短 報

養殖アユの胸部の穴あき症状を
伴う死亡事例

岡村貴司*

(2013年3月21日受付)

Mortality of Cultured Ayu
Plecoglossus altivelis with
Deep Skin Ulceration on the
Thoracic Region

Takashi Okamura

Shiga Prefectural Fishery Experiment Station,
Shiga 522-0057, Japan

(Received March 21, 2013)

ABSTRACT—An episode of mortality was observed in cultured ayu *Plecoglossus altivelis* with clinical signs including deep ulceration in the thoracic skin in affected fish in the Shiga Prefecture, Japan, in June, 2012. Bacteriological examination revealed that fish were infected with *Flavobacterium psychrophilum*, the etiologic agent of bacterial cold water disease (BCWD). Deep thoracic ulceration has not been reported in cases of BCWD in ayu. This lesion was successfully reproduced in ayu by slightly abrading the skin in the thoracic region prior to immersion challenge with *F. psychrophilum*. However, I could not determine the causative factor of the lesion in conventional fish farm management.

Key words: *Plecoglossus altivelis*, ayu, bacterial cold water disease, deep ulceration, *Flavobacterium psychrophilum*

アユ *Plecoglossus altivelis* は滋賀県の内水面養殖漁業で最も重要な魚種であり、2010年の県内の養殖魚収獲量の85%を占めている（近畿農政局統計部、2012）。滋賀県内のアユ養殖には琵琶湖で漁獲されるアユが種苗として用いられており、養殖されたアユは河川放流用や食用に供されている。

滋賀県水産試験場

* Corresponding author

E-mail: okamura-takashi@pref.shiga.lg.jp

2012年6月に滋賀県下のアユの養殖業者から滋賀県水産試験場に魚病診断の依頼があり、持ち込まれた15尾すべてのアユの胸部にナイフで割ぎ落としたように穴があった潰瘍（以下、「穴あき症状」と呼ぶ。）がみられた（Fig. 1）。魚病診断の結果、本事例は冷水病と判定されたが、その症状は一般的なアユの冷水病におけるものとは異なると考えられた。さらに、アユの体表に擦過傷がある場合には、冷水病に感染すると穴あき症状を呈することは報告されているが（Miwa and Nakayasu, 2005）、これほど一時に大量のアユが胸部の穴あき症状を呈した事例はなく、本事例の症状が冷水病によって引き起こされたものであるかについても疑問が残った。

そこで、本報では本事例の魚病診断結果について述べるとともに、その病理発生に関して検討した。すなわち、何らかの要因で胸部に擦過傷が生じ、その状態で冷水病を発症したことによって、一時に大量の胸部穴あき症状が引き起こされたと想定して再現試験を実施した。

Fig. 1. Showing the deep ulceration in the ventral, thoracic skin observed in the present case.

材料および方法

持ち込み検体の魚病診断

養殖現場の状況を聞き取った後、顕著な穴あき症状を呈するアユ、計6尾（平均体重7.1 g）を魚病診断に供した。

外部症状を目視の後、鰓のウェットマウント標本および鰓スタンプのDiff-Quik（シスメックス株式会社）染色標本、胸部の潰瘍部のスタンプ標本およびスタンプのDiff-Quik染色標本、胸鰭および尾鰭のウェットマウント標本を作成し、光学顕微鏡下で検鏡した。

細菌の分離は腎臓および潰瘍部から行い、MCY寒天培地（トリプトン0.2%、酵母エキス0.02%、肉エキス0.02%、塩化カルシウム0.02%、酢酸ナトリウム0.02%、寒天1.5%）およびハートインヒュージョン寒天培地（以下「HI寒天培地」と記述）（日水製薬株式会社）を用いた。MCY寒天培地を用いた菌分離では、腎臓から釣菌し

た場合は15°Cで5日間の培養後に、また潰瘍部から釣菌した場合は5°Cで10日間の培養後に細菌のコロニーを観察した。HI寒天培地では、腎臓および潰瘍部のいずれから釣菌した場合においても、25°Cで24時間の培養後に細菌のコロニーを観察した。細菌の同定には、日本水産資源保護協会から配布された抗血清、もしくはアピ20NE（シスメックス・ビオメリユー株式会社）を用いた。

試験1（人為的に胸部を擦過したアユへの冷水病の浸漬感染試験）

供試魚には2012年1月に琵琶湖で採捕された天然産アユを用いた。採捕魚から *Flavobacterium psychrophilum* を除去し、冷水病を発症させないようにするため、採捕（採捕時平均体重 0.7 g）8日後から23°Cと28°C加温処理（遠藤ら，2001；酒井ら，2001）を開始した。その結果、採捕してから試験実施までの間、供試魚に冷水病を含む疾病の発生はみられなかった。試験は繰り返して2回実施し、供試魚の平均体重は、1回目の試験時が6.7 g、2回目の試験時が7.4 gであった。

試験区は、アユの胸部を物理的に擦過した後に *F. psychrophilum* に感染させた区（擦過＋感染区）、擦過せずに菌に感染させたのみの区（感染区）および胸部を擦過したのみの区（擦過区）の計3区を設けた。

胸部の擦過は、地下水で湿らせたキムタオル（日本製紙クレシア株式会社）でアユを包み、腹部を上向きにして保定し、露出させた胸部を金属製の棒やすり（細工用やすり10型 ツボサン株式会社）で軽く擦ることで実施した。擦過にはやすり部分の中心部の約2 cmのみを用いた。魚体の正中線方向に垂直となるよう棒やすりを当てがい、やすりの自重のみの負荷をかけて10往復擦った。擦過傷を与えた痕跡は、肉眼では確認されない程度であった（Fig. 2）。

擦過＋感染区および感染区に対する *F. psychrophilum*

Fig. 2. Experimental fish were slightly abraded the thoracic skin with a round file prior to immersion challenge with *F. psychrophilum*. Arrowhead indicates the abraded region.

の感染は、浸漬法により実施した。菌株にはアユ病魚由来の PH0424株を用いた。−80°Cで冷凍保存した菌液 0.5 mLを、解凍後に1/2濃度の CGY 液体培地（カシトン 0.5%，ゼラチン0.3%，酵母エキス0.1%）200 mLに接種して15°Cで24時間培養した。さらに、同組成の新たな培地 1 Lあたりにこの培養液 40 mLを混合し、15°Cで16時間の培養を行った。

上述のように作製した培養液を、地下水で4倍に希釈して4 Lの攻撃菌液とし、そこに供試魚20尾を浸漬した。浸漬は通気しながら18°Cで30分間実施した。1試験区あたり40尾の供試魚を用いたため、同じ攻撃菌液を用いて20尾ずつ2回に分けて浸漬攻撃を行い、それぞれを2本の60 L水槽に収容した。すなわち、供試魚は1試験区あたり2本的水槽で飼育し、3試験区で計6本的水槽を使用した。浸漬感染時の菌濃度は、1回目の試験が 1.6×10^8 CFU/mL、2回目の試験が 2.3×10^7 CFU/mLであった。

飼育水は地下水の掛け流しで、水温は2回の試験ともに18.8–19.9°Cであった。また、試験期間中は無給餌とした。浸漬感染後14日間の経過観察を行い、毎日死亡魚の尾数を計数して累積死亡率を算出した。さらに、攻撃後14日目における擦過＋感染区および感染区の累積死亡率に関して、 χ^2 独立性の検定を用いて有意差を検討した。死亡魚は取り上げ、外部症状を観察して冷水病か否かを判定した。腐敗により内臓が溶解していない個体からは、MCY寒天培地を用いて腎臓から菌分離を実施した。

試験2（冷水病を浸漬感染させたアユの高密度飼育試験）

供試魚は試験1と同じロットの天然湖産アユを用いた。試験は、*F. psychrophilum* を浸漬感染させた後に、ナイロン研磨シート（極粗 #80相当 株式会社イトー）を底に敷き詰めた水槽で飼育することで実施した。試験区として、飼育密度の異なる2区を設定し、底に研磨シートを敷設した60 L水槽に水量を50 Lとして、試験区Aは総重量500 gの供試魚（141尾、平均体重3.5 g）を、試験区Bは総重量800 gの供試魚（208尾、平均体重3.8 g）を収容した。

攻撃菌液は、PH0424株を用いて試験1と同様に調整した培養液を地下水で希釈した。試験区Aでは 1.0×10^7 CFU/mLとした攻撃菌液3 Lに供試魚（総重量493.5 g）を、試験区Bでは 7.7×10^6 CFU/mLとした攻撃菌液6 Lに供試魚（総重量790.4 g）を、それぞれ通気しながら30分間浸漬した。攻撃後、供試魚はそれぞれの飼育水槽に移し、20日間経過観察を行った。

飼育水は地下水の掛け流しで、水温は2回の試験ともに18.2–19.1°Cであった。また、試験期間中は無給餌とした。観察は1日1回行い、死亡魚の尾数を計数して累積死亡率を算出した。死亡魚は取り上げ、外部症状を観察して冷水病の判定を行った。また、毎日の観察時に5–10分間、水槽底面での擦過の有無を確認した。

結 果

持ち込み検体の魚病診断

養殖場における状況を現場で確認したところ、飼育魚の平均体重は6 g、日間死亡率は最大で約3%（1日あたり約20 kgの死亡）であり、死亡したアユのほぼ全てに胸部の穴あき症状がみられたことが判明した。また、遊泳している個体にも死亡魚よりは径が小さいものの穴あき症状がみられた。

通常、滋賀県内の養殖業者は水量1 tあたり総魚体重2–3 kg程度の密度でアユを養殖しているが、本事例の発生した養殖場では水量1 tあたり総魚体重6 kgと高密度で飼育していた。さらに、検体を持ち込む4日前に同魚群に対して網を用いた選別を行ったとのことであった。

外部症状を観察した結果、検査した全ての個体（ $n = 6$ ）に穴あき症状がみられ、中には心臓が見える個体もあった。その他の外部症状は観察されなかった。鰓、潰瘍部、胸鰭および尾鰭のウェットマウント標本およびスタンプ標本を観察した結果、真菌感染や寄生虫は観察されなかったが、潰瘍部には長桿菌がみられた。内臓諸器官に異常は認められなかった。

MCY 寒天培地で菌分離を行った結果、検査したアユ（ $n = 6$ ）の腎臓からは4個体から、潰瘍患部からは3個体から *F. psychrophilum* が純培養的に分離された。HI 寒天培地では、腎臓から細菌は分離されず、6尾中4尾の潰瘍部からは *Aeromonas* spp. が分離された。

試験1（人為的に胸部を擦過したアユへの冷水病の浸漬感染試験）

各試験区にみられた死亡経過を Fig. 3 に示す。攻撃後14日目における累積死亡率は、1回目の試験では擦過区が2.3%、感染区が61.5%、擦過+感染区が94.7%であった。2回目の試験では、擦過区が0%、感染区が40.0%、擦過+感染区が67.5%となった。擦過区+感染区の死亡率は擦過区および感染区に比べて有意に高い値であった（ $p < 0.01$ ）。感染区および擦過区+感染区においては、死亡魚の腎臓から *F. psychrophilum* が単離された。感染区における *F. psychrophilum* の分離率は1回目および2回目の試験ともに100%、擦過+感染区における分離率は1回目が100%、2回目が50%であった。擦過区から *F. psychrophilum* は分離されなかった。

胸部の穴あき症状は、擦過+感染区のみにもみられ、1回目および2回目の試験ともに全ての死亡魚に胸部の穴あき症状が確認された。また、感染14日後の生残魚にも1回目の試験では100%、2回目の試験では58.3%の個体に胸部の穴あき症状がみられた。これらの穴あき症状は自然発症魚のそれに酷似していた（Fig. 4）。これに対し、感染区では死亡魚にアゴの欠損および発赤がみられたが、死亡魚および生残魚ともに穴あき症状はみられなかった。また、擦過区の死亡魚には外部症状はなく、生残魚には

Fig. 3. Changes of the cumulative mortalities in the course of the two trials of artificial infection with *F. psychrophilum* in combination with slight abrasion in the thoracic skin. (a): First trial (b): Second trial (●) Fish were slightly abraded the thoracic skin prior to challenge with *F. psychrophilum*. (□) Fish were infected without abrasion of the thoracic skin. (△) Fish were only abraded the thoracic skin (negative control).

Fig. 4. Deep ulceration was successfully reproduced by slightly abrading the skin in the thoracic region prior to immersion challenge with *F. psychrophilum*.

擦過した箇所が跡となっている個体がみられたが、穴あき症状を呈する個体はみられなかった。

試験2（冷水病を人為感染させたアユの高密度飼育試験）

攻撃後20日目における累積死亡率は、試験区Aが38.3%、試験区Bが41.8%であった。試験区Aおよび試験区Bともに死亡魚には下顎の欠損や顎周辺の発赤が確認されたが、穴あき症状を呈するアユは1尾も確認されなかった。生残魚においても穴あき症状を呈するアユはみられなかった。また、試験区Aおよび試験区Bともに水槽底面でアユの魚体が擦過している様子は観察されなかった。

考 察

診断結果から、本事例は冷水病と判定された。しかしながら、一般的な冷水病は体表のびらんや下顎の出血、また体側部の潰瘍などの症状が特徴的であるとされている(三浦, 2011)。特に養殖場においては貧血や顎周辺の発赤を呈して死亡する事例は多くみられるが、体表に穴あき症状を呈して死亡している事例は少ない。また、養殖アユの成魚の場合は、鰓や内臓に貧血以外に顕著な症状を認めないことが多いとされる(若林, 2004)。さらに、滋賀県内で冷水病と診断された事例のうち体表に潰瘍を呈している事例は多くなく、殊に本事例のような胸部の穴あきを特徴とする死亡事例はこれまでに知られていない。

発症部位は胸部ではないが、チョウチン病(江草・富永, 1967; 青木, 1974; 城, 2011)では、重度に病状が進行した場合を除き、本事例の穴あき症状よりも大きくかつ深い潰瘍が生じていても生残していることから、本事例の死亡原因が穴あき症状による浸透圧調節不全等の生理機能障害のみであるとは考え難い。従って、本事例の病理発生には、*F. psychrophilum* の感染が重要な役割を持つことが強く疑われた。そこで、人為的な擦過傷を与えた供試魚に *F. psychrophilum* の浸漬攻撃を加えることで胸部穴あき症状が再現可能か検討するために試験1を、さらに過密飼育が胸部擦過の原因となって穴あき症状を誘導するか否かを検討するために試験2を実施した。

試験1では、胸部に物理的な擦過傷を与えた供試魚に *F. psychrophilum* を浸漬感染させることで、胸部穴あき症状が再現されることが判明した。胸部を擦らずに浸漬感染させた供試魚には胸部穴あき症状がみられなかったことから、この胸部穴あき症状の発現には胸部体表組織の損傷と *F. psychrophilum* 感染の両者が必要であることが示唆された。Miwa and Nakayasu (2005) は、胸部ではないが体表を綿棒で軽く擦るだけで表皮組織が損傷するとし、その後 *F. psychrophilum* に感染させることで表皮損傷箇所に潰瘍が生じたと報告している。このことから、本事例が発生した養魚場では、収容時または飼育中に何らかの理由でほぼ同時期に胸部体表に損傷が生じ、その後に *F. psychrophilum* に感染したため、病魚は胸部に穴あき症状を呈して死亡したと考えられる。

本事例の発生した養殖場では高密度で飼育していたために、池の底面や壁面への胸部を含む体表の接触頻度が高くなり、これらの部位の体表に損傷が生じることが考えられた。しかしながら、高密度飼育した試験2(水量1tあたりの飼育総魚体重に換算すると、試験区Aでは8kg、試験区Bでは16kg)では、胸部を含め体表に穴あき症状を呈する供試魚はみられなかった。試験期間中の観察においても、水底に設置したナイロン研磨シートで体表を擦る様子は観察されず、高密度の状況下でも水底で胸部を擦過する可能性は低いものと考えられた。

水底や壁面でハミ行動を行う時に胸部を擦過する可能性

も考えられるが、屋内水槽や外池での飼育時にハミ行動を観察すると、口唇部を擦り付けてハミ行動を行っている様子や水底にアゴを付けて遊泳している様子が観察される。そして冷水病が発生した場合は、ハミ行動時に体表に擦過したと思われる顎周辺の発赤や下顎が欠損する症状(三浦, 2011)が頻発するが、胸部に特異的に患部が形成されることは知られていない。これらのことから、ハミ行動による胸部体表の損傷の可能性は低いと考えられる。

検体を持ち込む4日前に実施した網を用いた選別の際、網の通過時に体表が擦過した可能性が考えられ、特に背部や体側部に比べて鱗が小さい胸部や腹部がより損傷しやすいと思われた。網による選別作業が胸部体表に特異的に損傷を与えた可能性は否定できないが、本事例では胸部以外に穴あき症状がみられないこと、およびこれまで実施されてきた同様な選別によって、本事例のような症状が招来されていないことについては説明がつかない。本事例において、胸部体表に特異的に損傷を与えた原因については、今後、さらに検討する必要があると考える。

試験1の結果に示されたように、試験終了時における擦過+感染区の累積死亡率は感染区のそれに比べて有意に高かった。これは、胸部体表の損傷が侵入門戸となって *F. psychrophilum* 感染を促進させ、冷水病の病勢を増悪した結果、高い死亡率をもたらしたためと推測される。冷水病が発症する可能性がある養殖場では、死亡率を上げないためにも、胸部穴あき症状がみられた場合には冷水病対策を早急に施すことが必要と考えられる。

謝 辞

本報を執筆するにあたり、御助言等いただきました広島大学大学院 中井敏博教授には厚く御礼申し上げます。

文 献

- 青木 駿 (1974): アユのチョウチン病について, 水産増殖, **21**, 143-154.
- 江草周三・富永正雄 (1967): 佐久地方のアユに発生したいわゆるチョウチン病について, 魚病研究, **1**, 66-72.
- 遠藤 誠・孝橋賢一・高橋 誓・岩崎治臣 (2001): アユの冷水病に対する加温処理の予防効果Ⅰ, 滋賀県水産試験場研究報告, **48**, 1-4.
- 近畿農政局統計部 (2012): 近畿農林水産統計年報(平成22~23年), 近畿農政局統計部, 京都, 181 p.
- 城 泰彦 (2011): チョウチン病, 「新魚病図鑑 第2版, 畑井喜司雄・小川和夫監修」, 緑書房, 東京, p. 71.
- 三浦正之 (2011): 細菌性冷水病, 「新魚病図鑑 第2版, 畑井喜司雄・小川和夫監修」, 緑書房, 東京, p. 58.
- Miwa, S. and C. Nakayasu (2005): Pathogenesis of experimentally induced bacterial cold water disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 93-104.
- 酒井明久・二宮浩司・太田滋規・遠藤 誠 (2001): アユの冷水病に対する加温処理の予防効果Ⅱ, 滋賀県水産試験場研究報告, **48**, 5-10.
- 若林久嗣 (2004): 細菌性冷水病, 「魚介類の感染症・寄生虫病, 江草周三監修」, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 177-183.