

冷水病罹病アユの脾臓重量の増加

景山 哲史, 大原 健一, 桑田知宣

Enlargement of spleen weight of ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*)
infected by *Flavobacterium psychrophilum*

TETSUSHI KAGEYAMA, KENICHI OHARA AND TOMONORI KUWADA

アユの細菌性冷水病は、*Flavobacterium psychrophilum* (以下、冷水病菌) を原因とする感染症である。冷水病は1987年に徳島県の養殖場で確認されて¹⁾以来、現在では養殖場だけでなく天然河川においても発生し、アユ漁業に大きな被害を与えている。アユの冷水病における主な症状は、稚魚で体表の白濁、脂鱗から尾柄部のびらんや潰瘍が特徴的であり、体表や筋肉に出血の見られるものもある。²⁾ 成魚では、鰓や内臓の貧血以外には顕著な症状が見られないものが多いとされており、²⁾ 脾臓の外観的变化は特徴的な症状として報告されていない。しかし、冷水病により死亡したアユを解剖すると脾臓が通常のアユのそれより大きくなっていることを我々は経験的に認識している。一方、ニジマスにおいては脾臓の激しい肥大が冷水病の症状として示されている。³⁾

病気の発病に起因して発生する外観的あるいは剖検的の症状は、魚病診断を行う上で重要な判断基準となる。そこで、本研究では、脾臓重量の増加が冷水病の発病により起こる症状であることを確認するために、当所が有する湖産系および海産系のアユを用いて、冷水病の人為感染実験を行い、経時的な脾臓重量の変化を追跡することにより、冷水病の発病と脾臓重量の変化との関係について調べた。

キーワード： *Flavobacterium psychrophilum*、湖産系、海産系、脾臓重量比

方 法

1. 供試魚

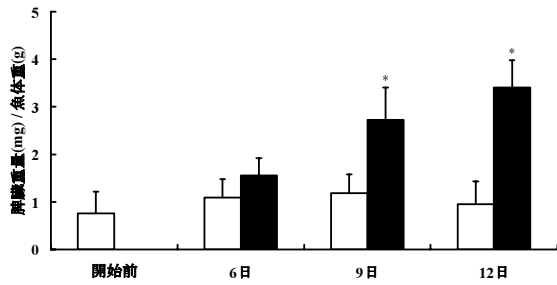
湖産系は2002年に琵琶湖産天然個体から、累代飼育した5代目、海産系は2003年に木曾川で採捕された親魚から累代飼育した3代目を用いた。実験開始時の供試魚の平均体重は湖産系が19.7g、海産系が21.1gであった。各系統群を実験開始直前に500Lパンライト水槽に収容した。湖産系および海産系を混養して実験感染を実施するため、左右の腹鱗をそれぞれ切除して標識した。

2. 実験感染

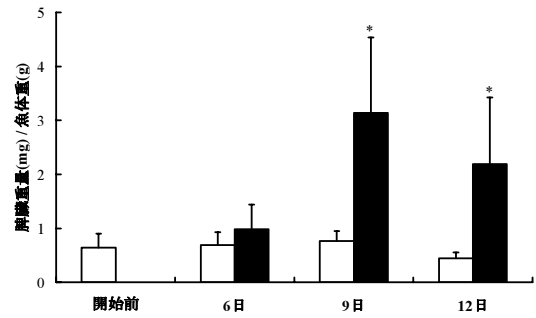
感染区および対照区にそれぞれ2水槽のパンライト水槽を用いて、計4水槽で試験を行った。Nagai *et al.*⁴⁾、

山本ら⁵⁾を参考にパンライト水槽の上流にFRP水槽(100L)を設置し、そこへ湖産系を25尾収容して、注水部に冷水病の死亡魚5尾を垂下した。この冷水病実験感染水槽の飼育排水を感染区の2水槽に導入した。一方、FRP水槽に湖産系25尾を収容し、死亡魚を垂下せずに飼育排水を、パンライト水槽に導入して、対照区とした。飼育水温は16.5~17.4℃であった。

感染区の上流FRP水槽では冷水病死亡魚の垂下6日後に死亡が始まり、死亡魚の症状および冷水病菌の分離により冷水病の発症を確認した。感染区において、湖産系は実験開始9日前後に死亡のピークを迎え、その後は死亡数が減少したが、18日後にほぼ全滅した。海産系は湖産系より死亡の増加が緩やかであり、実験開始18日後に累積死亡数は14尾であった。



第1図 湖産系の脾臓比の変化
 値は平均値を垂線は標準偏差を示している。
 *は対照区と有意差があることを示している ($p < 0.05$)。
 □対照区 ■感染区



第2図 両側回遊系の脾臓比の変化
 値は平均値を垂線は標準偏差を示している。
 *対照区と有意差があることを示している ($p < 0.05$)。
 □対照区 ■感染区

3. 冷水病発病の確認

実験感染における死亡魚を取り上げ、外観および解剖所見を観察した後、脾臓および腎臓から改変サイトファーガ(MCY)寒天培地⁶⁾を用いて4℃で冷水病菌の分離培養を試みた。これら分離培養により得られた黄色コロニーから分離菌のDNA抽出を行い、プライマーPSY-G1⁷⁾およびfpPPIC1⁸⁾を用いてPCRによる同定を行った。その結果、実験感染区の冷水病菌分離率は68.8~84.6%であり、全ての水槽で冷水病が発病していた。

4. 脾臓重量の測定

実験感染開始直前および6、9、12日後に感染区および対照区のそれぞれ2水槽から、各系統3尾ずつをサンプリングした。死魚個体はサンプリング対象から除外した。取り上げた個体は魚体重を測定した後、速やかに脾臓を摘出し、脾臓重量を測定した。以下の計算式により魚体重当たりの脾臓重量比(以下、脾臓比)を求め統計解析に用いた。なお、実験区および対照区それぞれ2水槽から得られた値の平均値を用いて解析した。

$$\text{脾臓比} = \text{脾臓重量(mg)} / \text{魚体重(g)}$$

5. 統計解析

各系統においてサンプリング日毎に感染区の供試魚と対照区の供試魚の脾臓比を分散分析により解析を行った。また、実験開始直前のアユの脾臓比について系統を要因とする一元配置分散分析を行った。全ての検定の有意水準 p は5%とした。

結 果

湖産系は実験開始前の脾臓比の平均が0.76であり、対照区の脾臓比は実験期間中大きな増減は見られなかった。感染区では実験開始6日後に1.56、9日後に2.72、12日後に3.40と増加した。また、実験開始6日後の感染区と対照区で脾臓比に差が認められなかったものの、9、12日後に

は感染区の脾臓比が有意に高くなった(第1図)。一方、海産系は実験開始前の脾臓比の平均が0.64であり、対照区の脾臓比は実験期間中大きな増減は見られなかった。感染区では実験開始6日後に0.98、9日後に3.13、12日後に2.19と増加した。また、実験開始6日後の感染区と対照区で脾臓比に差が見られなかったものの、9、12日後には感染区が有意に高くなり、湖産系と同様の結果となった(第2図)。

実験開始直前に湖産系および海産系それぞれ6尾の脾臓比を測定し、比較を行ったところ脾臓比に両系統間で有意差は認められなかった。

考 察

本研究に供試した2系統のアユは冷水病の発病により脾臓が大型化することが示唆された。そのため、冷水病に罹患したアユは脾臓の大型化が冷水病の1つの特徴であると考えられた。ニジマスでは冷水病菌の感染により、脾臓内の細胞が変性することが示唆されており、³⁾冷水病菌の感染により脾臓比が高くなることが示されている。⁹⁾アユにおいても脾臓内の細胞変性や壊死により、脾臓の大型化を起こしている可能性がある。今後、大型化の要因について病理組織学的検討を行うことで、冷水病菌の感染と脾臓重量の増加に関するメカニズムを明らかにする必要がある。

アユは系統によって、冷水病の耐病性に差が認められている。この耐病性の要因について、血清の殺菌活性や白血球の活性能などで検討されているが、それらはいずれも系統間で差異が認められていない。⁹⁾一方、ニジマスでは冷水病に対する抵抗性系統の方が感受性系統より脾臓比が高くなる傾向にあり、冷水病への抵抗性と脾臓比の間に相関関係があることを示唆している。そのため、冷水病耐病性系統作出のための指標として脾臓比の可能

性について言及している。¹⁰⁾ 本研究で供試した2系統アユは、冷水病感染実験下での死亡率に有意な差が確認されている湖産系および海産系を由来とする継代飼育系統であるが、³⁾ この系統間に、脾臓比の違いは認められなかった。今後、アユの冷水病対策として、効率的な冷水病耐病性系統の作出や耐病性を強化する飼育技術を開発するために、耐病性の要因を解明する必要がある。

要 約

冷水病の耐病性に差がある2系統のアユを供試して人為感染実験を行い、脾臓重量の変化を追跡した。2系統のアユはともに実験開始9日後には対照区より有意に脾臓比が高くなった。以上より、アユは冷水病菌の感染に伴い脾臓が大型化することが示唆された。

文 献

- 1) 若林久嗣, 沢田健蔵. アユの冷水病について, 平成4年度日本魚病学会春季大会講演要旨集 1992;4.
- 2) 若林久嗣. 細菌病, 「魚介類の感染症・寄生虫病」(若林久嗣・室賀清邦編) 恒星社厚生閣, 東京. 2004;177-183.
- 3) Rangdale RE, Richard RH, Alderman DJ. Histopathological and electron microscopical observations on rainbow trout fry syndrome. *The Veterinary Record*. 1999;144:251-254.
- 4) Nagai T, Tamura T, Iida Y, Yoneji T. Difference in susceptibility to *Flavobacterium psychrophilum* among three stocks of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish. Pathol.* 2004;39:159-164.
- 5) 山本充孝, 二宮浩司. 凍結病魚を用いた冷水病人為感染試験. 滋賀水試事報 2000;106-107.
- 6) Wakabayashi H, Egusa S. Characteristic of myxobacteria associated with some freshwater fish diseases in Japan. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 1974;40:751-757.
- 7) Izumi S, Aranishi F, Wakabayashi H. Genotyping of using PCR-RFLP analysis. *Dis. Aquat. Org.* 2003;56:207-214.
- 8) 吉浦康寿, 釜石 隆, 中易千早, 乙竹 充. Peptidyl-prolyl isomerase C 遺伝子を標的とした PCR による *Flavobacterium psychrophilum* の判別と遺伝子型. 魚病研究 2006;41:67-71.
- 9) Hadidi S, Glenney GW, Welch TJ, Silverstein JT, Wiens GD. Spleen size predicts of rainbow trout to *Flavobacterium psychrophilum* challenge. *J. Immunol.* 2008;180:4156-4165.
- 10) 桑田知宣. 冷水病耐病性の系統差と冷水病耐病性系統の選抜. 平成18年度岐河環研業報 2008;53:12-13.