

1. 病名		中腸腺微孢子虫症 Hepatopancreatic microsporidiosis (HPM) 学名からEHPと称されることがある。
2. 病原体		微孢子虫 <i>Enterocytozoon hepatopenaei</i>
	a) 分類 ¹⁾	Eukaryota 真核生物 superphylum (上門) Opisthosporidia (この分類群は菌類の姉妹群とされる) phylum Microsporidia (微孢子虫門) family Enterocytozoonidae (科) <i>Enterocytozoon</i> (属)
	b) 形態 ¹⁾	孢子は卵型で、短径0.7 x 1.1 μm
	c) 特徴 ¹⁾	電顕観察によれば、成熟孢子は1個の核を持ち、極管は直径75nmほどで孢子殻の内側を一重に5-6回旋回する。孢子殻は電子密度の低いendospore(10nm)と電子密度の高いexospore(2nm)からなる。
3. 地理的分布		タイ ¹⁾²⁾ , ベトナム ²⁾ , インド ^{4), 9)} , インドネシア, マレーシア, 中国
4. 宿主		ブラックタイガー <i>Penaeus monodon</i> , バナメイエビ <i>Penaeus vannamei</i> クルマエビへの感染性も疑われる。
5. 発生情報		
	a) 潜伏期間	不明
	b) キャリアー	不明
	c) 感染経路	水平感染によるものと思われる ⁷⁾ 。
	d) ベクター	不明
	e) 蔓延状況(死亡率、罹患率など)	本疾病による死亡報告は無い。文献2)において、感染実験のために対照群として準備したバナメイエビの1/3がPCRで陽性になった。また、インドでの事例では調査したバナメイエビの63.5%が陽性を示した ⁶⁾ 。
	f) 感染ステージ	少なくともポストラーバ以降は感染する。
	g) 感染要因	不明
6. 症状		
	a) 臨床症状	エビ自体には特徴的な外観症状はないが成長が阻害され ³⁾ 被害が起きる。大量死は報告されていない。水面に浮かぶ白いフンをする(white faeces syndrome)という症状が <i>E. hepatopenaei</i> の感染と相関するという報告もあるが ⁶⁾ 、文献2)によれば白いフンと <i>E. hepatopenaei</i> の感染とは直接の関係はないという。
	b) 組織検査 ¹⁾²⁾ ⁶⁾	中腸腺の上皮細胞に寄生し、細胞質中で成熟孢子が発達する。上皮細胞中に多くの孢子がある場合は部分的に上皮の崩壊が見られることもある。他の組織に異常は認められない。
7. 検査法		
	a) 標的器官	中腸腺上皮細胞
	b) 簡易検査法	中腸腺のスタンプ標本を作製し、Uvitex2Bで蛍光染色し、蛍光顕微鏡を用いてUV励起で孢子を観察する。蛍光染色でなくとも通常のメイグリュンワルドーギムザ染色などにより明視野顕微鏡で診断可能だが、いずれにせよ微孢子虫の種まで同定することはできない。
	c) サーベランス	PCR ¹²⁾ 、Nested PCR ⁸⁾ ないしLAMP法 ⁵⁾¹¹⁾ 。
	d) 確定診断	PCR ¹²⁾ 、Nested PCR ⁸⁾ ないしLAMP法 ⁵⁾¹¹⁾ 。一部の遺伝子配列が公開されているので、これら以外の適当なプライマーで遺伝子を増幅し、配列決定をすることで確定診断可能である。なお、シリンジで中腸腺のバイオプシーを行いPCR検査をすることによってエビを生かしたまま検査可能であるという ¹⁰⁾ 。LAMP法を報告している文献には5)と11)があるが、後から報告された文献11)には5)が引用されておらず、比較できない。
	Nested PCRについて	文献8)によるnested PCRを示す。文献2)はSSUrDNAを標的にしたnested PCRを報告しているが、文献8)によれば、文献2)の方法は近縁の微孢子虫による擬陽性バンドが出現し、また、感度もここに記載する文献8)の方法より劣るという。
	DNA抽出法	中腸腺組織を5μg/mlのproteinase Kを含む500μLのバッファ中でホモジナイズし、55°Cで30分間インキュベートする。バッファの組成は以下のとおり。 50 mM Tris (pH 9) 50 mM NaCl 0.1M MEDTA (pH 8) 2% SDS ここから市販のDNA抽出キットを用いてDNAを抽出する。

プライマー、産物サイズ	<p>【PCR法】★こちらの方法を推奨 EHP-510F: GCCTGAGAGATGGCTCCCACGT EHP-510R: GCGTACTATCCCCAGAGCCCGA 産物サイズ: 510 bp</p> <p>【Nseted-PCR法】(従来の方法) First step PCR SWP 1F: TTGCAGAGTGTTGTTAAGGGTTT SWP 1R: CACGATGTGTCTTTGCAATTTTC 産物サイズ: 514bp</p> <p>Nested step PCR SWP 2F: TTGGCGGCACAATTCTCAAACA SWP 2R: GCTGTTTGTCTCCAAGTATTTGA 産物サイズ: 148bp</p>
プロトコル	<p>【PCR法】 (1) Pre-denaturation 94°C 3min. (2) 以下を35サイクル 94 °C 30sec. 60 °C 30sec. 72 °C 30sec (3) Final extension 72 °C 5 min</p> <p>【Nested-PCR法】 First step PCR (1) Pre-denaturation 95°C 5min. (2) 以下を30サイクル 95 °C 30sec. 58 °C 30sec. 68 °C 45sec (3) Final extension 68 °C 5 min</p> <p>Nested step PCR (1) Pre-denaturation 95°C 5min. (2) 以下を20サイクル 95 °C 30sec. 64 °C 30sec. 68 °C 20sec (3) Final extension 68 °C 5 min</p>
8. 対策	
a) 殺菌・滅菌方法	-
b) ワクチン	-
c) その他	-
9. 発生事例	上記発生国ではかなりまん延していると思われるが、死亡があまり起こらないため、発生がはっきり認識されないものと推測される。
10. その他	-

出典

- 1) Tourtip, S. et al. (2009) Enterocytozoon hepatopenaei sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102, 21–29.
- 2) Tangprasittipap, et al. (2013) The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *BMC Veterinary Research*, 9, 139–149 Tangprasittipap et al. 2013. *BMC Vet Res*. 9:139–149
- 3) Chayaburakul et al.(2004) Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60, 89–96.
- 4) Managing *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), microsporidial infections in vannamei shrimp farming: An advisory. 2016, CIBA e-publication No. 29, Indian Council of Agricultural Research, Govt. of India.
- 5) Suebsing, R. et al. (2013) Loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric nanogold for detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* in penaeid shrimp. *Journal of Applied Microbiology*, 114, 1254–1263.
- 6) Rajendran, K. V. et al. (2016) Emergence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in farmed *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in India. *Aquaculture*, 454, 272–280.
- 7) Salachan, P. V. et al. (2017) Laboratory cohabitation challenge model for shrimp hepatopancreatic microsporidiosis (HPM) caused by *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). *BMC Veterinary Research*, 13, 9–15.
- 8) Jaroenlak, P., et al. (2016) A nested PCR assay to avoid false positive detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in environmental samples in shrimp farms. *PLoS ONE* 11(11): e0166320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166320>
- 9) Behera, B. K., et al. (2019) Prevalence of microsporidian parasite, *Enterocytozoon hepatopenaei* in cultured Pacific white shrimp,

Litopenaeus vannamei (Boone, 1931) in West Bengal, east coast of India. *Aquaculture International*, 27, 609–620.

10) Cruz-Flores, R., et al. (2019) Detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* using an invasive but non-lethal sampling method in shrimp (*Penaeus nannamei*). *J. Microbiol. Methods* 162, 38–41.

11) Cai S-X., et al (2018) Real-time loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Enterocytozoon hepatopenaei*. *PeerJ* 6:e5993 DOI 10.7717/peerj.5993

12) Tang, K. F. J., et al (2015): Development of in situ hybridization and PCR assays for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, 130, 37–41.