

戦略的プロジェクト研究推進事業（令和元年度／国庫委託）

「アユの異型細胞性鰓病の発病原因の解明と防除法の開発」

－異型細胞性鰓病の病徴の再現－

石川孝典・西村友宏・森竜也・石原学・久保田仁志・和田新平¹・佐野元彦²

目的

アユの異型細胞性鰓病（ACGD）は、細菌性冷水病と同様に大きな魚病被害を生じさせている。しかし、発症メカニズムの解明や予防方法の開発には未だに至っていない。そこで、ACGDの主因として疑われるアユポックスウイルス（PaPV）に注目し、人為感染試験により病徴の再現を試みた。

I 1回目感染試験

材料および方法

供試魚 県漁連で生産された人工種苗を当场で育成した平均体重 9.8g のアユ（全雌系）を用いた。

観察期間 2019年6月11日から7月5日までの25日間。

設定区 ACGD 病魚鰓を磨砕した液に供試魚を浸漬した未濾過区、前述の磨砕液を遠心分離し、その上清を 450nm フィルターで濾過した濾過液に浸漬した濾過区 2 区設定し、さらに MEM に浸漬した対照区を 1 区設けた（表 1）。

接種源 2019年4月に栃木県内生産者の飼育池で自然発症した ACGD 発症魚（平均体重 7.7g）から切り出した鰓を接種源調整の材料とした。鰓を滅菌珪砂とともに磨砕し、MEM（HEPES 緩衝, pH7.4）で 5 倍希釈し未濾過液とした。さらに未濾過液を 2,330g で 10 分間の遠心分離により上清を得た。その上清を分取して 450nm フィルターで濾過し、濾過液とした。なお、磨砕液および濾過液の PaPV の DNA コピー数はそれぞれ 6.0×10^9 DNA コピー/mL および 4.8×10^9 DNA コピー/mL であった。

接種方法 浸漬接種とし、前述の供試魚を鰓組織重量換算で 1,000 倍希釈とした未濾過液および濾過液にエアレーションしながら 2 時間浸漬した。

飼育条件 水量を約 360L としたヨーロッパアンタイプ FRP 水槽に、オゾン殺菌河川水（水温 17.5–22.1 °C）を換水率 10 回/日の割合で注水し、供試魚を 100 尾/区の密度で収容し、飼育観察を開始した。飼育期間中は魚体重の 3.0%を目安に配合飼料を毎日給餌したが、発症により接種 17 日後から全区で餌止めを行った。

サンプリング 3 日おきに各区から 5 尾ずつランダムにサンプリングした。

ムにサンプリングした。

観察項目 毎日、遊泳状況や摂餌状況を観察した。また、サンプリングした供試魚および死魚（瀕死魚）は鰓の肉眼観察（異常が疑われるものは顕微鏡観察）をし、前掲課題と同様の条件で PaPV の PCR 検査を実施した。さらに、鰓をリン酸緩衝 10%ホルマリン液で固定後、常法によりパラフィン薄切標本を作製し、H&E 染色の後、鰓弁の状態や異型細胞の有無など ACGD に特徴的な病徴を観察した。

表 1 設定区及び接種方法

区名	供試尾数	接種物	接種方法
未濾過区A	100	鰓磨砕液, 病魚鰓組織重量換算で1/1,000希釈	浸漬, 2時間
未濾過区B	100		
濾過区A	100	濾過液, 病魚鰓組織重量換算で1/1,000希釈	
濾過区B	100		
対照区	100	MEM	

結果および考察

飼育および死亡状況 飼育期間中、対照区では異常や死亡は確認されなかった。一方で、未濾過区および濾過区では接種 17 日後から異常遊泳および鰓蓋が開く個体が目立ち、死亡も始まった（図 1）。その後、接種 24 日後までは死亡が続いた。これらの状況から ACGD が発症したものと推定した。

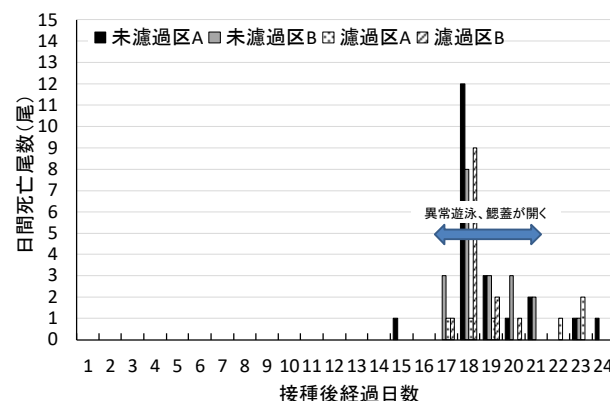


図 1 日間死亡尾数の変化

PaPV の保菌 未濾過区 A では、接種 3 日後から PaPV 陽性となる個体が確認された。接種 6 日後から各区ともに陽性率が上昇、濾過区 B を除き接種 24 日後まで

¹ 日本獣医生命科学大学, ² 東京海洋大学

陽性が続いた（表 2）。なお、接種 21 日後に対照区においても陽性個体が生じたため、防疫等の試験体制の不備があったものと考えられる。

表 2 サンプルング魚の PaPV の陽性尾数の変化

区名	3日後	6日後	9日後	12日後	15日後	18日後	21日後	24日後
未濾過区A	1/5	5/5	1/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
未濾過区B	0/5	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5
濾過区A	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	1/5
濾過区B	0/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	1/5	3/5
対照区	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	3/5	0/5

異型細胞陽性魚の出現状況 飼育期間中、対照区では異型細胞や鰓弁の異状は観察されなかった（表 3）。一方で、未濾過区 B では接種 6 日後には異型細胞が生じ、接種 12 日後には各接種区で異型細胞が観察された。接種 15 日後にはサンプルングした供試魚のほとんどに異型細胞が観察され、18 日後には異型細胞の増加に伴い鰓弁が棍棒化した個体も観察された。

表 3 サンプルング魚の異型細胞の陽性尾数の変化

区名	3日後	6日後	9日後	12日後	15日後	18日後	21日後	24日後
未濾過区A	0/5	0/5	0/5	3/5	4/5	4/5	5/5	4/5
未濾過区B	0/5	2/5	5/5	1/5	5/5	5/5	2/5	2/5
濾過区A	0/5	0/5	1/5	5/5	4/5	4/5	3/5	1/5
濾過区B	0/5	0/5	0/5	3/5	5/5	5/5	4/5	0/5
対照区	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

表 4 死亡魚の PaPV および異型細胞の陽性尾数の変化

区名	接種後日数	死亡尾数	PaPV		異型細胞	
			陽性尾数	陽性率(%)	陽性尾数	陽性率(%)
未濾過区A	15	1	1	100	0	0
	18	12	12	100	12	100
	19	3	2	67	2	67
	20	1	1	100	1	100
	21	2	2	100	1	50
	23	1	1	100	1	100
	24	1	1	100	1	100
	合計	21	20	95	18	86
未濾過区B	17	3	3	100	3	100
	18	8	7	88	6	75
	19	3	3	100	2	67
	20	3	3	100	3	100
	21	2	2	100	2	100
	23	1	1	100	0	0
	合計	20	19	95	16	80
濾過区A	17	1	1	100	0	0
	18	1	1	100	1	100
	19	1	1	100	1	100
	22	1	1	100	0	0
	23	2	2	100	0	0
	合計	6	6	100	2	33
濾過区B	17	1	1	100	1	100
	18	9	8	89	6	67
	19	2	2	100	1	50
	20	1	1	100	1	100
		合計	13	12	92	9

死亡魚の状況 各区の死亡魚ともに PaPV の陽性率は非常に高かった（表 4）。遊泳等の異常が確認された接種 17 日後以降の死亡魚には、異型細胞も高頻度に観察されたことから、ACGD による死亡であると考えられる。

II 2 回目感染試験

材料および方法

供試魚 県漁連で生産された人工種苗を当场で育成した平均体重 43.2 g のアユ（全雌系）を用いた。なお、電照飼育により成熟を抑制した。

観察期間 2019 年 9 月 17 日から 10 月 10 日までの 24 日間。

設定区 試験 1 と同様に未濾過区、濾過区および対照区を設け、各 1 区とした（表 5）。

接種源 2018 年 9 月に栃木県内生産者の飼育池で発生した ACGD 発症魚（平均体重 60g）から切り出した鰓を接種源調整の材料とした。以後は、1 回目試験と同様の処理をし、遠心分離後の上清を未濾過液とし、その他は試験 1 と同様とした。

接種方法 試験 1 と同様に浸漬接種とし、詳細は表 5 に示す。

飼育条件 水量を約 400L としたヨーロッパアンタイプ FRP 水槽に、オゾン殺菌河川水（水温 17.4–23.9 °C）を換水率 36 回/日の割合で注水し、供試魚を 60 尾/区の密度で収容し、飼育観察を開始した。飼育期間中は魚体重の 0.5%を目安に配合飼料を毎日給餌し、成熟抑制のための電照を 24 時間行った。なお、発症により接種 13 日後から全区で餌止めを行った。

観察項目 毎日、遊泳状況や摂餌状況を観察した。また、死魚が生じた場合は、鰓の顕微鏡観察および PaPV の PCR 検査を実施した。さらに、死亡して間もない供試魚は、鰓のスタンプ標本をディフ・クイック染色し、異型細胞および長桿菌の有無を観察した。²⁾

表 5 設定区及び接種方法

区名	供試尾数	接種物	接種方法
未濾過区	60	鰓磨砕濾液上清、病魚鰓組織重量換算で1/2,000希釈	
濾過区	60	濾過液、病魚鰓組織重量換算で1/2,000希釈	浸漬、6時間
対照区	60	MEM	

結果および考察

発症状況 接種直後から 12 日後まで各区で死亡が

見られたが、供試魚の状況や魚病検査結果からコツキ（個体同士の闘争による非感染性外傷）であったものと考えられる（図2）。その後、接種13日後から異常遊泳と摂餌不良に伴う死亡が始まり、20日後まで続いた。死亡魚のウェットマウント観察では鰓弁に動脈瘤が多数観察された（図3）。また、この期間の対照区を除くすべての死亡魚が PaPV 陽性であった。さらに、一部死亡魚の鰓スタンプ標本で異型細胞が確認された。これらの状況から ACGD が発症したものと推定した。

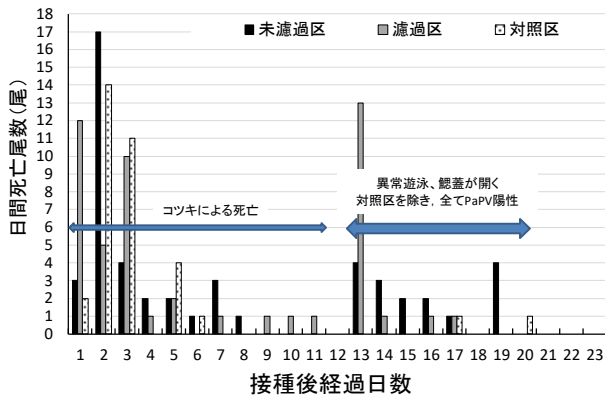


図2 日間死亡尾数の変化



図3 死亡魚の鰓に生じた動脈瘤

総合考察

今回の感染試験結果から、人為的な PaPV 接種により ACGD の病徴が再現できたものと考えられる。また、PaPV の陽性、異型細胞の出現並びに ACGD の発症には関連性が有り、過去の報告と同様の傾向が見られた。³⁾ また、濾過液の接種により ACGD の病徴が再現できたことから、本症の主因は PaPV である可能性が高まったものと考えられる。一方で、その再現性は不安定であること、細菌性鰓病原菌等の鰓付着細菌による重症化（混合感染型）等の情報は得られていないことから、引き続きその要因を探る必要がある。

謝辞

試験用試料や現場の情報をご提供いただいた県内養殖生産者の方々に深謝する。なお、本研究は農林水産省の「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）」（JPJ00867. 19190702）により実施した。

引用文献

- 1) 石川孝典・西村友宏・石原学・森竜也・和田新平・佐野元彦. 戦略的プロジェクト研究推進事業「アユの異型細胞性鰓病の発病原因の解明と防除法の開発」－天然水域における PaPV 動態調査－. 栃木県水産試験場研究報告. 2020 ; 64 : 11-12.
- 2) 和田新平. 4. アユ「ボケ病」の病態生理および診断技術に関する研究. 平成 21 年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書. 2010 : 47-57.
- 3) 福田穎徳・井上友恵・和田新平. 4. アユのボケ病の防除技術に関する研究－アユポックスウイルスの病原性と迅速診断法に関する検討－. 養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書. 2011 : 39-53.

(水産研究部)