

# 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

## 「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」(令和2年度/国庫委託)

### 一異型細胞性鰓病の病徴の再現 2一

石川孝典・野中信吾・森 竜也・久保田仁志・和田新平<sup>1</sup>・佐野元彦<sup>2</sup>

#### 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。

#### 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9.7gのアユ(那珂川系)を用いた。また、一部の供試魚は、細菌性鰓病(BGD)原因菌対策として、接種前日にニフルスチレン酸(商品名:エルバージュエース)水溶液に100ppmの濃度で4時間浸漬し、処理魚とした。また、飼育水温の約18°Cから試験水温の20°Cまで2日間をかけて升温した。

**観察期間** 2020年5月12日から24日までの12日間とした。

**設定区** 通常魚および処理魚に対して観察区とサンプリング区の2区を設けた。さらに、通常魚にMEMを接種した対照区を設け、観察区とサンプリング区を用意した(表1)。

表1 設定区及び接種方法

区名	供試尾数	供試魚	接種物	接種方法	
試験区① 観察区	50	通常魚	濾過液、病魚鰓組織重量換算で1/2,000希釈	浸漬、6時間	
試験区② サンプリング区	50				
試験区③ 観察区	50				処理魚(薬浴)
試験区④ サンプリング区	50				
対照区① 観察区	50	通常魚	MEM		
対照区② サンプリング区	50				

**接種源** 2019年7月に県内生産者の飼育池で自然発症したACGD発症魚(平均体重51.9g)から切り出した鰓組織を接種源調整の試料とした。試料は滅菌珪砂とともに磨砕し、MEM(HEPES緩衝, pH7.4)で4倍希釈の磨砕液とした。さらに磨砕液を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、濾過液のPaPVのDNAコピー数は $5.9 \times 10^{10}$  PaPV DNA copies/mLであった。

**接種方法** 浸漬接種とし、前述の供試魚を飼育水で鰓組織重量換算で2,000倍希釈とした濾過液および同様に希釈したMEMを供試魚とともに袋詰めし、純酸素ガスを充填して飼育水槽に6時間浮かせた。

**飼育条件** 水量を約360LとしたヨーロピアンタイプFRP水槽に、オゾン殺菌河川水を換水率2回/日の割合で注水した。そこへ供試魚を50尾/区の密度で收容し、飼育観察を開始した。飼育水温は観賞魚用ヒーターを用いて20°Cとし、飼育期間中は魚体重の1%を目安に配合飼料を毎日給餌した。

**サンプリング** 接種7日後にサンプリング各区から5尾ずつランダムにサンプリングした。その後、尾柄部を切開し、十分な脱血後、鰓組織を10%ホルマリンで固定した。

**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(異状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およびBGD原因菌のPCR検査を実施した。<sup>1)</sup>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。

#### 結果

**飼育および死亡状況** ACGD病魚鰓の濾過液を接種した各試験区では、接種4日後から異常遊泳および鰓蓋が開く個体が生じ、死亡も始まった(図1)。その後、接種7日後に急激な大量死が観察されたが、死亡は翌日で終息した。これらの状況からACGDが発症したものと断定した。なお、接種7日後から全区で餌止めを行った。対照区では、接種2日後に1尾の死亡が生じた。

**PaPVおよびBGD原因菌の保菌** 試験区のサンプリング個体は、PaPVのPCR検査ですべて陽性となった。一方で、対照区の個体は陰性であった。BGD原因菌のPCRは、全てのサンプリング個体で陰性となった(表2)。試験区の死亡魚は、全ての個体でPaPVのPCRが陽性となった(表3)。また、対照区の死亡魚はPaPV陰性であった。一方で、BGD原因菌のPCRは全ての

<sup>1</sup> 日本獣医生命科学大学, <sup>2</sup> 東京海洋大学

死亡個体で陰性であった。なお、試験前の供試魚母群の検査では、PaPV および BGD 原因菌の PCR 検査は陰性であった。

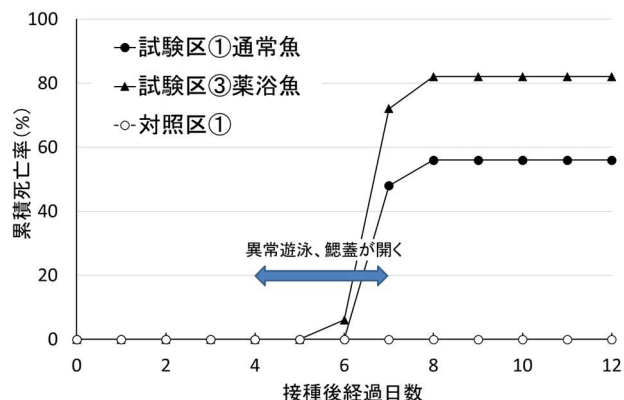


図1 日間死亡尾数の変化

表2 サンプルング魚の PCR 検査結果および大型異型細胞の出現状況

区名	PCR		大型異型細胞
	PaPV	BGD原因菌	
試験区②	5/5	0/5	5/5
試験区④	5/5	0/5	5/5
対照区②	0/5	0/5	0/5

表3 死亡魚の PaPV および BGD 原因菌の陽性尾数の変化

区名	接種後日数	死亡尾数	PaPV		BGD原因菌	
			陽性尾数	陽性率(%)	陽性尾数	陽性率(%)
試験区①	4	2	2	100	0	0
	6	5	5	100	0	0
	7	35	35	100	0	0
	8	2	2	100	0	0
	合計	44	44	100	0	0
試験区②	7	24	24	100	0	0
	8	4	4	100	0	0
	合計	28	28	100	0	0
試験区③	6	3	3	100	0	0
	7	35	35	100	0	0
	8	1	1	100	0	0
	合計	39	39	100	0	0
試験区④	4	1	1	100	0	0
	6	3	3	100	0	0
	7	33	33	100	0	0
	8	4	4	100	0	0
合計	41	41	100	0	0	
対照区②	2	1	0	0	0	0
	合計	1	0	0	0	0

**大型異型細胞の出現状況** 接種7日後のサンプリングした個体および死亡魚では、試験区の全個体で大型異型細胞が観察され、鰓弁が棍棒化した個体も観察された(表2, 図2)。

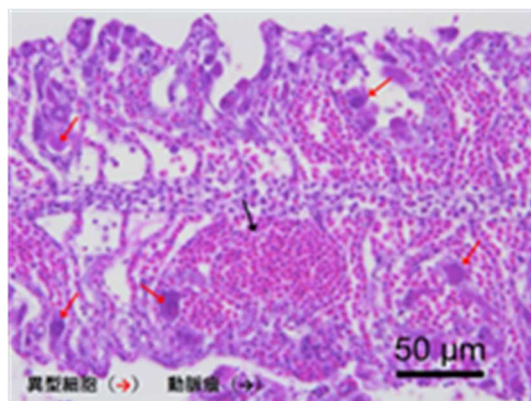


図2 死亡魚鰓の病理組織像 (H&E 染色)

### 考察

ACGD の自然発症魚の鰓で検出される PaPV と本症との関連が強く疑われていたが、<sup>2)</sup> 今回の試験では試験区のみで異常遊泳および死亡が生じ、死亡個体から PaPV が検出され、BGD 原因菌は検出されなかった。さらに、鰓の病理組織標本観察でも自然発症魚と同レベルの大型異型細胞の出現が観察され、鰓弁の棍棒化も観察された。以上の結果から、ACGD は PaPV による感染症であると判断された。

今後、鰓組織中の PaPV の DNA コピー数を測定し、さらに本症の発症と PaPV の DNA 量との関連性を明らかにすることで、本症の発症機序を明らかにする必要がある。

### 謝辞

本研究は農林水産省「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) (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) 福田穎穂・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-. 平成 22 年度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)

