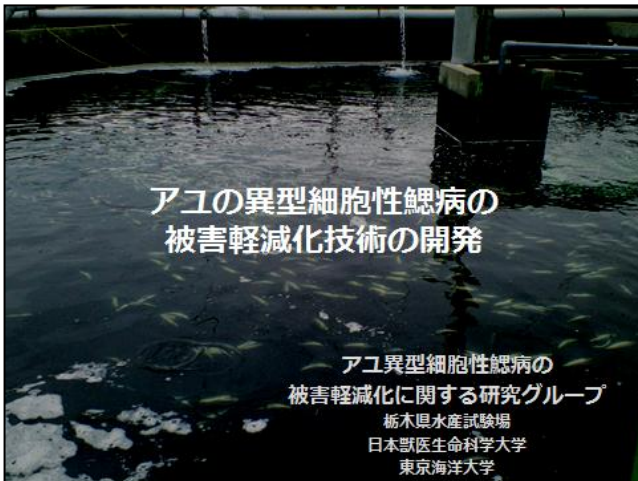


[栃木県、日本獣医生命科学大、東京海洋大]

## 「アユ異型細胞性鰓病の被害軽減化技術の開発」

アユ異型細胞性鰓病の被害軽減化に関する研究グループ

代表 栃木県水産試験場水産研究部 尾田紀夫部長



<スライド1>

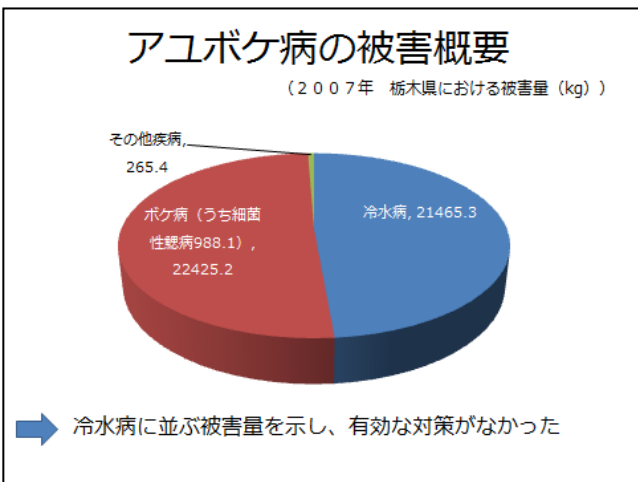
アユの異型細胞性鰓病の被害軽減化技術の開発について発表させていただきます。



<スライド2>

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。

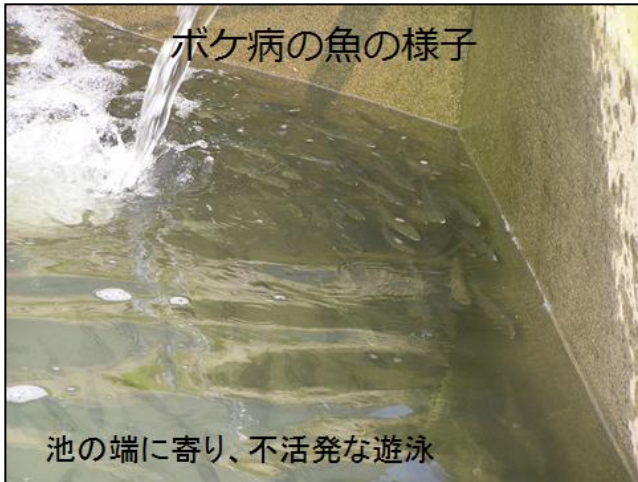


<スライド3>

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。



<スライド4>

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。



<スライド5>

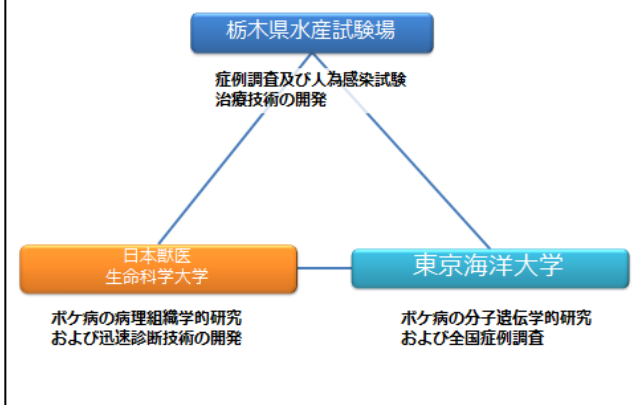
鰓蓋が開き細菌性鰓病のような症状が見られます。  
しかし鰓を検鏡しても、細菌性鰓病原菌に代表されるような長桿菌は見るできません。



<スライド6>

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



### <スライド7>

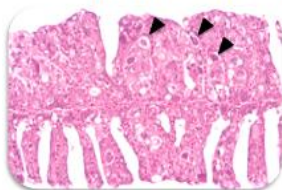
この疾病に対して、原因究明と治療法の開発を行うことを目的とし、栃木県水産試験場、日本獣医生命科学大学、東京海洋大学が共同で研究を行うこととしました。

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、

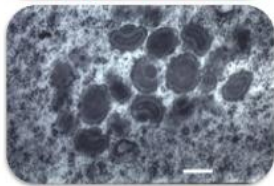
日本獣医生命科学大学はボケ病の病理組織学的研究および迅速診断技術の開発を担当し、

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

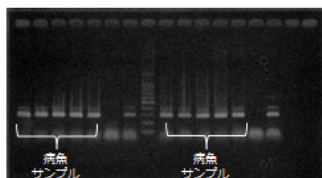
### <スライド8>

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  
 Boko30-F 5'-CGA-TAT-CAT-ATC-TGT-GAT-CG-3'  
 Boko30-R 5'-AAT-GTT-GAT-GTC-TCC-AGG-AT-3'

PCR条件		
プレヒーティング	95℃	2分
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

### <スライド9>

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。

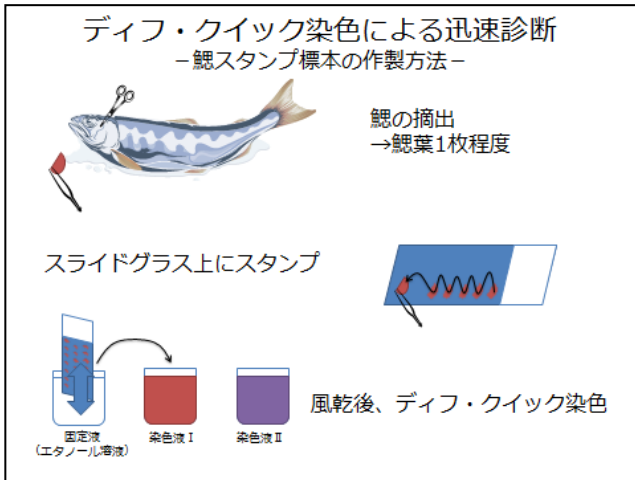
その結果、DNA の AT 含量が高いこと、いくつかのクローンが既知のポックスウイルスの配列と相同性を示したことから、ウイルス粒子の形態、ビリオン構築 \* 1 の場が細胞質であることなどから、本ウイルスがポックスウイルスであることが確認されました。

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、GEV (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。
- \* 2CEV(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



#### <スライド10>

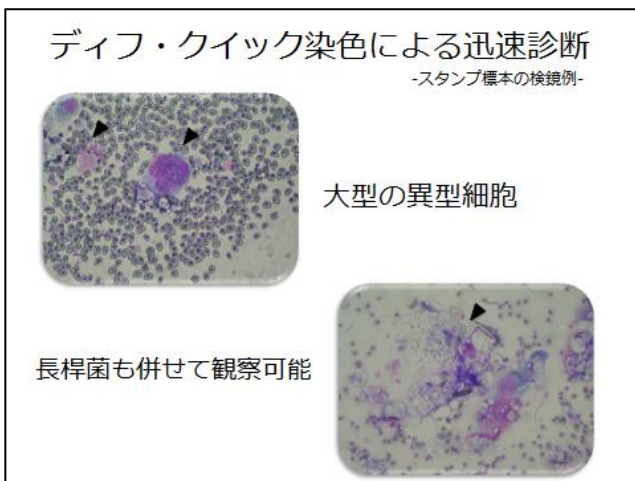
PCR 検査結果はバンドのあるなしで明確に判断できますが、DNA 抽出、PCR を行うと時間や経費がかかります。

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。それをスライドガ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。



#### <スライド11>

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。



#### <スライド12>

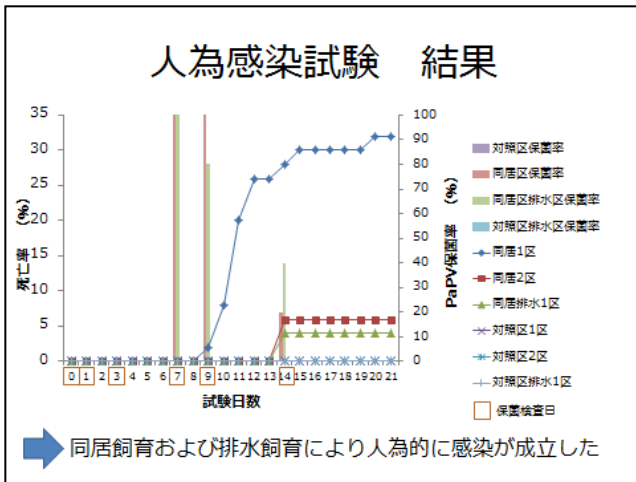
また PaPV がアユの ACGD の発症原因であることを確認するために人為感染試験を行いました。

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。



#### <スライド13>

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)

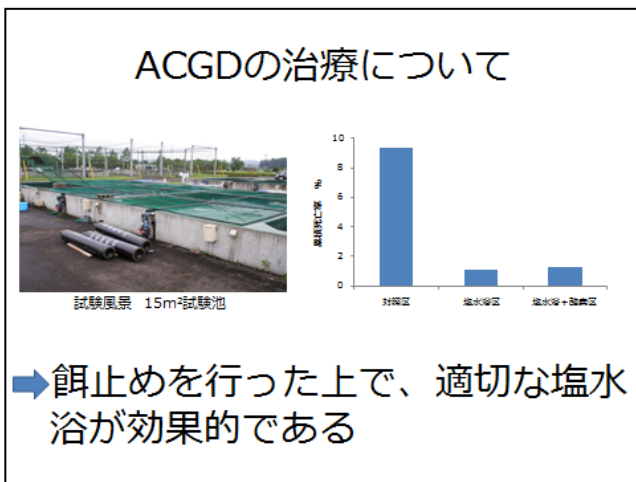
PaPV感染とACGDの発症について有意な関連性あり

#### <スライド14>

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。



#### <スライド15>

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！！**

<スライド16>

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。

## DOバンクを使用する



<スライド17>

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。

## 水車の向きを変える



<スライド18>

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。

## <スライド19>

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



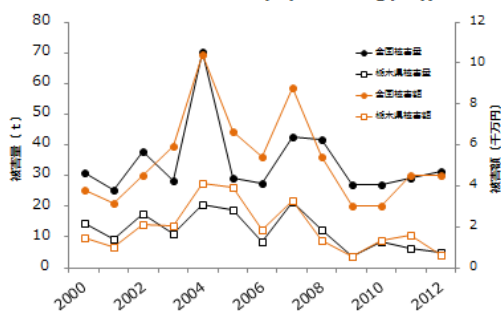
→ 全国の水産試験研究機関へ配布した

## <スライド20>

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

## <スライド21>

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。

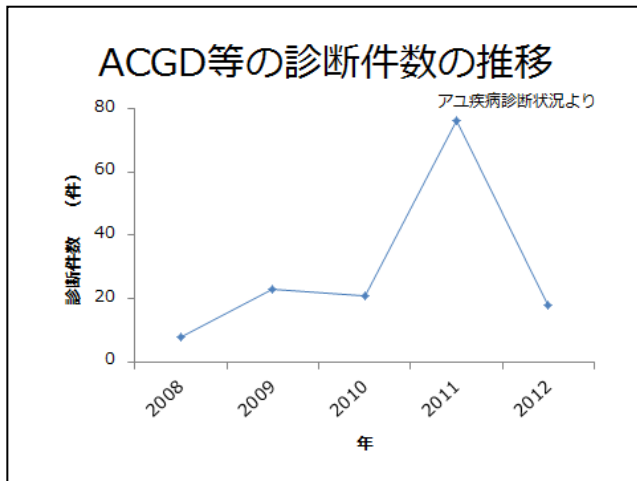
診断方法や治療方法が全国へ普及し、効果を上げたためと推測されます。

\* 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。



#### <スライド22>

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。

#### <スライド23>

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。



## 〔関係質疑〕

岐阜県(桑田技術課長補佐)

ボケ病発生時の現場対応について、通常水温と高水温時で対応方法を分けておられましたが、高水温時の目安水温について教えてください。また、原因がウイルスということですので、感染症と理解するのですが、感染症であれば防疫対策は可能なのでしょうか。

栃木県(尾田部長)

水温に関して、一概に何度ということは難しいところですが、特に夏場は水位を下げると水温が高くなりやすく、塩水中ではアンモニアの影響を受けやすいため長時間の塩水浴をしないほうが良いです。経験からいうと24, 5℃くらいが目安となります。また、原因ウイルスの感染源については、アユが1年魚で池に居ない時期があることから、他魚種、水生昆虫、カエルなどを調べてみましたがウイルスは見つかりませんでしたので、どこからウイルスが来ているのか不明であり、防疫対策は難しいのが実感です。なお、一度罹ると2度罹ることはないようなので、ワクチン開発ができるとうれしいと考えています。