



アユの異型細胞性鰓病の被害軽減化技術の開発について発表させていただきます。

養殖アユにおける突然の大量死事例

- ・摂餌不良
- ・遊泳不活発
- ・鰓蓋が開く
- ・突然大量死する
- ・死亡率が90%に及ぶ場合がある

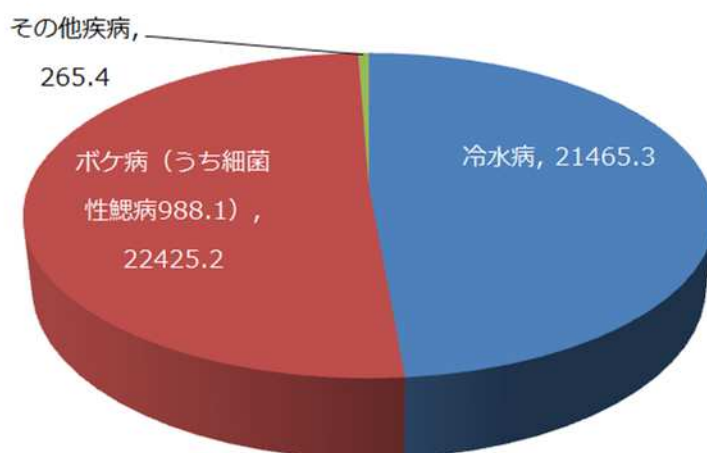


→ 生産者の間ではその症状から「ボケ病」と呼ばれていた

養殖アユの生産現場において摂餌不良、遊泳不活発、鰓蓋が開くという症状を示し、短期間の内に大量死する事例が多数報告されておりました。
生産者の間ではその症状から「ボケ病」と呼ばれておりました。

アユボケ病の被害概要

(2007年 栃木県における被害量 (kg))



➡ 冷水病に並ぶ被害量を示し、有効な対策がなかった

これは2007年の栃木県における被害量を示した円グラフです。

この年のボケ病は冷水病に匹敵する被害量を示し、被害量22.4t、被害額3,297万円と大きな被害を出しました。

冷水病に対しては水産用医薬品や昇温治療等対策法がありましたが、ボケ病に関しては診断技術や有効な治療方法がなく被害が拡大していきました。



これはボケ病が発症した池の魚の様子です。

通常であれば池をぐるぐると回りながら遊泳しているところですが、この写真のように池の端により人が近づいても逃げません。



鰓蓋が開き細菌性鰓病のような症状が見られます。

しかし鰓を検鏡しても、細菌性鰓病原因菌に代表されるような長桿菌は見るできません。

瀕死魚もしくは死亡魚の特徴



- ・魚体が硬くなり、トラ模様が出る
- ・体表がざらつく



- ・鰓や肝臓がうっ血する



動脈瘤および鰓弁の癒合が見られる



正常魚の鰓

左上の写真は重症魚です。

魚体が硬くなり、酸欠時のようなトラ模様がでます。また体表がざらつきます。

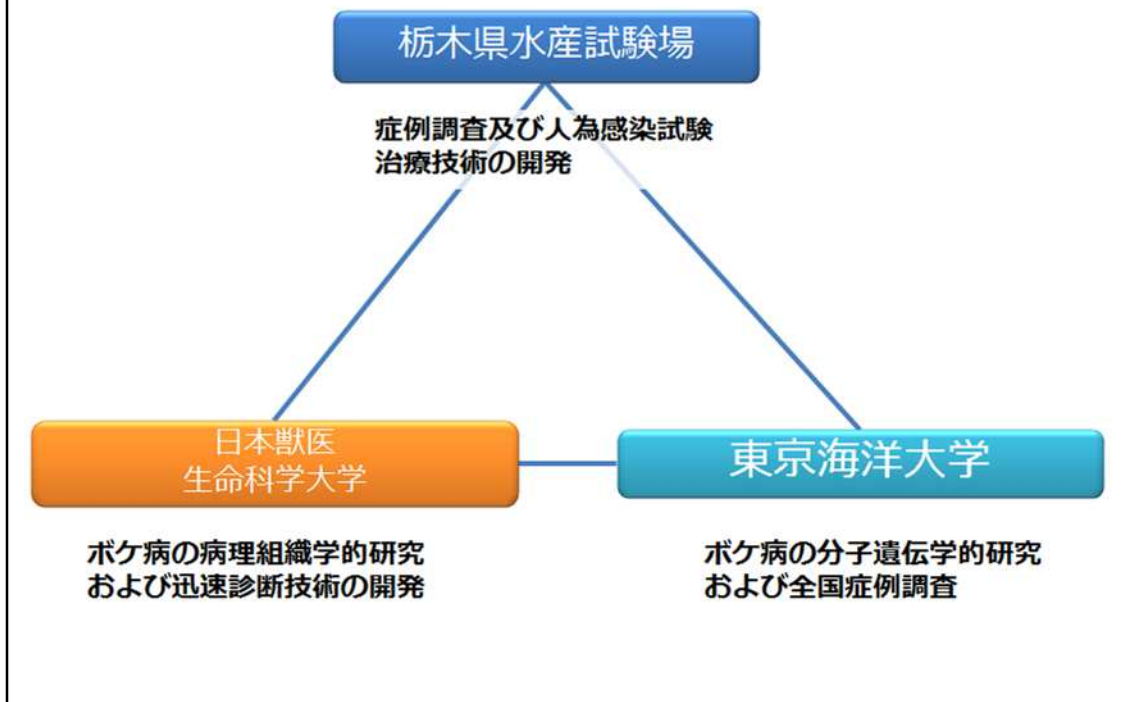
鰓はこのように朱点がみられ鬱血します。また内臓についても同様に鬱血状態となります。

これは病魚の鰓と正常魚の鰓のウエットマウント標本の写真です。

病魚の鰓は正常魚の鰓に比べ動脈瘤や鰓弁の癒合が発生していることがわかります。

これが原因となりガス交換が阻害され死亡にいたることが推察されます。

原因究明および治療法の確立に向けて



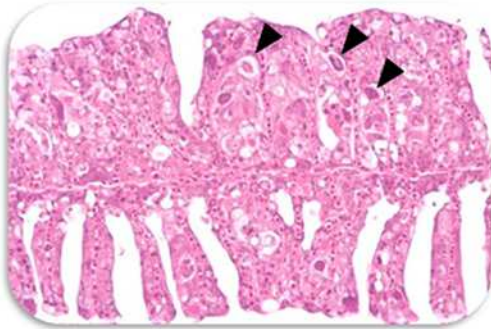
この疾病に対して、原因究明と治療法の開発を行うことを目的とし、栃木県水産試験場、日本獣医生命科学大学、東京海洋大学が共同で研究を行うこととしました。

栃木県水産試験場は県内の症例調査及び人為感染試験、治療技術の開発を行うこととし、

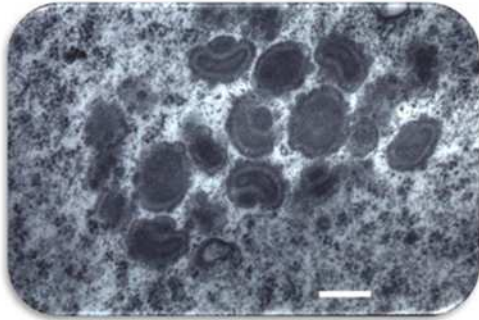
日本獣医生命科学大学はボケ病の病理組織学的研究および迅速診断技術の開発を担当し、

東京海洋大学はボケ病の分子遺伝学的研究および全国の症例調査を行いました。

病魚の病理組織学的観察



鰓の上皮が増生し、異型細胞が形成される。
異型細胞を伴う鰓病について
異型細胞性鰓病 (Atypical Cellular Gill Disease : 以下ACGDと記す)
という名称を提案



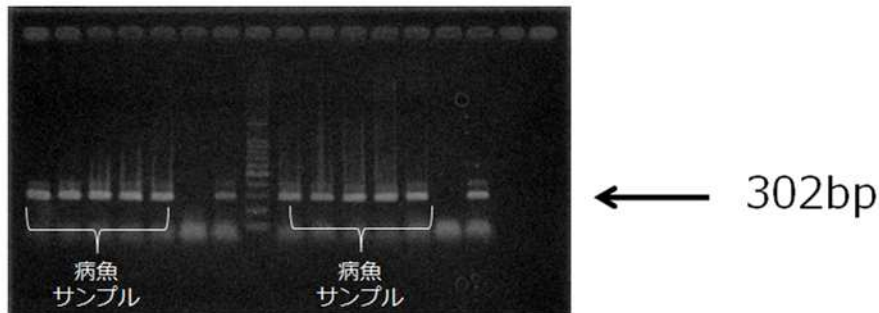
異型細胞内にはポックスウイルスが存在する。
ウイルスを
アユポックスウイルス (Plecoglossus altivelis Poxvirus : 以下PaPVと記す)
と命名

まず病魚の病理検査を行いました。

その結果、鰓の上皮が増生し、その中に大型の異型細胞が形成されることがわかりました。この大型の異型細胞を伴う疾病を異型細胞性鰓病（以下ACGD）と呼ぶことを提案いたしました。

また異型細胞を電子顕微鏡で観察すると、ポックスウイルス様の粒子が存在していました。このウイルスを*Plecoglossus altivelis* Poxvirus（以下PaPV）と命名しました。

PCRによる検査



プライマーセット

Boke30-F 5'-CGA-TAT-CAT-ATC-TGT-GAT-CG-3'

Boke30-R 5'-AAT-GTT-GAT-GTG-TCC-AGG-AT-3'

PCR条件

プレヒーティング	95℃	2分	} 35サイクル
熱変性	95℃	15秒	
アニーリング	57℃	30秒	
伸長	72℃	30秒	
最終サイクル	72℃	3分	

渡邉ら (2007) より

栃木県で発生した病魚の鰓より上記ウイルスを濃縮し、抽出したDNAの塩基配列の解読を行いました。

その結果、DNAのAT含量が高いこと、いくつかのクローンが既知のポックスウイルスの配列と相同性を示したこと、ウイルス粒子の形態、ビリオン構築*¹の場が細胞質であることなどから、本ウイルスがポックスウイルスであることが確認されました。

また、既知のポックスウイルスと相同性を示すクローンの塩基配列より設計したプライマーを用いたPCRで、CEV（コイウイルス性浮腫症）*²やポックスウイルス非感染健康アユのDNAには反応せず、異型細胞型病魚の鰓組織DNAを鋳型としたときのみ増副産物を形成したことから、本プライマーが電子顕微鏡で観察されたウイルスに特異的であることが確認されました。

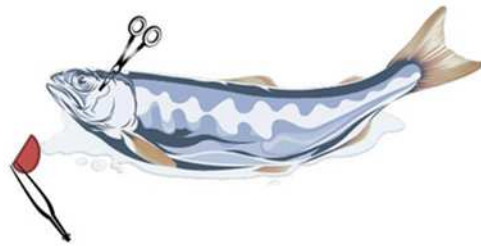
本プライマーセットが開発されたことによって、発症前の保菌状態のアユからも検出が可能となりました。

* 1 ビリオン (virion) は細胞外におけるウイルスの状態であり、完全な粒子構造を持ち、感染性を有するウイルス粒子のこと。

* 2 CEV（コイウイルス性浮腫症）はポックスウイルスが原因の疾病

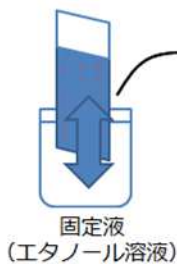
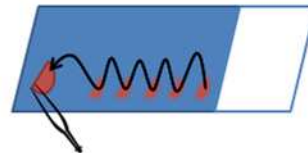
ディフ・クイック染色による迅速診断

－鰓スタンプ標本の作製方法－



鰓の摘出
→鰓葉1枚程度

スライドグラス上にスタンプ



風乾後、ディフ・クイック染色

PCR検査結果はバンドのあるなしで明確に判断できますが、DNA抽出、PCRを行うと時間や経費がかかります。

そこで、現場でできる迅速診断技術の開発が望まれました。

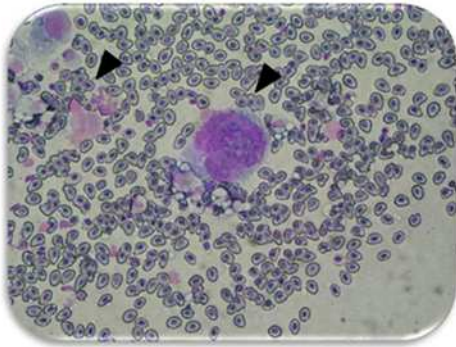
今回着目したのは鰓のスタンプ標本のディフ・クイック染色です。

まず、脱血後鰓を1枚摘出します。それをスライドグラス上にぽんぽんとスタンプしていき、風乾後、DQ染色を行います。

非常に簡単な手法で、光学顕微鏡さえあればその場で診断することが可能となりました。

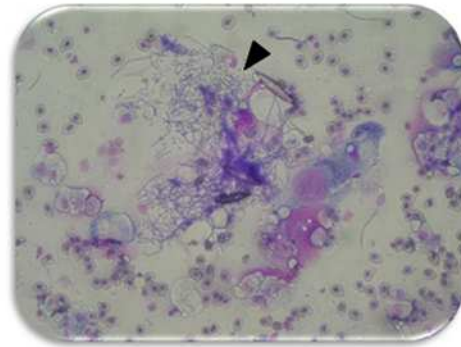
ディフ・クイック染色による迅速診断

-スタンプ標本の検鏡例-



大型の異型細胞

長桿菌も併せて観察可能



これがスタンプ標本の写真となります。

鰓にできた大型の異型細胞が観察することができます。

また細菌性鰓病の長桿菌も同時に観察することが可能となりました。

人為感染試験

供試魚

ドナー

→栃木県内養殖場にて発生したACGD発症群

レシピエント

→栃木県水産試験場が人工採苗・育成した海産アユ（脂鰭切除標識）



保菌検査日程：0，1，3，7，9，14日目に5尾サンプリングし保菌率を調査

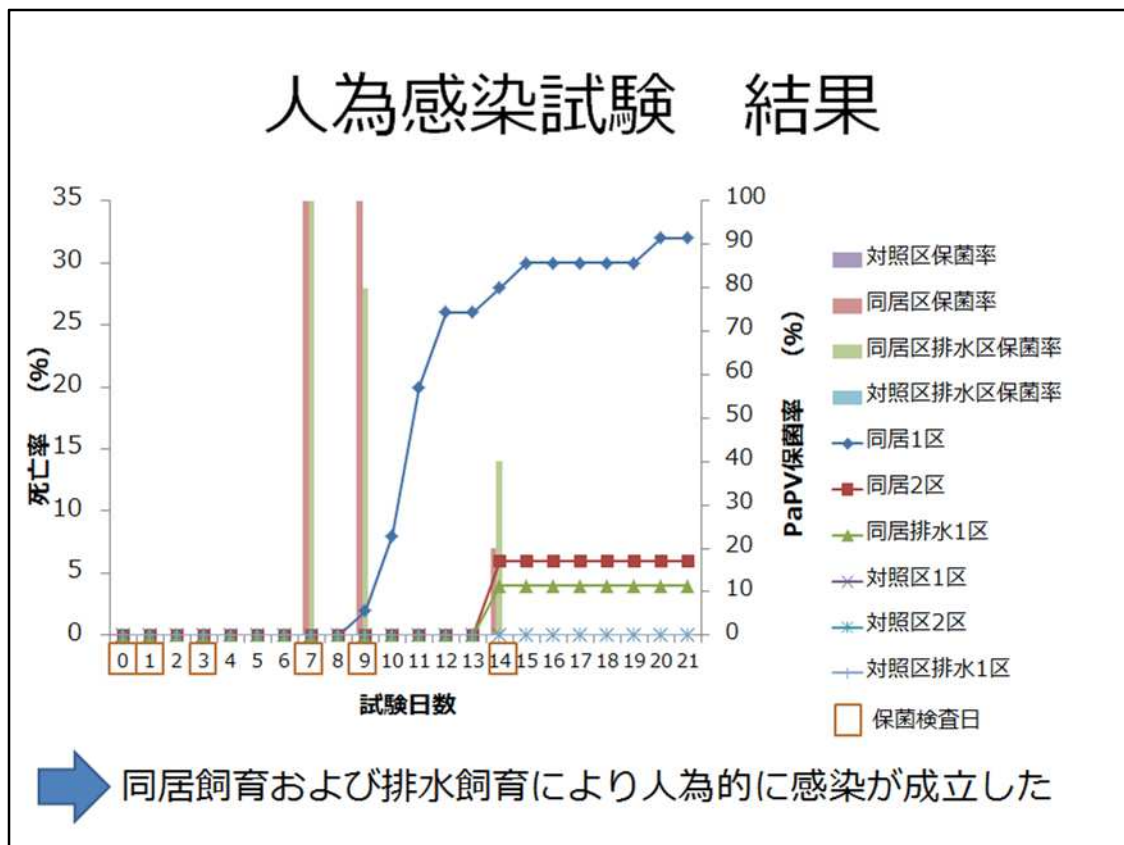
またPaPVがアユのACGDの発症原因であることを確認するために人為感染試験を行いました。

PaPVは細胞等による単離培養技術が確立されていないため、感染源としてACGDを発症したアユを使用しました。

そのドナーのアユを、ACGD発症履歴のないアユと同居させ感染が成立するか調査しました。

またその飼育排水においても感染が成立するかも併せて調査を行いました。

0，1，3，7，9，14日目に5尾サンプリングし、保菌検査を行いました。



人為感染試験結果です。

左縦軸が死亡率で折れ線グラフの値を示しており、右縦軸がPaPVの保菌率で棒グラフの値を示しております。

7日目に同居区および排水区の魚からPaPVの保菌が確認され、9日目から同居区の死亡が確認され始めました。14日目から排水区においても死亡が確認されました。

これにより、ACGDの発症と強い関連性があることが確認されました。

症例調査

	発症あり	発症なし
PaPV陽性症例	28	2
PaPV陰性症例	2	16

オッズ比: 112.00 (95%CI 14.36-873.46, Fisherの直接確率: $P=9.18E-9$)



PaPV感染とACGDの発症について有意な関連性あり

これは生産現場における症例調査結果の表です。

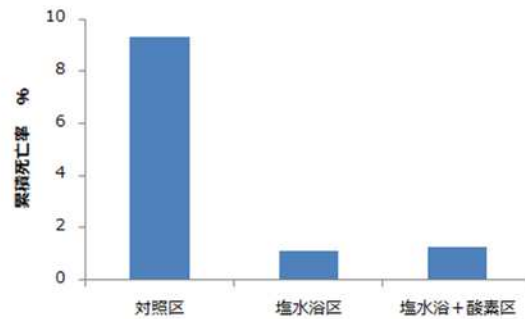
PaPV陽性、陰性ごとにボケ病の発症の有無を調査しました。

その結果オッズ比112と有意な関連性があることが分かりました。

ACGDの治療について



試験風景 15m²試験池



➡ 餌止めを行った上で、適切な塩水浴が効果的である

生産現場において塩水浴が治療として行われてきました。

塩水浴の効果確認試験を行ったところ、試験池レベルで塩水浴による死亡低減効果が見られました。

しかし、養殖現場において効果が判然としない事例が多数みられたことについては、発症発見の遅れや不十分な餌止め措置が引き起こす水質悪化や酸欠防止の水車稼働が過度の運動飼育となることが主な原因ではないかと推測されました。

ACGDの場合 治療

通常水温の場合

塩を0.5%～0.9%濃度となるように調整し、12時間程度の塩水浴を実施する。

高水温の場合（夏季炎天下日中の場合）

塩を1.2%～1.3%濃度となるように調整し、2～4時間程度の塩水浴を実施する。
→魚が跳ねなくなるまで行う。



DOメーター、塩分計でチェック！！

飼育水温により、塩分濃度、塩水浴時間を変えることが効果的です。

通常水温の場合については、塩分濃度0.5-0.9%の低めにし、12時間程度長時間にわたり塩水浴を実施します。また、夏季炎天下で高水温となる場合については水温やpHが上昇すると水中の非解離アンモニアの割合が増加し、毒性が高まることから塩分濃度1.2-1.3%と若干濃いめにし、2-4時間程度短時間で塩水浴を行います。

また池の形状等により塩の量が正確に分からない場合には塩分メーターを使用して、きちんと水中の塩分濃度の把握に努めるようにします。

そして、水中のDOがきちんと保持されていないと危険なので、DOメーターでこまめにDOのチェックが必要です。



これはあるアユ生産者の池の写真ですが、DOバンクという機器を使用しております。

これは飼育水に酸素を効率よく溶け込ませる装置です。

塩水浴と併せて、このような機器の併用も効果的です。



また、水車の水流による過度な運動は病魚にとって逆効果です。

しかし、酸素供給のために水車を止めるわけにいかないため、写真のように水車を池に直角に配置し、流れが起きないように工夫する必要があります。

通常飼育に向けた留意点

- ・ ノロハミをしたからといって、全快したわけではない！！
- ・ 手撒きで少量ずつ（魚体重あたり0.05%程度）、群全体に満遍なく給餌する。
- ・ 給餌しても死亡が見られない場合は、前日の2倍に給餌量を増やし、1週間程度かけて通常の給餌量に戻す。
- ・ 餌を止めすぎるとチョウチン病が発生するため、少量の給餌による餌止め終了のタイミングの見極めは恐れずに行うようにする。

通常飼育に向けた留意点ですが、アユが池底面をなめ始めたからと言って全快したわけではありません。

この段階で不用意に通常と同じように給餌すると死亡します。

そのため、手撒きで少量ずつ給餌し、死亡しないことをまず確認します。

それから倍、倍と増やしていき、1週間程度かけてもとの給餌量にもどすとよいでしょう。

餌を止めすぎるとチョウチン病が発生するため、少量の給餌による餌止め終了のタイミングの見極めが肝要です。

開発した技術の普及



アユ疾病に関する防疫指針

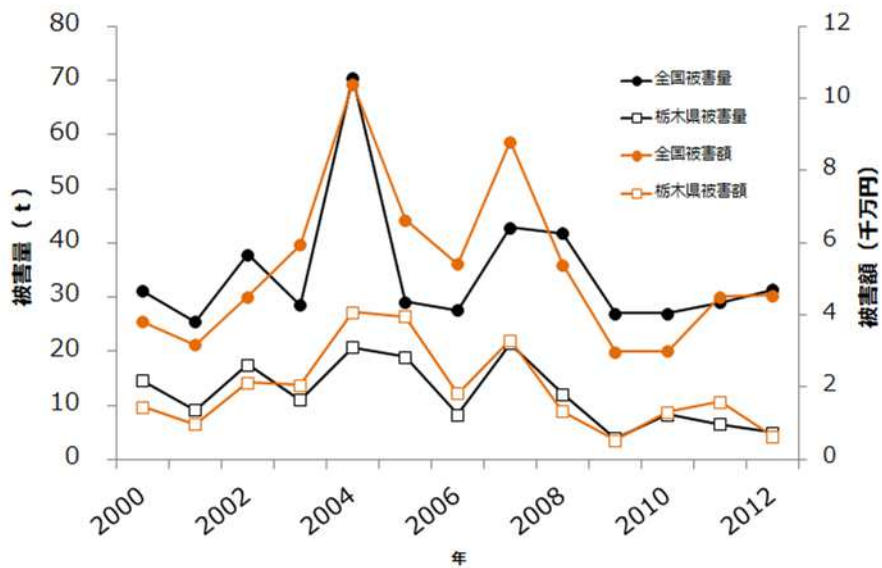
平成23年12月
アユ疾病対策協議会

➡ 全国の水産試験研究機関へ配布した

上記のように開発した診断技術および治療方法については「アユの異型細胞性鰓病診断・治療マニュアル」を作成し各都道府県へ配布しました。

また平成23年12月にアユ疾病対策協議会において策定されたアユ疾病に関する防疫指針にも掲載され、その技術が全国へ普及されています。

ACGDの被害量の推移



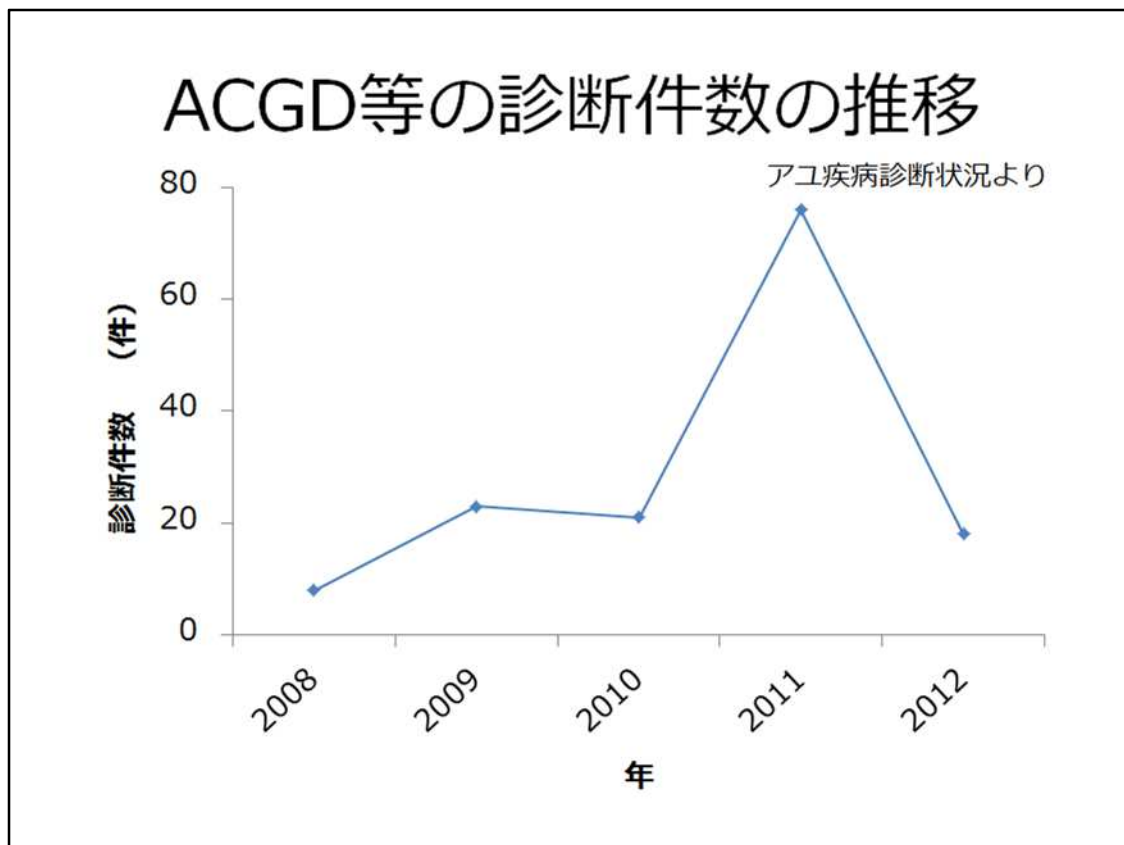
➡ 被害量および被害額ともにピーク時に比べ減少傾向にある

これはアユボケ病における全国および本県の被害量と被害額の推移です。
 黒の折れ線グラフが被害量で、左の縦軸にその量が示してあります。
 オレンジの折れ線グラフが被害額で、右の縦軸にその額が示してあります。
 2004年をピークに減少傾向にあることが分かります。
 診断方法や治療方法が全国へ普及し、効果を上げたためと推測されます。

* 2000－2003年が少ない原因として、ボケ病が不明病として取り扱われていたためと推測されます。

またそれまで30t近く不明病が計上されていたが、2004年には1tにまで減少しています。

2000－2003年に不明病もボケ病として繰り入れると60-65tとなります。



これは試験研究における検査を除いた全国のボケ病の診断件数となります。

2008年は8件でしたが、成果の普及が始まってから増加傾向にあり、2011年には総診断件数76件にも上りました。

いままで、細菌性鰓病とACGDの診断の区別がつかず判然としなかった症例が、確実に診断できるようになり、適切な処置を行えるようになりました。

まとめ

- ・ ACGD発症魚は鰓の上皮に大型の異型細胞が形成される。異型細胞内にはPaPVが存在した。
- ・ PCRや鰓スタンプ標本のディフ・クイック染色による診断技術を開発した。
- ・ 人為感染試験や症例調査により、ACGDの発症にはPaPVが関わっていることがわかった。
- ・ 通常水温の場合は0.5-0.9%で12時間、高水温の場合は1.2-1.3%で2-4時間の塩水浴を行うと効果的である。
- ・ 研究成果については「養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書」により平成19年度から毎年度普及を図ったことで、被害量、被害額ともにピーク時より半減した。
- ・ 研究成果の総括として平成23年度に「アユの異型細胞性鰓病診断・治療マニュアル」を作成し、全国都道府県へ配布した。

まとめにうつります。

ACGD発症魚は鰓の上皮に大型の異型細胞が形成され、その異型細胞内にはPaPVが存在しておりました。

PCRや鰓スタンプ標本のディフ・クイック染色による診断技術を開発しました。人為感染試験や症例調査により、ACGDの発症にはPaPVが関わっていることがわかりました。

通常水温の場合は0.5-0.9%で12時間、夏季炎天下で高水温となる場合は1.2-1.3%で2-4時間の塩水浴を行うと効果的であることがわかりました。

研究成果については平成19年度から「養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書」により毎年度普及を図ったことにより、被害量・被害額ともにピーク時より半減しております。

研究成果の総括として平成23年度に「アユの異型細胞性鰓病診断・治療マニュアル」を作成し、全国都道府県へ配布しました。

早期診断を行い、適切に処置することが被害の低減につながります。そのため、全国の水産試験場と生産者が一丸となって対策に取り組む必要があります。