

## 神奈川県における異型鰓上皮細胞の発現を特徴とする養殖アユの増殖性鰓炎の発生

原日出夫

Occurrence of Proliferative Branchitis Associated with Pathognomonic, Atypical Gill Epithelial Cells in Cultured Ayu, *Plecoglossus altivelis altivelis*, in Kanagawa Prefecture, Japan.

Hideo HARA\*

## はじめに

アユ *Plecoglossus altivelis altivelis* において「ボケ」と呼ばれる病名は不活発な遊泳状態に由来し、かつては *Flavobacterium branchiophilum* を原因菌とする細菌性鰓病<sup>1)</sup>を指すものであった。しかし1980年代になって、細菌性鰓病と類似の特徴（不活発な遊泳や食欲の低下および突然の大量死）を示すが、細菌性鰓病に効果のある1.0%前後の塩水浴が無効な事例が発生するようになり、このような場合も「ボケ」と呼ばれた<sup>2, 3, 4)</sup>。熱海他<sup>5)</sup>は、2002年から2004年の間に「ボケ」と判断された病魚の鰓弁の病理組織学的所見から、グラム陰性長桿菌が多数出現して鰓薄板の癒合が顕著な型（細菌性鰓病（BGD）型）、異型鰓上皮細胞（異型細胞）の出現が顕著な型（異型細胞型）、長桿菌および異型細胞が出現する型（混合型）および鰓薄板が萎縮したように壊死する型（萎縮壊死型）の4型があり、2004年までの時点で「ボケ」と判断されていた病魚は4つの病型による症候群であったことを示唆した。また、WADA et. al<sup>6)</sup>は、1998年および1999年に得た「ボケ」病魚を組織学的に検査したところ、鰓に大型の異型細胞が多数出現する増殖性鰓炎が主病変であったことから、異型鰓上皮細胞の発現を特徴とする養殖アユの増殖性鰓炎として報告するとともに、異型細胞内に多数のボックスウイルス様粒子の存在を確認したことから、本病におけるウイルスの関与を示唆した。渡邊他<sup>7)</sup>は、異型細胞型の病魚の鰓からボックスウイルス様粒子を濃縮し、抽出したDNAの塩基配列を解読した結果、ボックスウイルス群に分類されると結論し、このウイルス（仮称 *Plecoglossus altivelis* Pox virus (PaPV)）に特異的なプライマーを設計した。

このような状況を受けて、2008年にアユの疾病研究会（本県を含め11県で構成）、日本獣医生命科学大学および東京海洋大学が密接な協力関係を保ちつつ、ボケ病の広域的な調査を実施した。本報では、この調査において県内での発病事例を初めて確認したので報告する。

## 材料および方法

## 供試魚

2008年5月30日に県内アユ養殖場の池で、不活発な遊泳状態を伴う急激な死亡が発生し、直ちに餌止めが措置されたが、死亡が継続したため、2008年6月2日に低濃度長時間塩水浴を実施したところ、死亡は翌日に終息した。発生から終息までの累積死亡率は3.8%であった。ボケ病が疑われたことから、2008年6月2日に、死亡が発生した池（発病区）から瀕死のアユ6尾（平均体重26.8±8.8g）、死亡が発生していない別の池（非発病区）から6尾（平均体重28.4±4.1g）をサンプリングし、各種検査に供した。両池とも、水温は16.0から17.0°Cであり、同じ由来の県外産人工種苗を飼育していた。

## 光学顕微鏡等による検査

各供試魚をオイゲノール（FA100）で麻酔後、体表等外部、鰓および内臓の異常の有無を肉眼観察した。腹鰭を切り出してウェットマウント標本を作製し、光学顕微鏡下で寄生虫等の異常の有無を観察した。さらに、第4鰓葉1枚を切り出してウェットマウント標本を作製し、光学顕微鏡下で鰓組織の状況および長桿菌等の異常の有無を観察した。

## 鰓の病理組織学的検査

各供試魚をFA100で麻酔後、第1鰓葉を切り出して10%リン酸緩衝ホルマリン液（ホルマリン100mL、第一リン酸ナトリウム4.4gおよび第二リン酸ナトリウム25.9gに蒸留水を加え1000mLとした）で固定後、日本獣医生命科学大学へ送付し、検査が行われた。常法に従って固定標本を4～5μmのパラフィン切片とし、H&E染色を施して光学顕微鏡下で異常の有無を観察した。

***F. branchiophilum* ジャイレースB領域 (gyrB) のPCR検査**

各供試魚をFA100で麻酔後、第2および第3鰓葉を切り出して-80℃で凍結保存後、東京海洋大学へ送付し、検査が行われた。鋳型とするDNAはプロテアーゼK処理、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿によって調製した。陰性対照には蒸留水を用いた。陽性対照には *F. branchiophilum* から抽出したDNAを用いた。プライマーは、Fb-GB1F: 5'-ATTTGCAAGGATTTGAGCG-3'およびFb-GB1R: 5'-TTTCTGCAACAGCCTGACTT-3'を使用した(泉、私信)。PCR反応液は、TaKaRa Taq (5units/ $\mu$ L) 0.05  $\mu$ L、蒸留水 5.55  $\mu$ L、 $\times 10$ PCR Buffer 1.0  $\mu$ L、dNTP Mixture 0.8  $\mu$ L、2.5mM MgCl<sub>2</sub> 0.6  $\mu$ L、10pMのプライマーを各0.5  $\mu$ Lおよび鋳型DNA溶液 1  $\mu$ Lの合計10  $\mu$ Lとした。増幅反応は、94℃・5分間、(94℃・1分、45℃・1分、72℃・2分) $\times 35$ サイクル、72℃・5分間で行い、増幅後の反応液 3  $\mu$ LをEtBr溶液添加 2%アガロースゲルで電気泳動した。泳導後、225bpにバンドが検出された場合、陽性と判定した。

***F. branchiophilum* 16S-rRNA領域 (16S-rRNA) のPCR検査**

プライマーは、BRA1: 5'-ACTTCICGAGTAGAAG-3'および1500R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'を使用し<sup>8)</sup>、増幅反応は、94℃・2分間、(94℃・2分、45℃・1分30秒、72℃・2分) $\times 35$ サイクルとした。これら以外は *F. branchiophilum* gyrBのPCR検査と同様に行った。泳導後、1057bpにバンドが検出された場合、陽性と判定した。

**PaPVのPCR検査**

陽性対照には2006年の栃木県の異型細胞型アユ病魚の鰓磨砕液から抽出したDNAを用いた。プライマーは、PaPV30-F: 5'-CGATATCATATCTGTGATCG-3'およびPaPV30-R: 5'-AATGTTGATGTGTCCAGGAT-3'を使用し<sup>7)</sup>、増幅反応は、95℃・2分間、(95℃・15秒、57℃・30秒、72℃・30秒) $\times 35$ サイクル、72℃・

3分間とした。これら以外は *F. branchiophilum* gyrBのPCR検査と同様に行った。泳導後、302bpにバンドが検出された場合、陽性と判定した。

**結 果****光学顕微鏡等による検査**

結果を表1に示した。発病区は、肉眼では全てのサンプルで体表の粘液の過多が認められた。ウエットマウント標本では鰓の粘液の過多および鰓上皮組織の増生および動脈瘤が観察された(図1)。非発病区は、全てのサンプルで異常は認められなかった。また、発病区および非発病区ともに長桿菌は観察されなかった。

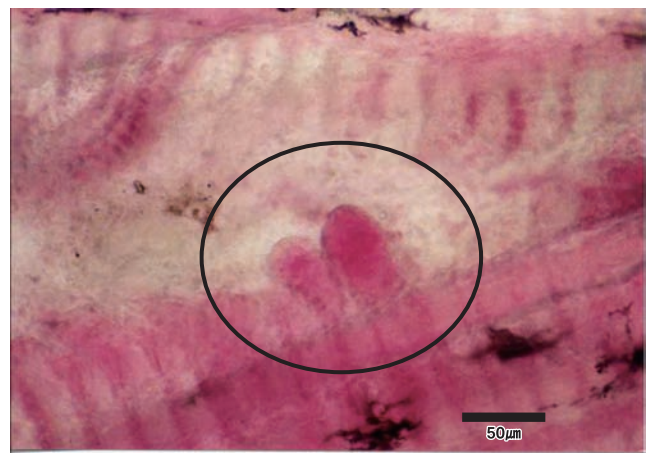


図1. 発病魚の鰓組織  
動脈瘤(円内)ウエットマウント

**鰓の病理組織学的検査**

結果を表1に示した。また、非発病区の鰓組織像を図2aに、発病区の鰓組織像を図2bに示した。非発病区において、鰓上皮組織に僅かな増生がみとめられたものの、異型細胞および長桿菌は認められなかった。発病区において、異型細胞および異型細胞の集塊が観察された。さらに、鰓薄板の融合により形成された空隙や鰓弁の棍棒

表1 光学顕微鏡および組織標本等による検査結果

試験区	検査区分	検査尾数	体表または鰓の粘液過多	鰓上皮組織の増生	動脈瘤	長桿菌
発病	肉眼	6	6	—	—	—
	ウエットマウント標本	6	6	6	6	0
	組織標本(H&E染色)	6	—	6	6	6
非発病	肉眼	6	0	—	—	—
	ウエットマウント標本	6	0	0	0	0
	組織標本(H&E染色)	6	—	6	0	0

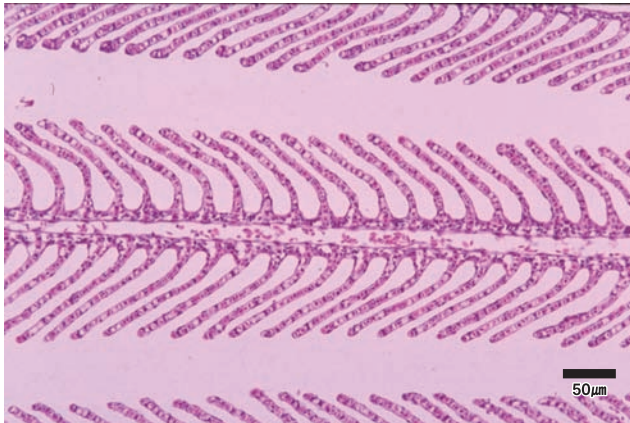


図 2 a. 非発病魚の鰓組織 H&E染色

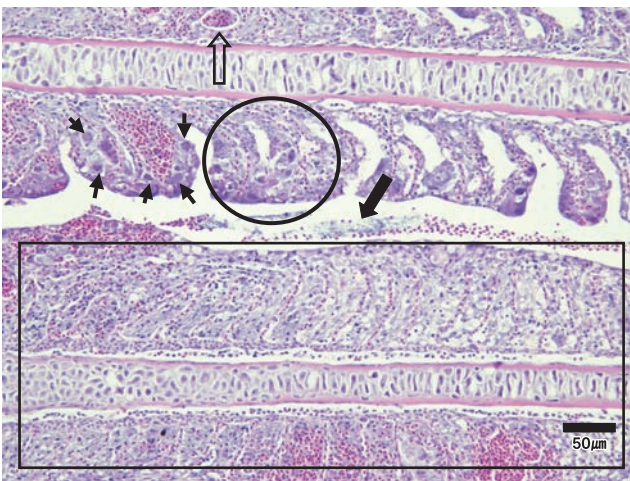


図 2 b. 発病魚の鰓組織  
異型細胞 (矢印小)、動脈瘤 (白抜き矢印)、  
異型細胞の集塊と鰓薄板の融合により形成され  
た空隙 (円内)、長桿菌 (矢印大) および鰓弁  
の棍棒化 (四角枠内) H&E染色

化が観察された。鰓組織は増殖性鰓炎を呈しており、長桿菌も観察された。

#### F. branchiophilum およびPaPVのPCR検査

PCR検査の結果を表 2 に示した。F. branchiophilum は、発病区および非発病区ともgyrBおよび16S-rRNAのいずれの検査においても検出されなかった。一方、PaPVは両区ともにすべてのサンプルで検出された。

### 考 察

発病区では、鰓の病理組織学的検査において異型細胞および鰓上皮組織の増生や鰓薄板の癒合などの増殖が認められ、PCR検査においてPaPVが検出された。これらことから、発病区は本県で初めて異型鰓上皮細胞の発現を特徴とする養殖アユの増殖性鰓炎<sup>6)</sup>であると考えられた。

PaPV感染と異型細胞の出現との間には密接な関係が認められるとされる<sup>9, 10, 11)</sup>が、本症例では異型細胞が認められなかった非発病区においてもPaPVが検出され、鰓の病理組織学的検査で僅かな増生が認められた。非発病魚からのPaPV検出例については幾つかの報告があり<sup>9, 10, 11)</sup>、さらにPaPVの感染実験で感染は確認されたものの大量死や異型細胞の発現は再現されていない<sup>11)</sup>。これらことから、非発病区は、PaPVに感染しているが発病していない状態であったと考えられ、発病にはPaPVの感染に加え何らかの発病要因が作用するものと思われる。今後、発病要因の解明が待たれる。

発病区は異型細胞と併せて長桿菌も認められたことから、熱海他<sup>6)</sup>が区分したボケ病の4型のうち、混合型に区分される。未だ混合型の長桿菌は分離・同定されておらず、本研究における長桿菌も、F. branchiophilumではない別の菌の可能性が考えられる。また、冷水病菌 Flavobacterium psychrophilum では、プライマーの種類によって検出感度が異なることが報告されており<sup>12)</sup>、本研究で用いたプライマーで増幅するために必

表 2 F. branchiophilum およびPaPVのPCR検査結果

試験区	検査区分	検査尾数	検出尾数	非検出尾数
発病	PaPV	6	6	0
	F. branchiophilum gyrB	6	0	6
	F. branchiophilum 16S-rRNA	6	0	6
非発病	PaPV	6	6	0
	F. branchiophilum gyrB	6	0	6
	F. branchiophilum 16S-rRNA	6	0	6

要な菌数が存在せず、その結果増幅されなかった可能性も考えられる。さらに、この長桿菌はウエットマウント標本では観察されず、病理組織標本では観察された。このような事例は他の混合型においても報告されており、存在する菌が少ないことがウエットマウント標本では観察され難い原因とされる<sup>13)</sup>。この菌が病魚の死亡にどの程度関与するか不明であり、今後、混合型の長桿菌を分離・同定し、本病との関係を明らかにする必要がある。

### 謝 辞

本研究を行うにあたり、国立大学法人東京海洋大学 福田穎穂博士には、ご指導ご助言をいただいた。日本獣医生命科学大学 和田新平博士には、病理組織学的検査とご指導ご助言をいただいた。厚くお礼申し上げます。また、PCR検査をしていただいた国立大学法人東京海洋大学 太田周作君に感謝いたします。本研究は平成20年度全国湖沼河川養殖研究会 アユの疾病研究部会の連絡試験により実施した。

### 引用文献

- 1) 城 泰彦 (2006) : 細菌性鰓病 (BGD), 「新魚病図鑑 (畑井喜司雄, 小川和夫監修)」, 緑書房, 東京, 57.
- 2) 石井日出郎 (1993) : アユのボケ病, 養殖, **30** (4), 39.
- 3) 和田新平 (2006) : 不明病 (「ボケ」), 「新魚病図鑑 (畑井喜司雄, 小川和夫監修)」, 緑書房, 東京, 71.
- 4) 沢田守伸・糟谷浩一・久保田仁志・石井日出郎 (2004) : 当场で発生したアユの通称「ボケ病」について, 栃木県水産試験場研究報告, **47**, 42-50.
- 5) 熱海博子・和田新平・倉田修・畑井喜司雄・石井日出郎 (2005) : 養殖アユにみられる不活発遊泳から大量死を引き起こす不明病 (通称「ボケ病」) に関する病理学的研究, 平成17年度日本水産学会大会講演要旨集, 74.
- 6) WADA S., KURATA O., HATAI K., ISHII H., KASUYA K. and WATANABE Y. (2008) : Proliferative Branchitis Associated with Pathogenic, Atypical Gill Epithelial Cells in Cultured Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, **43**(2), 89-91.
- 7) 渡邊房子・福田穎穂・渡辺裕介 (2007) : アユの「ボケ病」に関する研究—ボックス様ウイルス粒子について—, 平成19年度日本水産学会大会講演要旨集, 221.
- 8) TOYAMA T, KITA K. and WAKABAYASHI H. (1996) : Indication of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR Targeted 16S Ribosomal DNA. *Fish Pathol.*, **31**, 25-31.
- 9) 和田新平 (2008) : アユ「ボケ病」の病理生理および診断技術に関する研究, 平成20年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会, 41-57.
- 10) 福田穎穂 (2007) : アユ「ボケ病」のボックスウイルスとの関連に関する研究, 平成19年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会, 100-109.
- 11) 福田穎穂・渡邊房子・太田周作・石垣恵 (2008) : アユ「ボケ病」のボックスウイルスとの関連に関する研究, 平成20年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会, 73-85.
- 12) 泉庄太郎 (2007) : アユ冷水病の高度診断技術等に関する研究, 平成18年度養殖衛生技術開発研究成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会, 17-27.
- 13) 土居隆秀 (2008) : アユ「ボケ病」の細菌学的研究, 平成20年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会, 59-72.