時冷凍保存。ろ過しない海水は、防腐剤 (ProClin 300、シグマ) を添加 (200-300mL) して冷蔵保存が可能であることを確認しました。

*その他補足情報

・フィルターの材質については、核酸抽出試薬への耐性を考えて、ポリカーボネートのアイソポアが必要と考えられましたが、有機溶剤系の試薬を用いない限り、オムニポアで十分です。アイソポアの使用は推奨されますが、安価なオムニポアでも問題ありません。

・海域により、海水の清浄度が異なることから、プレフィルターを適宜選択して使用します。

・採水器は、水道水で洗浄して、使用できます。

・ろ過用のフラスコも水洗いで使用できます。

・DNA 抽出に用いるフィルターの枚数は、DNA 溶出量である $200\mu\text{L}$ 中の DNA 量に影響することを考慮すると 2 枚程度までと考えます。



写真 7 市販の吸引ろ過器

検査方法

マニュアルに従い DNA 抽出を行い、前出の qPCR により *M. seriolae* 遺伝子を定量しました。検出結果は、以下の初期感染動態の把握についての項目で紹介します。

3.2 初期感染動態の把握について（事例紹介）

材料および方法

【天然モジャコ的事例】

モジャコ漁業により採捕され蓄養場および養殖場で飼育されていたブリ天然種苗を定期的に採取し、qPCR と剖検により、体側筋中の *M. seriolae* 遺伝子量およびシスト形成状況を調べ、べこ病の初期感染状況を追跡しました。蓄養場 2 事例、養殖場 1 事例の合計 3 つの調査概要を Table 1 に示しています。

Expt. 1 および Expt. 2 は、鹿児島県の主要なモジャコ蓄養場 2 箇所のべこ病初期感染状況を比較する目的で行いました。蓄養場 A (Expt. 1) では 2015 年 4 月 16 日から 5 月 19 日までの 33 日間、蓄養場 B (Expt. 2) では、2015 年 4 月 17 日から 5 月 11 日までの 24 日間、それぞれ蓄養されていたブリ天然種苗（収容 2 日目の平均魚体重：蓄養場 A、 3.2 ± 0.8 g；収容 1 日目の平均魚体重：蓄養場 B、 1.7 ± 0.5 g）を対象としました。蓄養場 A では生簀収容から 2 日、16 日および 33 日目に、蓄養場 B では同じく 1 日、15 日および 24 日目に、それぞれ 3~9 尾を無作為に取り上げ、*M. seriolae* の感染状況を調査しました。各個体は三枚おろしにし、体側筋肉を 5~10 mm 幅にスライスして、左右体側筋中のシストの数を目視調査し、1 個体あたりのシスト数を計数して、全検査個体におけるシスト検出個体の割合（シスト検出率）および、シストが検出された魚 1 個体中の平均シスト数を算出しました。また半身全体をホモジネートして均質化した組織を 25 mg 採取して DNA を抽出し、qPCR により、筋肉 1 mg あたりの *M. seriolae* 遺伝子量として算出しました。

Expt. 3 は、2015 年 5 月 4 日から 6 月 13 日までの 40 日間、鹿児島県の主要な養殖場 A において飼育されていたブリ天然種苗（収容 1 日目の平均魚体重 0.9 ± 0.2 g）を生簀収容から 1 日、9 日、16 日、24 日、31 日および 40 日目に、それぞれ 10 尾ずつ無作為に取り上げ、上記と同様の方法で剖検と qPCR により感染状況を調査しました。また、サンプリング時における生簀周辺の海水中の *M. seriolae* 遺伝子量についても調べました。

【ブリ・カンパチ人工種苗の事例】

過去にべこ病の発生が高い割合で確認された鹿児島県と愛媛県の 2 つの海域において、ブリまたはカンパチの人工種苗を、海面生簀に收容して *M. seriolae* が感染し得る環境条件やシスト形成までの期間等、べこ病の初期感染状況を調査しました。ブリ人工種苗による自然感染を 2 事例、カンパチ人工種苗による自然感染を 3 事例、合計 5 事例の試験概要を Table 2 に示しました。

Expt. 4 は、水温上昇期の 2018 年 6 月 18 日に、ブリ人工種苗（平均魚体重 1.2 ± 0.3 g、日齢 53）約 1,200 尾を鹿児島県の養殖場 B の海面生簀（ $3.7 \text{ m} \times 3.7 \text{ m} \times 3.7 \text{ m}$ ）に收容し（23 日目以降は 120 尾/生簀）、7 日、10 日、14 日、17 日、22 日、32 日、39 日、46 日および 53 日目に、それぞれ無作為に 10~21 尾ずつ採取して、上記と同様の方法で qPCR と剖検により体側筋中の遺伝子検出からシスト形成に至るまでを追跡調査しました。また、生簀周辺の海水中の *M. seriolae* 遺伝子量についても調べました。

Expt. 5 は、水温上昇期の 2016 年 6 月 30 日に、カンパチ人工種苗（平均魚体重 25.0 ± 3.2 g、日齢 70）約 600 尾を鹿児島県の養殖場 B の海面生簀（ $3.7 \text{ m} \times 3.7 \text{ m} \times 3.7 \text{ m}$ ）に收容し、3 日、7 日および 12 日目に、それぞれ無作為に 10~31 尾ずつ採取して、上記と同様の方法で qPCR と剖検により遺伝子検出からシスト形成に至るまでを追跡調査しました。また、生簀周辺の海水中の *M. seriolae* 遺伝子量についても調べました。

Expt. 6 は、水温上昇期の 2015 年 5 月 25 日に、カンパチ人工種苗（平均魚体重 3.4 ± 0.5 g、日齢 48）約 600 尾を鹿児島県の養殖場 C の海面生簀（ $3 \text{ m} \times 3 \text{ m} \times 3 \text{ m}$ ）に收容し、7 日、14 日、25 日および 29 日目に、それぞれ無作為に 20 尾ずつ採取して、上記と同様の方法で qPCR と剖検により遺伝子検出からシスト形成に至るまでを追跡調査しました。また、生簀周辺の海水中の *M. seriolae* 遺伝子量についても調べました。

Expt. 7 は、水温上昇期と水温下降期のべこ病感染状況を比較するため、2018 年 11 月 20 日から 2019 年 1 月 15 日までの水温下降期に、カンパチ人工種苗（收容 0 日目の平均魚体重 176.6 ± 39.6 g）550 尾を、Expt. 6 と同じ鹿児島県の養殖場 C の海面生簀（ $3.5 \text{ m} \times 3.5 \text{ m} \times 3 \text{ m}$ ）に收容し、7 日および 14 日目にそれぞれ 10 尾ずつ、16 日目に 11 尾、56 日目に 30 尾を無作為に取り上げ、上記と同様の調査を行い、生簀周辺の海水中の *M. seriolae* 遺伝子量についても調べました。

Expt. 8 は、同じく水温下降期のべこ病感染状況をブリで調査するため、Expt. 7 と同時期の 2018 年 11 月 20 日から 2019 年 1 月 28 日にブリ人工種苗（收容 7 日目の平均魚体重 84.2 ± 11.3 g）451 尾を、愛媛県の養殖場 D の海面生簀（ $3 \text{ m} \times 3 \text{ m} \times 3 \text{ m}$ ）に收容し、收容後 7 日、16 日、20 日および 26 日目にそれぞれ 10 尾ずつ、69 日目に 94 尾を無作為に取り上げ、上記と同様の調査を行い、生簀周辺の海水中の *M. seriolae* 遺

伝子量についても調べました。

また、Expt. 3 から Expt. 6 までの水温上昇期における天然または人工種苗の調査・試験結果から、ブリおよびカンパチの *M. seriolae* の感染からシスト形成に至るまでの期間を、海面生簀に種苗を収容し *M. seriolae* 遺伝子が初めて検出されるまでの期間（遺伝子が検出されない期間）、遺伝子検出からシストが形成されるまでの期間、シスト形成後の 3 つに区分し、ベコ病の初期感染動態図として Fig. 1 にまとめています。

結果

【天然モジャコの事例】

Expt. 1 の蓄養場 A の生簀収容 16 日目および Expt. 2 の蓄養場 B における 15 日目のブリ天然種苗体側筋からの *M. seriolae* 遺伝子検出率はそれぞれ 25.0%（平均遺伝子量 $0.62 \sim 2.45 \times 10^1$ copies/mg）と 11.1%（平均遺伝子量 1.24×10^1 copies/mg）でありました（Table 1）。その後、蓄養場 A では 33 日目に、蓄養場 B では 24 日目に遺伝子検出率が 100% となり、遺伝子量もそれぞれ 32 倍、57 倍程度に増加しました。また、両蓄養場とも生簀収容直後に生簀周辺の海水中から、それぞれ 7.09×10^2 copies/L と 5.38×10^2 copies/L の *M. seriolae* 遺伝子が検出されました。しかし、AB 両蓄養場それぞれ 33 日間、24 日間の調査期間中、肉眼観察ではシストは確認されませんでした。

Expt. 3 の養殖場 A では、生簀収容 16 日目に *M. seriolae* 遺伝子が 10 尾中 1 尾から検出され（遺伝子検出率 10.0%、平均遺伝子量 4.36×10^1 copies/mg）、その後遺伝子検出率は 24 日目に 40.0%（平均遺伝子量 4.58×10^4 copies/mg）、31 日目に 90.0%（平均遺伝子量 4.35×10^3 copies/mg）、40 日目に 100%（平均遺伝子量 3.78×10^4 copies/mg）と増加しました。一方、体側筋中にシストが初めて確認されたのは生簀収容 24 日目で（シスト検出率 10.0%、平均シスト数 6.0 個/尾）、40 日目には 40.0%（平均シスト数 6.5 個/尾）に達しました。なお、試験期間中、海面生簀周辺の海水から $1.28 \times 10^2 \sim 1.11 \times 10^4$ copies/L の *M. seriolae* 遺伝子が検出され、水温は 17.5~21.5°C で推移しました（Table 1）。

【ブリ・カンパチ人工種苗の事例】

Expt. 4 のブリ人工種苗を用いた鹿児島県の養殖場 B における試験では、生簀収容 17 日目に *M. seriolae* 遺伝子が 10 尾中 1 尾から検出され（遺伝子検出率 10.0%、平均遺伝子量 9.51×10^2 copies/mg）、その後遺伝子検出率は 22 日目に 28.6%（平均遺伝子量は 4.36×10^8 copies/mg）、32 日目に 100%（平均遺伝子量 6.87×10^5 copies/mg）に達しました。一方、シストが初めて確認されたのは 22 日目（シスト検出率 14.3%、平均シスト数 4.0 個/尾）で、その後 32 日目には 20.0%（平均シスト数 10.0 個/尾）、

39 日目に 100% (平均シスト数 59.1 個/尾) に達しました。なお、試験期間中、生簀周辺の海水から $1.36 \times 10^1 \sim 8.89 \times 10^4$ copies/L の *M. seriolae* 遺伝子が検出され、水温は 23.6~28.5°C で推移しました (Table 2)。

同養殖場 B におけるカンパチ人工種苗を用いた Expt. 5 では、生簀収容 7 日目に *M. seriolae* 遺伝子が 10 尾中 6 尾から検出され (遺伝子検出率 60.0%、平均遺伝子量 8.08×10^4 copies/mg)、その後遺伝子検出率は 12 日目に 9.7% (平均遺伝子量 1.76×10^4 copies/mg) となりました。一方、シストが初めて確認されたのは生簀収容 12 日目 (シスト検出率 9.7%、平均シスト数 1.0 個/尾) でした。なお、試験期間中生簀周辺の海水から $2.01 \times 10^2 \sim 5.74 \times 10^2$ copies/L の *M. seriolae* 遺伝子が検出され、水温は 23.3~25.7°C で推移しました (Table 2)。

同じく水温上昇期に鹿児島県の養殖場 C におけるカンパチ人工種苗のべこ病感染状況を調べた Expt. 6 でも、生簀収容 7 日目に *M. seriolae* 遺伝子が 20 尾中 9 尾から検出され (遺伝子検出率 45.0%、平均遺伝子量 8.51×10^1 copies/mg)、14 日目に 70.0% (平均遺伝子量 1.17×10^2 copies/mg)、25 日目に 100% (平均遺伝子量 1.12×10^7 copies/mg) に達しました。一方、シストは 14 日目までは見られなかったものの、25 日目には検査した 20 尾全てが体側筋中にシストを有していました (シスト検出率 100%、平均シスト数 30.1 個/尾)。なお、試験期間中、海面生簀周辺の海水から $1.56 \times 10^0 \sim 7.99 \times 10^3$ copies/L の *M. seriolae* 遺伝子が検出され、水温は 21.4~24.1°C で推移しました (Table 2)。

一方、Expt. 6 と同じ養殖場 C で水温下降期の 11 月にカンパチ人工種苗を暴露した Expt. 7 では、生簀収容後 14 日目に初めて *M. seriolae* 遺伝子が 10 尾中 3 尾から検出されました (遺伝子検出率 30.0%、平均遺伝子量 2.22×10^3 copies/mg)。シストの形成も遅く、試験終了時 (56 日目) でもシスト検出率は 33.3% (平均シスト数 8.7 個/尾) でした。これは、Expt. 6 の試験終了時 (29 日目) のシスト検出率およびシスト数と比べて有意に低い値となりました (シスト検出率: χ^2 検定、 $p < 0.01$ 、シスト数: Mann-Whitney-U 検定、 $p < 0.01$) (Table 2)。しかし試験期間中、海面生簀周辺の海水からは Expt. 6 と同等の $2.87 \times 10^2 \sim 2.25 \times 10^3$ copies/L の *M. seriolae* 遺伝子が検出されました。水温は 23.1~17.7°C で推移しました (Table 2)。

Expt. 8 で同じく 11 月の水温下降期に愛媛県の養殖場 D に収容したブリ人工種苗でも、感染が確認されるまでの期間が長く、生簀収容 26 日目に初めて *M. seriolae* 遺伝子が 10 尾中 4 尾から検出されました (遺伝子検出率 40.0%、平均遺伝子量 9.30×10^2 copies/mg)。これは Expt. 7 のカンパチ人工種苗に比べ 12 日も遅くなりました。一方、試験終了時 (69 日目) のシスト検出率は 93.6% で、Expt. 7 のカンパチ人工種苗に比べ高い値となりました。試験期間中、海面生簀周辺の海水からは Expt. 7 より高めの $1.40 \times 10^3 \sim 7.70 \times 10^3$ copies/L の *M. seriolae* 遺伝子が検出され、水温は 19.3~14.8°C で推移しました (Table 2)。

ブリでは、海面生簀収容からシスト検出までの期間が最も短かったのは Expt. 4 の 22 日間（遺伝子検出は 17 日目）で、最も長かったのは Expt. 3 の 24 日間（遺伝子検出は 16 日目）でした（Fig. 1）。一方、カンパチでは、最短で生簀収容 7 日目に *M. seriolae* 遺伝子、12 日目にシストが検出されました（Expt. 5）。しかし、Expt. 6 では同様に 7 日目に遺伝子が検出されたものの、シストが検出されたのは 25 日目となりました（Fig. 1）。

結果の要約

- ・過去にべこ病の発生が確認された海域では、生簀周辺の海水から $10^2 \sim 10^3$ copies/L 程度の *M. seriolae* 遺伝子が継続して検出されました。
- ・この海域に種苗を導入すると、ブリでは約 2 週間で体側筋中に *M. seriolae* 遺伝子が検出され、その後約 1 週間でシスト形成に至ることが判明しました。
- ・*M. seriolae* の感染は、冬季（11 月から 1 月）でもブリとカンパチで確認され、感染時期がこれまで考えられていたよりも長いことが明らかとなりました。
- ・カンパチはブリに比べ本症の感受性が高い傾向が窺われました。
- ・シストの形成前に感染の有無を把握するためには、週 2 回のサンプリングと qPCR 法等による検査を行うことが望ましいと考えられました。

表1. 天然モジヤコノペヒ病の初期罹患状況の観察

	年月日	水温	飼育 日数	体重 (g)	尾又長 (cm)	シスト 検出率 (陽性数/観察数)	シスト数 個数/尾 (範囲)	qPCR 検出率 (陽性数/観察数)	<i>M. seriatiae</i> 遺伝子量	
									体側筋 (copies/mg)	海水 (copies/L)
Expt 1 畜養場A(鹿児島県)	2015/4/18	21.5°C	2	3.2 ± 0.8	5.9 ± 0.5	0.0% (0/3)	ND	0.0% (0/3)	ND	7.09 × 10 ²
	2015/5/2	22.1°C	16	20.6 ± 2.8	10.9 ± 0.5	0.0% (0/8)	ND	25.0% (2/8)	0.62-2.45 × 10 ¹	ND
	2015/5/19	21.6°C	33	34.2 ± 4.8	12.7 ± 0.4	0.0% (0/5)	ND	100% (5/5)	4.87 × 10 ² ± 4.69 × 10 ²	ND
Expt 2 畜養場B(鹿児島県)	2015/4/18	21.2°C	1	1.7 ± 0.5	4.8 ± 0.4	0.0% (0/3)	ND	0.0% (0/3)	ND	5.38 × 10 ²
	2015/5/2	22°C	15	23.5 ± 2.8	11.9 ± 0.5	0.0% (0/9)	ND	11.1% (1/9)	1.24 × 10 ¹	ND
	2015/5/11	22°C	24	40.3 ± 5.4	14.0 ± 0.5	0.0% (0/6)	ND	100% (6/6)	7.05 × 10 ² ± 4.02 × 10 ²	ND
Expt 3 養殖場A(鹿児島県)	2015/5/5	17.5°C	1	0.9 ± 0.2	3.9 ± 0.2	0.0% (0/10)	ND	0.0% (0/10)	ND	1.28 × 10 ²
	2015/5/13	18.5°C	9	1.7 ± 0.3	4.9 ± 0.3	0.0% (0/10)	ND	0.0% (0/10)	ND	2.34 × 10 ²
	2015/5/20	19.6°C	16	2.6 ± 0.6	5.7 ± 0.5	0.0% (0/10)	ND	10.0% (1/10)	4.36 × 10 ¹	5.93 × 10 ²
	2015/5/28	20.5°C	24	11.2 ± 2.5	9.1 ± 0.6	10.0% (1/10)	6.0	40.0% (4/10)	4.58 × 10 ⁴ ± 9.14 × 10 ⁴	5.54 × 10 ²
	2015/6/4	21.4°C	31	12.7 ± 2.6	49.9 ± 0.7	10.0% (1/10)	5.0	90.0% (9/10)	4.35 × 10 ³ ± 1.30 × 10 ⁴	1.11 × 10 ⁴
	2015/6/13	21.5°C	40	26.4 ± 6.2	12.3 ± 1.0	40.0% (4/10)	6.5 ± 4.1 (2-12)	100% (10/10)	3.78 × 10 ⁴ ± 6.90 × 10 ⁴	8.02 × 10 ²

飼育日数：海面飼育開始からの日数

シスト検出率：全観察個体中のシスト保有個体の割合(括弧内は：実測のシスト保有個体数)

平均シスト数：目視による体側筋肉中にシスト保有個体の平均シスト数

ND：不検出

M. seriatiae 遺伝子量(体側筋肉)：陽性個体の平均コピー数(±STDEV).

表2. ブリ属人工種苗のペコ病の初期罹患状況の観察

	年月日	水温	飼育 日数	体重 (g)	尾又長 (cm)	シスト 検出率 (陽性数/観察数)	シスト数 個数/尾 (範囲)	qPCR 検出率 (陽性数/観察数)	<i>M. seriolae</i> 遺伝子量	
									体側筋 (copies/mg)	海水 (copies/L)
Expt. 4 ブリ	2018/6/18	24.1°C	0	1.2 ± 0.3	4.3 ± 0.4	0.0% (0/20)	ND	0.0% (0/20)	ND	ND
養殖場 B (鹿児島県)	2018/6/25	23.6°C	7	3.1 ± 0.4	5.8 ± 0.3	0.0% (0/11)	ND	0.0% (0/11)	ND	3.60 × 10 ²
	2018/6/28	24.9°C	10	4.5 ± 1.0	6.2 ± 0.5	0.0% (0/10)	ND	0.0% (0/10)	ND	5.12 × 10 ²
	2018/7/2	24.7°C	14	6.1 ± 1.7	7.1 ± 0.7	0.0% (0/10)	ND	0.0% (0/10)	ND	4.22 × 10 ²
	2018/7/5	26.0°C	17	8.6 ± 1.8	7.8 ± 0.5	0.0% (0/10)	ND	10.0% (1/10)	9.51 × 10 ²	5.38 × 10 ⁰
	2018/7/10	25.4°C	22	13.4 ± 3.6	10.0 ± 0.9	14.3% (3/21)	4.0 ± 2.7 (1-6)	28.6% (6/21)	4.36 × 10 ³ ± 1.08 × 10 ³	8.80 × 10 ²
	2018/7/20	26.8°C	32	21.1 ± 3.7	11.4 ± 0.7	20.0% (2/10)	10.0 ± 8.5 (4-16)	100% (10/10)	6.87 × 10 ⁷ ± 1.59 × 10 ⁵	1.36 × 10 ¹
	2018/7/27	28.5°C	39	25.9 ± 5.4	12.0 ± 0.8	100% (10/10)	59.1 ± 30.5 (7-102)	100% (10/10)	8.52 × 10 ⁷ ± 6.46 × 10 ⁷	2.49 × 10 ³
	2018/8/3	27.6°C	46	31.2 ± 8.0	13.2 ± 0.9	100% (10/10)	27.4 ± 28.9 (5-100)	100% (10/10)	1.25 × 10 ⁷ ± 2.54 × 10 ⁷	5.17 × 10 ⁴
	2018/8/10	27.6°C	53	35.1 ± 8.1	13.8 ± 0.9	100% (20/20)	29.4 ± 23.8 (2-46)	100% (20/20)	5.77 × 10 ⁶ ± 8.01 × 10 ⁶	8.89 × 10 ⁴
Expt. 5 カンパチ	2016/6/30	23.3°C	0	25.0 ± 3.2	10.7 ± 0.4	0.0% (0/20)	ND	0.0% (0/20)	ND	2.01 × 10 ²
養殖場 B (鹿児島県)	2016/7/3	25.0°C	3	27.4 ± 3.6	11.2 ± 0.4	0.0% (0/10)	ND	0.0% (0/10)	ND	4.81 × 10 ²
	2016/7/7	25.7°C	7	33.6 ± 5.9	11.8 ± 0.9	0.0% (0/10)	ND	60.0% (6/10)	8.08 × 10 ⁴ ± 1.11 × 10 ⁵	5.74 × 10 ²
	2016/7/12	25.6°C	12	38.0 ± 7.9	12.7 ± 2.6	9.67% (3/31)	1.0 ± 0.0	9.70% (3/31)	1.76 × 10 ⁴ ± 1.10 × 10 ⁴	2.18 × 10 ²
Expt. 6 カンパチ	2015/5/25	21.4°C	0	3.4 ± 0.5	5.9 ± 0.3	0.0% (0/20)	ND	0.0% (0/20)	ND	2.45 × 10 ⁰
養殖場 C (鹿児島県)	2015/6/1	24.1°C	7	5.0 ± 1.2	6.9 ± 0.5	0.0% (0/20)	ND	45.0% (9/20)	8.51 × 10 ¹ ± 2.78 × 10 ¹	1.56 × 10 ⁰
	2015/6/8	21.9°C	14	7.4 ± 1.8	7.9 ± 0.7	0.0% (0/20)	ND	70.0% (14/20)	1.17 × 10 ² ± 1.59 × 10 ²	7.22 × 10 ²
	2015/6/19	23.5°C	25	12.4 ± 2.4	9.0 ± 0.6	100% (20/20)	30.1 ± 9.8 (10-49)	100% (20/20)	1.12 × 10 ⁷ ± 6.48 × 10 ⁶	3.55 × 10 ²
	2015/6/23	23.2°C	29	12.6 ± 3.0	9.3 ± 0.7	100%* (20/20)	24.1 ± 12.1* (1-51)	100% (20/20)	6.27 × 10 ⁶ ± 3.60 × 10 ⁵	7.99 × 10 ³
Expt. 7 カンパチ	2018/11/20	20.8°C	0	176.6 ± 39.6	20.8 ± 1.6	0.0% (0/10)	ND	0.0% (0/10)	ND	8.98 × 10 ²
養殖場 C (鹿児島県)	2018/11/27	20.6°C	7	180.2 ± 27.9	20.7 ± 1.4	0.0% (0/10)	ND	0.0% (0/10)	ND	5.60 × 10 ²
	2018/12/4	23.1°C	14	216.9 ± 32.4	22.5 ± 1.4	0.0% (0/10)	ND	30.0% (3/10)	2.22 × 10 ³ ± 3.64 × 10 ²	2.25 × 10 ³
	2018/12/6	22.6°C	16	196.0 ± 40.7	21.7 ± 1.9	0.0% (0/11)	ND	63.6% (7/11)	2.20 × 10 ³ ± 1.26 × 10 ³	2.87 × 10 ²
	2019/1/15	17.7°C	56	261.7 ± 49.9	24.3 ± 1.6	33.3%* (10/30)	8.7 ± 4.1* (2-16)	93.3% (28/30)	1.22 × 10 ⁵ ± 2.50 × 10 ⁵	1.10 × 10 ³
Expt. 8 ブリ	2018/11/20	19.3°C	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.70 × 10 ³
養殖場 D (愛媛県)	2018/11/27	18.8°C	7	84.2 ± 11.3	NA	0.0% (0/10)	ND	0.0% (0/10)	ND	7.70 × 10 ³
	2018/12/6	19.0°C	16	101.5 ± 18.9	NA	0.0% (0/10)	ND	0.0% (0/10)	ND	1.40 × 10 ³
	2018/12/10	18.2°C	20	100.7 ± 18.9	NA	0.0% (0/10)	ND	0.0% (0/10)	ND	6.40 × 10 ³
	2018/12/16	17.8°C	26	97.5 ± 14.5	NA	0.0% (0/10)	ND	40% (4/10)	9.30 × 10 ² ± 7.47 × 10 ²	3.70 × 10 ³
	2019/1/28	14.8°C	69	154.2 ± 24.2	NA	93.6% (88/94)	NA	90% (27/30)	1.30 × 10 ⁶ ± 1.20 × 10 ⁷	ND

飼育日数：海面飼育開始からの日数

シスト検出率：全観察個体中のシスト保有個体の割合（括弧内は：実際のシスト保有個体数）

平均シスト数：目視による体側筋肉中にシスト保有個体の平均シスト数

ND：不検出

NA：実施せず

M. seriolae 遺伝子量（体側筋肉）：陽性個体の平均コピー数（±STDEV）。

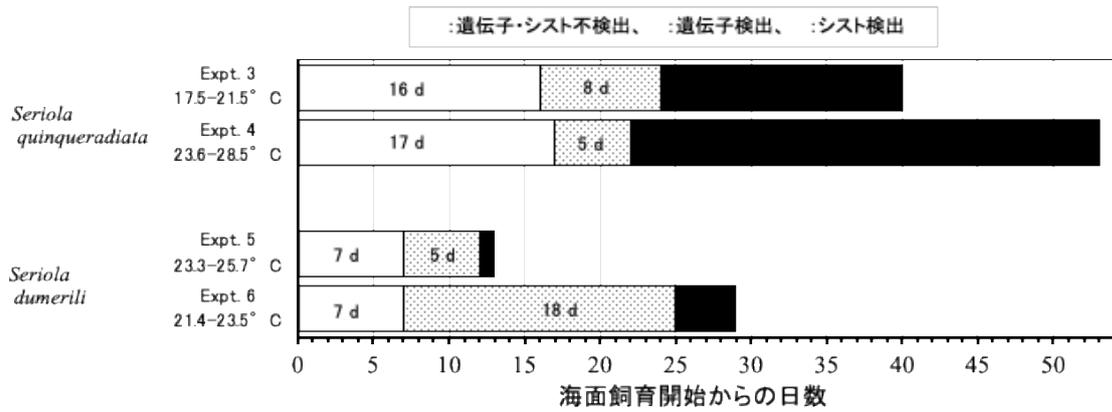


図 1. 異なる水温で実施した飼育試験におけるブリおよびカンパチ体側筋肉からの *M.seriolae* 遺伝子およびシスト検出状況 (各バーの数値は, 期間を日数で示しています).

【参考文献】

- 横山博 (2013) : べこ病にへこまない対策、養殖ビジネス、第 50 巻 11 号、pp. 22-25.
- 横山博 (2015) : クローズアップ ここまで来た! 魚病対策の最前線 ブリ類養殖におけるべこ病対策、養殖ビジネス、第 52 巻 6 号、pp. 7-10.
- Yokoyama, H. (2017): Beko disease of cultured fish in Japan. *Fish Pathol.*, **52**, 181-185.
- 江草周三 (1998) : 原虫症. 改訂増補魚病学 (江草周三編), 恒星社厚生閣, pp.219-274.
- Egusa, S. (1982): A microsporidian species from yellowtail juveniles, *Seriola quinqueradiata*, with “Beko” disease. *Fish Pathol.*, **16**, 187-192.
- Yokoyama, H., F. Yokoyama, J.-Y. Zhang, K. Tsuruoka and K. Ogawa (2008): Microsporidian infection in the trunk muscle of hatchery-bred juvenile spotted halibut *Verasper variegatus*. *Fish Pathol.*, **43**, 137-143.
- Zhang, J. Y., F. Meng, H. Yokoyama, J. Miyahara, I. Takami and K. Ogawa (2010): Myxosporean and microsporidian infections in cultured Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* in Japan. *Fish. Sci.*, **76**, 981-990.
- 横山博・長澤和也 (2014) : 養殖魚介類の寄生虫の標準和名目録. *生物圏科学*. 53:73-97.
- Kano, T., T. Okauchi and H. Fukui (1982): Studies on *Pleistophora* infection in eel *Anguilla japonica*. II. Preliminary test for application of fumagillin. *Fish Pathol.* **17**, 107-114.
- 高橋 誓・江草周三 (1976) : アユのグルギア症に関する研究-II. 防除法の検討 (1) フマジリン経口投与の効果. *魚病研究.*, 11(2), 83-88.
- Sano, M., J. Sato and H. Yokoyama (1998): Occurrence of beko disease caused by *Microsporidium seriola* (Microspora) in hatchery-reared juvenile yellowtail. *Fish Pathol.*, **33**, 11-16.
- 柳宗悦 (2018) : 「よくわかる! 魚病対策と水産用医薬品」第 1 章魚種別にみる疾病発生動向と対策、養殖ビジネス臨時増刊号、第 55 巻 4 号、pp.- 14-18.
- Yokoyama, H., D. Ayado, J. Miyahara, K. Matsukura, I. Takami, F. Yokoyama and K. Ogawa (2011): Infection dynamics of *Microsporidium seriola* (Microspora) causing the beko disease of *Seriola* spp. *Fish*

Pathol., **46**, 51-58.

【このマニュアルの出典】

Mekata T., J. Satoh, Y. Ishii, S. Harakawa, H. Kawakami and S. Yanagi (2021): Development of real-time PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection of *Microsporidium seriolae*. *Fish Pathol.*, 56 (2), 53-61.

柳宗悦・佐藤純・今岡慶明・川上秀昌・原川翔伍・米加田徹・中易千早・森広一郎 (2021): ブリ類におけるべこ病の初期感染動態. 魚病研究. 56 (2), 89-96.

【内容に関するお問い合わせ】

病理部

電話: 0599-66-1872 or 0596-58-6424