

農林水産省戦略的プロジェクト研究推進事業

「国内主要養殖魚の重要疾病のリスク管理技術の開発」

成果普及資料

ニジマスの非致死性皮膚炎ラッシュ

診断・防除マニュアル

水産研究・教育機構 水産技術研究所 養殖部門 病理部

静岡県水産・海洋技術研究所

令和6年3月

目次

はじめに	2
1. ラッシュの原因と特徴	3
1.1 原因病原体	3
1.2 外観症状	3
1.3 病理組織観察	4
1.4 水温	5
1.5 季節性	5
1.6 発症や治癒までに要する期間	5
1.7 発症サイズ	5
2. ラッシュの診断	5
2.1 外観の確認	5
2.2 PCR 法	5
2.3 定量 PCR 法	6
2.4 無症状魚の保菌検査用 DNA 試料の調製	7
3. 被害軽減のための飼育管理	7
3.1 低水温で飼育	8
3.2 物理的な遮断	8
3.3 発症までに要する期間の考慮	8
3.4 抗菌剤投与	8
3.5 密度	8
3.6 垂直伝播	8
参考文献	9
付録 被害リスク低減のためのチェックシート	10
リスクが高くなる要因	10
リスクを低くするための管理	10

はじめに

養殖ニジマスに経済的被害を与える非致死的な皮膚炎として「ラッシュ」が知られている。日本では1990年代初頭から本症が顕在化し、静岡県、山梨県、愛知県、長野県および岐阜県から発生が報告されている (Kfoury *et al.*, 1996)。罹患率は、多い時には48%にも及ぶ。本症は10 cm程度から成熟した大型の個体に認められるが、レギュラーサイズと呼ばれる120 g程度の(塩焼きに利用される)大きさのニジマスでの発生報告が多い。本症は発症から4~8週間で自然治癒する。夏季に多く発症する傾向があり、高水温で発症しやすい可能性が指摘されている (Kfoury *et al.*, 1996)。ラッシュ罹患魚には、顕著な皮膚の盛り上がりを伴わない炎症が腹面や体側面に散在し、その外観としては点状出血型、黄変型および潰瘍型がある。潰瘍型やそれが原因で生じる死亡には、水かび病 (*saprolegniosis*) との関係が指摘されている (Kfoury *et al.*, 1996)。病理組織学的に、本症は亜慢性な細胞浸潤を伴う皮膚炎である。細胞浸潤は表皮、真皮および皮下の広範に生じており、皮膚の肥厚が認められる。重症化した場合には細胞浸潤が筋繊維間の結合組織にも観察される。一方で、これら以外の臓器に病変は認められない (Kfoury *et al.*, 1996)。一般的な魚病検査で使われるウイルス分離や細菌分離では、主因と考えられる病原体は分離されず、原因は不明のままであった。類似した症状を示す疾病として海外で発生が見られるレッドマークシンドローム (RMS) やストロベリーシンドローム、US ラッシュが知られているが、これらと本症との関連は不明である。この度、農林水産省 安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業「国内主要養殖魚の重要疾病のリスク管理技術の開発」において、本症の原因究明と特徴、診断および防除に関する知見が得られたため、その内容を幅広く周知する目的で本資料を作成した。

1. ラッシュの原因と特徴

1.1 原因病原体

ラッシュの原因病原体は、病変部の次世代シーケンス解析を始めとするメタトランスクリプトーム解析の結果から、リケッチアに近縁なアルファプロテオバクテリア綱に属する未同定の細菌 *Holospira-like organism* (HLO) (仮称) であると考えられる。

1.2 外観症状

典型的な外観症状として、体側や腹側に鮮やかな赤色の皮膚炎が認められる。真皮に点状の出血がしばしば確認されるが、その程度は部位や個体によって異なる (写真1 A, B)。鱗による光の反射が生じないためか、透明感があり黄味がかった皮膚炎を呈する個体も散見される (写真1C)。



写真1 実際の養鱒池で確認されたレギュラーサイズのラッシュ発症魚

1.3 病理組織観察

ラッシュ発症魚には真皮から皮下にかけて重度の細胞浸潤が認められ、上皮が消失する場合もある。鱗嚢やその周辺の真皮には水腫が生じ、正常皮膚と比較して顕著に肥厚する。破骨細胞（矢印）が鱗（S）を消化する像がしばしば観察され、完全に鱗が消失する場合もある。真皮の至る所に出血が認められる（*）。

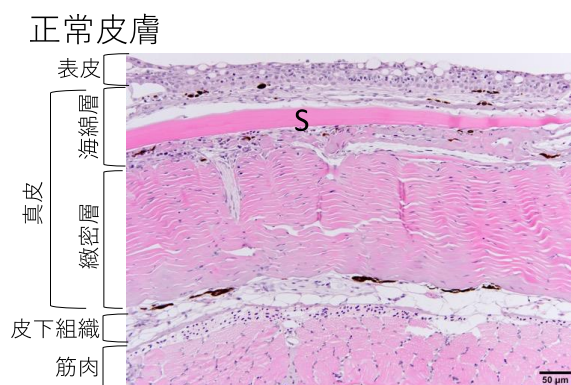
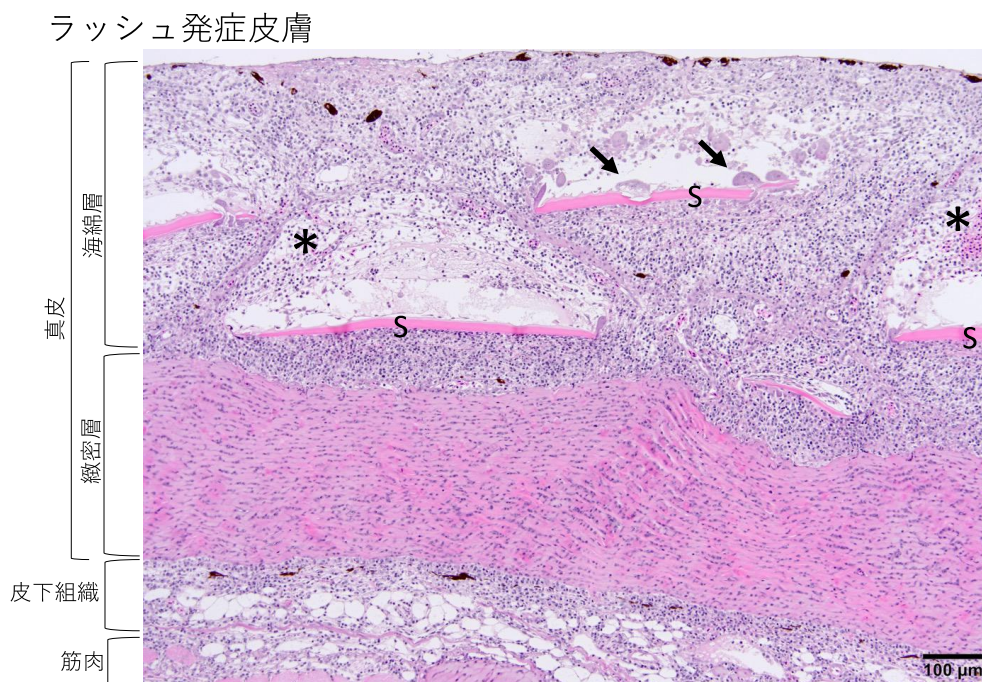


写真2 ラッシュ発症ニジマスの皮膚の病理組織像
(ヘマトキシリン・エオジン染色)

発症皮膚の真皮から皮下にかけてヘマトキシリンで青紫色に染色された浸潤細胞の核（核酸）が無数に観察される。

1.4 水温

用水の温度が 10°C から 15°C の範囲で本症の発生は確認されている。ラッシュ発生池内の無症状魚を実験室内に移動し 6 週間飼育した場合、12°C 飼育よりも 16°C 飼育での発症率が高くなったことから、高水温の方が発症し易いか、もしくは発症までに要する時間が短くなると考えられる。

1.5 季節性

ラッシュの発症に季節性は認められなかった。

1.6 発症や治癒までに要する期間

水温 16°C 程度で行った試験では、ラッシュ発症魚と HLO 感染を受けていない健康魚を同居させた場合、明らかな発症を確認するまでに 5 週間程度を要した。また、発症個体の症状が消失するまでに 2 週間以上を要すると考えられた。



写真3 時間経過に伴うラッシュの治癒

1.7 発症サイズ

魚体サイズに関わりなく発症すると考えられる。養魚場の調査でラッシュ発症が確認された最小個体は魚体重 65 g、最大個体は魚体重 2,536 g であった。

2. ラッシュの診断

2.1 外観の確認

外観症状からラッシュの疑いがあるかどうか判断する。点状出血や黄色味がかかった皮膚炎病巣が体側・腹部に確認されれば以下に示す PCR を用いた診断を行う。

2.2 PCR 法

HLO の遺伝子を標的にした PCR により検出および診断を行う。HLO が多く含まれると考えられる、皮膚炎病巣の辺縁組織を DNA 抽出用の試料として利用することが好ましい。DNA 抽出には市販の DNA 抽出キットを使用すると時間の短縮につながる。

材料および機材; 試料となる組織 (20 mg 程度)、市販 DNA 抽出キット (QIAamp

DNA Mini kit, キアゲン)、プレミックスタイプ PCR 試薬 (Gene RED PCR Mix Plus, ニッポン・ジーン)、サーマルサイクラー、電気泳動装置
プライマー；

JP_rash-F ACGCTCTTGCAGTTTTTCACAGTCGTA

JP_rash-R GTCAATAAAATTCGCGGTGGTTTGAAG

PCR 反応液の調製；反応液の調製は Gene RED PCR Mix Plus の取扱説明書に従う。反応スケールは 20 μ L で実施する。各プライマーは終濃度が 0.2 μ M に調節し、ここへ市販 DNA 抽出キットを用いて試料から抽出した DNA を 1～2 μ L 加える。

反応液組成	(1 反応あたり)
Gene Red PCR Mix Plus	10 μ L
JP_rash-F (10 μ M) (終濃度 0.2 μ M)	0.4 μ L
JP_rash-R (10 μ M) (終濃度 0.2 μ M)	0.4 μ L
DNA サンプル	1.0～2.0 μ L
Nuclease-free water	反応スケール 20 μ L に調節
Total	20 μ L

PCR 反応；95°Cで3分間熱処理を行う。次いで、95°Cで30秒間、65°Cで30秒間、72°Cで1分間を35サイクル行い、最後に72°Cで5分間反応を行う。
増副産物サイズ；321 bp

2.3 定量 PCR 法

PCR 法と共通のプライマーセットと専用に設計された蛍光標識プローブを使用する。

材料および機材；試料となる組織、DNA 抽出キット (QIAamp DNA Mini kit, キアゲン)、プレミックスタイプ定量 PCR 試薬 (FastStart Essential DNA Probe Master Mix, ロッシュ)、検量線を求めるための標準 DNA 試料 (水産技術研究所 病理部から配布可能)、定量 PCR 装置 (LightCycler® 96 System 等)

プライマー； JP_rash-F ACGCTCTTGCAGTTTTTCACAGTCGTA

JP_rash-R GTCAATAAAATTCGCGGTGGTTTGAAG

プローブ； JP_rash-probe FAM-TCGTCGCAAAGCAATGCTTGAAGACA-BHQ1

定量 PCR 反応液の調製；反応液の調製は FastStart Essential DNA Probe Master Mix の取扱説明書に従う。反応スケールは 15 μ L で実施する。各プライマーは終濃度が 0.33 μ M となるように、プローブは終濃度が 0.2 μ M となるように反応液中に添加する。ここへ市販 DNA 抽出キットを用いて試料

から抽出した DNA を 1~2 μL 加える。

反応液組成	(1 反応あたり)
FastStart Essential DNA Probe Master Mix	10 μL
JP_rash-F (10 μM) (終濃度 0.33 μM)	0.5 μL
JP_rash-R (10 μM) (終濃度 0.33 μM)	0.5 μL
JP_rash-probe (4 μM) (終濃度 0.2 μM)	0.75 μL
Nuclease-free water	反応スケール 15 μL に調節
Total	15 μL

定量 PCR 反応；はじめに 95°C で 10 分間熱処理を行う。次いで、95°C で 10 秒間、62°C で 1 分間を 45 サイクル行う。

2.4 無症状魚の保菌検査用 DNA 試料の調製

ラッシュ好発部位（特に胸鰭間部と腹鰭前部、写真 4）と考えられる腹部の皮膚を尾鰭側からメスで擦り粘液を掻き取る。作業の際には、メスの刃を皮膚に対して直角に当てると良い。また、粘液だけでなく多少の鱗が回収できる程度の強さで擦ると良い。市販の DNA 抽出キット (QIAamp DNA Mini kit 等) を利用して、回収した粘液の 50 μL ほどから DNA を抽出する。これを DNA 試料として、(2) -2 の PCR 法による検査を実施する。

胸鰭間部



腹鰭前部



写真 4 ラッシュの好発部位

3. 被害軽減のための飼育管理

本症は非致死性であるが、発症魚はその外観症状から商品的価値を損なう。罹患率が高くなることがあるため防除が重要である。本症の防除に資する情報を紹介する。

3.1 低水温で飼育

本症は飼育水温が 12°C よりも 16°C でより発症しやすくなることから、水温が低い養魚池で飼育することが望ましい。

3.2 物理的な遮断

ラッシュ発症魚からの HLO の水平伝播が確認されている。ラッシュ発症ロットと非発症ロットを混ぜて飼育することは避け、ロットごとに分けて飼育管理することが望ましい。また、ラッシュ発症ロットを養魚場内の上流で飼育することも避けることが望ましい。発症魚を外部から持ち込まないことが重要である。

3.3 発症までに要する期間の考慮

ラッシュ発症魚と HLO 感染を受けていない健康魚を同居した場合、この健康魚に目視で発症が確認されるまでには 5 週間程度を要する。したがって、出荷時に発症魚のいる汚染区域に非発症ロットを短期間収容するのであれば問題は無い。本症は非致死性であり発症から 2 週間以上の飼育で自然治癒が見込めることから、発症魚の鮮魚出荷を止め別用途にむけた蓄養などの対策が考えられる。

3.4 抗菌剤投与

本症の治療目的で承認された水産用抗菌剤は無い。ただし、本研究により HLO に感染したニジマス (平均魚体重 124.2 g) に対して、塩酸オキシテトラサイクリン (50 mg [力価]/kg・日) の 5 日間連続投与を 14 日インターバルで 2 回施した場合には、ラッシュの発症が抑制され、さらに投薬魚の皮膚や飼育水中からも HLO が検出されなくなることが示されている。本薬剤は淡水養殖されたにしん目魚類のビブリオ病やせっそう病の治療薬であり、30 日間の使用禁止期間が定められている。

3.5 密度

飼育密度と発症率の間に明確な関係性は認められなかった。ただし、出荷が滞るなどひとつの池に複数のロットが長期間飼育される状況下では多くの発症魚が観察された。同一池内で複数ロットを長期間混ぜて飼育することは避けるべきである。

3.6 垂直伝播

ヨード剤消毒した受精卵から生産した約 26,000 尾のニジマス種苗を 14°C の汲み上げ地下水で一年間飼育してもラッシュの発症は確認されなかった。さらに、HLO が常在する環境下で飼育された雌親魚の体腔液からは PCR 検査で HLO が検出されなかった。したがって、HLO は垂直伝播しにくいと考えられる。卵消毒した卵や感染履歴のない種苗を導入するなど、外部から発症ロットを持ち込まないような飼育

管理が重要である。

参考文献

Kfoury, J. R., Okamoto, N., Tanaka, M., Yoshimizu, M., LaPatra, S. E., & Maita, M. (1996). "Rash" Skin Disease of Rainbow Trout. *Fish Pathology*, 31(4), 197–201.

付録 被害リスク低減のためのチェックシート

ニジマスラッシュによる被害リスクを低減するために日ごろから意識してほしい項目をリストアップしました。養鱒場ごとに実施可能な項目は違ってくと思いますが、現在の体制を一度確認してみましょう。特に、リスクが高くなる要因に多くチェックが付いた場合は、リスクを低くするための管理をより意識してみてください。

リスクが高くなる要因

- 過去にラッシュが発生したことがある。
- 異なるロットを同じ池で飼育することがある。
- 養鱒池の最上流に大型個体やラッシュ発症歴がある魚を飼育している。

リスクを低くするための管理

- ラッシュ発症の疑いや履歴があるロットを最下流の池で飼育する。
- ラッシュ発症の疑いや履歴があるロットを上流に移動しない。
- 養殖にはヨード剤消毒された受精卵から生産した種苗を用いる。
- 器具や手足の消毒など日常的に実施している飼育管理を行う。
- やみくもに複数のロットを同一池に収容しない。どうしても収容しなければいけない場合には出荷前の1ヶ月以内に留める。