

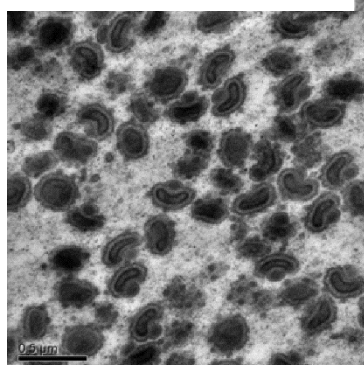
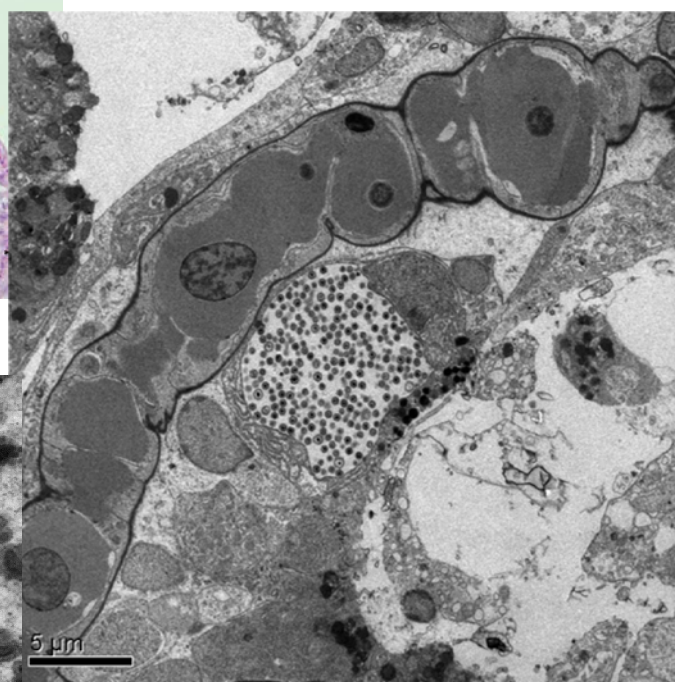
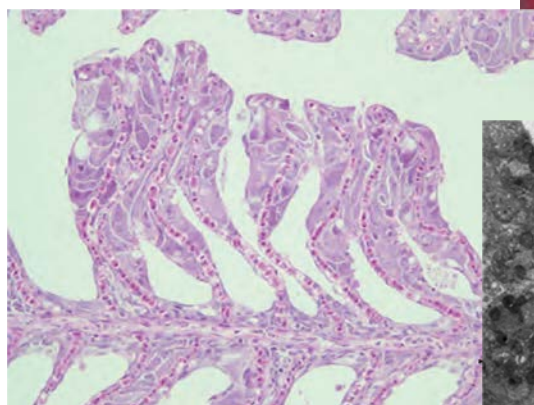
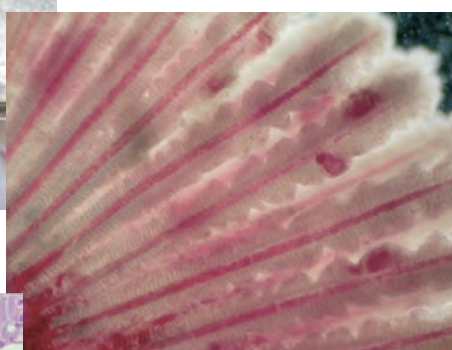
農林水産省委託事業

魚類防疫技術書シリーズ XXVII

## アユの異型細胞性鰓病

(Atypical Cellular Gill Disease : ACGD)

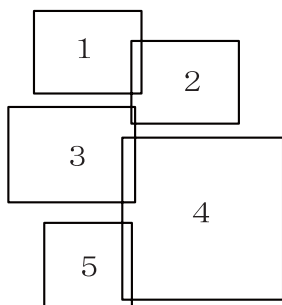
診断・治療マニュアル 第2版



令和6年3月



公益社団法人 日本水産資源保護協会



表紙の写真

1. ACGD 病魚の鰓 充血して赤黒い
2. ACGD 病魚の鰓 鰓薄板の癒合や出血点が観察される
3. ACGD 病魚の鰓の病理組織像
4. 異型細胞の透過型電子顕微鏡像
5. PaPV (*Plecoglossus altivelis* poxvirus) の透過型電子顕微鏡像

魚類防疫技術書シリーズ XXVII

## アユの異型細胞性鰓病

(Atypical Cellular Gill Disease : ACGD)

診断・治療マニュアル 第2版

令和6年3月



公益社団法人 日本水産資源保護協会



## 第2版刊行に寄せて

本書の初版は、農林水産省委託事業「養殖衛生管理問題に関する 調査・研究」の成果を受け、魚類防疫技術書シリーズ XXVII「アユの異型細胞性鰓病（Atypical Cellular Gill Disease：ACGD）の診断・治療マニュアル」として平成23年3月に刊行されました。本マニュアルは、都道府県水産試験場や養殖場において、本病の迅速な診断や対処などに利用していただけてきました。

初版発刊後、科学的知見も少しずつ増え、さらに、農林水産省の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」の中の課題「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」が令和元年度から令和5年度まで5カ年間にわたり、東京海洋大学、日本獣医生命科学大学、栃木県の3者により行われました。この課題の中で、本病の原因が *Plecoglossus altivelis* poxvirus (PaPV) と特定されるとともに、死亡発生に与える水温の影響や河川の天然遡上魚での感染状況、感染耐過魚および凍結保存魚などの感染源としてのリスクなどについても、新たな知見が得られました。初版のマニュアルが発刊されてから10年以上が経っており、今般、新たに得られた知見を加えて大きく改訂を行い、第2版を刊行することといたしました。

第2版を刊行するにあたり、執筆いただきました東京海洋大学の佐野元彦教授、日本獣医生命科学大学の和田新平教授ならびに栃木県水産試験場の研究担当者の各位に厚くお礼申し上げます。

今後とも、本病による被害を最小限に抑えるべく、本マニュアルを広くご活用いただきたいと思います。

令和6年3月

公益社団法人 日本水産資源保護協会  
会長 高橋正征

## はじめに（初版）

当協会では、農林水産省 消費・安全局の委託を受けて養殖衛生対策推進事業を実施しており、その一環として、水産動物の防疫技術等に関する技術書を作製し、防疫対策の推進および技術の普及・指導に利用していただいております。

本年度は、魚類防疫技術書シリーズ XXVII として、養殖アユにおいて発生するアユの異型細胞性鰓病について、「アユの異型細胞性鰓病（Atypical Cellular Gill Disease：ACGD）の診断・治療マニュアル」を作製いたしました。

これまで本病は、類似した症状を示す細菌性鰓病とともに「ボケ病」と総称されておりました。原因も不明で、明確な対処・治療法もなかったため、時に甚大な被害を引き起こしておりました。この度、農林水産省委託事業「養殖衛生管理問題に関する調査・研究」において、東京海洋大学、日本獣医生命科学大学、栃木県の3者による4カ年にわたる調査と研究の結果、原因の解明と簡便な検査・診断手法、養殖場で実施可能な治療法が確立されました。これらの知見を魚病担当者の皆様にご活用いただき、本病による被害を最小限に抑えるべく、マニュアルとしてまとめました。

本マニュアルを執筆いただきました東京海洋大学海洋科学部の福田穎穂教授、日本獣医生命科学大学の和田新平准教授ならびに栃木県水産試験場の研究担当者の各位に厚くお礼申し上げます。

平成 23 年 3 月

社団法人 日本水産資源保護協会  
会 長 川 本 省 自

# 1. アユの異型細胞性鰓病とは

## (1) 異型細胞性鰓病 (Atypical Cellular Gill Disease: ACGD) とは

ACGDはアユの鰓上皮細胞にポックスウイルス科のPaPV (*Plecoglossus altivelis poxvirus*) (図1)が感染し、大型の異型細胞が形成される病気で、鰓薄板の癒合や鰓弁の棍棒化によって鰓表面積が減少し(図2)、主に呼吸機能が低下する病気である。発病魚は呼吸不全により摂餌不良や緩慢遊泳など、酸欠状態で見られる症状を示す。

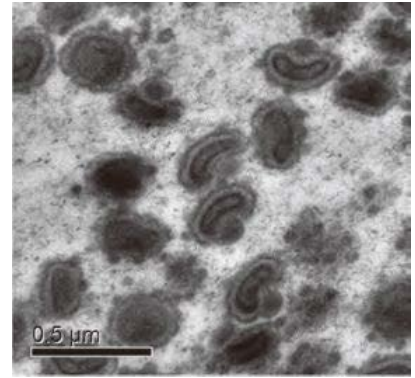


図1 PaPVの電子顕微鏡像

## (2) 疫学

ACGDは関東地方から九州地方にいたる各地で人工種苗を用いた養殖アユに発生が確認されている。天然水域では、ふ化後の流下仔魚の感染はみられないものの、河口周辺での遡上前の稚魚の感染が知られる。感染魚での重篤な病変は観察されておらず、感染による死亡はないものと推測される。さらに、河川における天然遡上魚でもウイルスが検出されるが、そのウイルス量は少なく、発病もみられないことから、これらは感染耐過魚と推測される。琵琶湖においても同様な感染状況と想像される。天然種苗を用いた養殖での発生の報告はなく、これは天然種苗が免疫を持った感染耐過魚であるためと推測される。発病時の水温は16°C~28°Cで、特に17°C~20°C付近で多発する傾向がある。4月~10月にかけて発生が見られるが、8月までの発生例が多い。魚体重の大小に関わらず体重3g~150gで発生し、発生と飼育密度にも関連性は認められず、0.4kg/m<sup>2</sup>~17kg/m<sup>2</sup>の広い範囲で発生が見られている。また、ACGDによる死亡率は0.1%程度から100%と幅広いが、概ね10%以内の事例が多い。しかし、50%以上が死亡する事例も少なからずある。現在までに、PaPVは感染魚との同居や感染魚群の飼育排水の導入により水平感染することはわかっているが、PaPVの感染源は特定されておらず、発生時に適切な対処を行うことによって被害を軽減することが現実的な対策といえる。

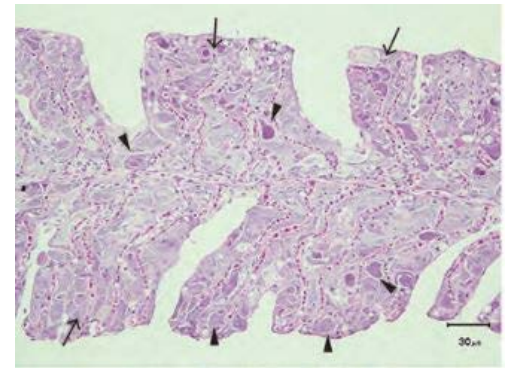


図2 ACGD病魚の鰓の病理組織像  
異型細胞(矢頭)の出現と鰓薄板の癒合(矢印)が認められる(H&E染色)

## (3) 類似の病気

ACGDのほかに、同様な症状を示す病気に細菌性鰓病(Bacterial Gill Disease: BGD)があり、BGDとACGDの混合感染の場合もある。アユ養殖の現場において通称「ボケ病」と呼ばれている病名は、かつてはBGDのことを指す用語であったが、1990年代より見られるようになった不活発遊泳、食欲の低下、突然の大量死を特徴とする不明病(後にACGD)についても「ボケ病」と呼ばれるようになった。そのため、病気発生後の対応に混乱が生じていた。ACGDあるいはACGDとBGDとの混合感染に対してBGDと同様に対応すると、想定外の大量死を招くことがあ

るので注意が必要である。BGDは短時間の塩水浴で治療は可能であるが、ACGDは短時間浴では治りにくく、BGDとは異なった対応が必要になる。

\*細菌性鰓病は *Flavobacterium branchiophilum*による感染症であるが、ここでは鰓弁に大量に長桿菌が付着・増殖することにより棍棒化し、呼吸障害が生じる病気を総じて指す。

#### (4) PaPV 感染から ACGD 発病・死亡までの経過

感染の進行は、水温によって異なり、低いほど遅く、高いほど早い。17°C～20°Cの好発水温帯でみると

- ① PaPV 感染初期：PCR 法で PaPV を検出できるが、感染個体に特に異常は認められず、正常に遊泳・摂餌する状態が続く。
- ② PaPV 感染 5 ～ 7 日後：摂餌活性が低下し、摂餌すると飛び跳ねる、体を斜めにして緩慢に遊泳する等の異常行動を示す個体が見られるようになる。
- ③ PaPV 感染 7 ～ 10 日後：ACGD の典型症状（2. 早期発見のポイント、ア）～ ウ）に記載）を示し、異常遊泳する個体や鰓蓋が開いた個体が多数観察され、死亡が発生する。

ACGDの場合、後述するように塩水浴治療前の餌止め等、周到な準備が治療の結果を大きく左右するので、異常の早期発見が大切になる。これまで養殖現場における飼育魚の観察ポイントとされてきた項目で ACGDと判定することは難しいため、次章に記載した点に注意し、飼育魚の毎日の変化を把握する必要がある。



## 2. 防除法

### (1) 消毒法

PaPVは脂質膜を有するウイルス粒子であることから、同様な脂質膜を有するウイルスなどと同様な消毒方法が有効と考えられる。同じ分類群のウイルスであるコイの浮腫症ウイルス（CEV）とコイを用いた実験により70%エタノール液、0.1%塩化ベンザルコニウム液、500ppmポビドンヨード液が有効であることが確かめられており、コイヘルペスウイルスで推奨される消毒方法（注）でPaPVも十分に不活化されると考えられる。

例えば、養殖池には有効塩素濃度200ppmの次亜塩素酸（次亜塩素酸ナトリウム溶液あるいはさらし粉）で30分～1時間程度、池水には終濃度が3ppmとなるように次亜塩素酸（次亜塩素酸ナトリウム溶液あるいはさらし粉）を投入し、30分～1時間程度消毒を行う。網や長靴などの飼育器材等には、0.1%塩化ベンザルコニウム液や200ppm次亜塩素酸、500ppmポビドンヨード液に完全に漬けて、手指には70%エタノール液の噴霧を行い、消毒する。次亜塩素酸やポビドンヨードは有機物と反応するため、有機物の多いものでは、有効塩素濃度あるいは有効ヨード濃度の低下に留意する。特に、次亜塩素酸は有機物と反応して塩素ガスが発生するため、換気に十分に注意する。また、ヨード剤や塩化ベンザルコニウムは金属を腐食させるため、金属の容器に入れておかないようにする。消毒槽などに日光が当たる場合には蓋などをし、定期的に中の消毒剤を交換する。

（注） 農林水産省消費・安全局のHPに示されたコイヘルペスウイルス病の消毒に関する資料を参照のこと：  
[https://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/koi/k\\_syoudoku/index.html](https://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/koi/k_syoudoku/index.html)

\* 消毒方法について \* 消毒方法早見表

### (2) 場内汚染と防除のポイント

PaPVは天然水域に広くまん延していると考えられ、実際に栃木県では、河川で採捕された海産天然遡上アユから高頻度で検出される。一方で、天然水域でのACGDの発生は事例がなく、小型のうちに感染することで死亡せずにキャリアになっていると推測されている。まずは、こうした天然水域、あるいは他の養魚場からの侵入リスクを低減することが必要である。

また、AGGDの発生履歴がある養魚場では、場内の様々な施設、用具が高頻度で汚染されていることがわかっている（表1）。このことは、養魚場内で汚染が広がっていることを示唆する。天然水域でのまん延状況とアユ養殖の実態から考えると、PaPVの侵入リスクをゼロにはできない養魚場がほとんどであると考えられ、発生リスク低減のためには場内での汚染拡大を防ぐことも重要である。

表1. ある養魚場での施設、用具のPaPV汚染状況

調査年	調査日	調査場所	1st PCR	2nd PCR	陽性率 (%)
2020年	9月2日	事務所入口扉	-	-	90
		冷凍庫入口扉	-	+	
		注水コック	-	+	
		給餌器	-	+	
		活魚トラック扉	-	+	
		おとり販売所扉	-	+	
		飼料倉庫扉	-	+	
		酸素ポンベレギュレーター	-	+	
		おとり用たも網	-	+	
		製氷機扉	-	+	
2021年	9月13日	事務所入口扉	-	-	50
		冷凍庫入口扉	-	-	
		事務所電話受話器	-	-	
		給餌器	-	-	
		活魚トラック扉	-	+	
		おとり販売所扉	-	+	
		飼料倉庫扉	-	+	
		酸素ポンベレギュレーター	-	+	
		おとり用たも網	-	+	
		製氷機扉	-	+	

## ア) 養魚場内への侵入リスクを低減するために

### ① 種苗導入・加工原料について気をつけること

当然であるが、PaPVフリーの種苗を導入すべきである。

また、特に加工場が同じ敷地内にある養魚場においては、加工原料についても発病魚や感染耐過魚ではないことを確認して搬入することが望ましい。冷凍保存された発病魚からの感染が起こることがわかっており、加工施設付近では高頻度で汚染が確認されることから、加工原料からのドリップ等が感染源の一つとなっていることが疑われている。

### ② 鳥による持込みの防止

防鳥ネットやテグスの設置など、鳥類の飛来を防ぐ対策を実施することが重要である。

魚類を捕食するカワウやサギといった鳥類の糞からは、比較的高頻度でPaPVが検出される。これらの鳥は、驚いたときや飛び立つときに捕食していた餌を吐き戻すことがあることも知られており、こういった鳥類の糞や吐き戻しが天然水域から養魚場内への侵入経路の一つとなっている可能性は高い。

### ③ おとり販売等での人による持込み防止

同じ敷地内で友釣り用のおとりアユ販売を営んでいる養魚場も多いことから、絶対に汚染させたくないエリアとおとりアユ販売エリアを明示し、前者への釣り人の立入りを禁止する、魚の移動を一方通行にするなどの対策が必要である。

不特定多数の人が訪れること、河川で使ったオトリ缶（アユを生かしたまま釣場へ運ぶ道具）をそのまま持込む釣り人も多いことから、オトリ販売に伴うPaPVの持込みリスクは高いと考えられる。

## イ) 養殖場内での汚染拡大を防ぐために

### ① 作業動線の最適化と適切な消毒の実施

日頃どのような動線で作業しているか、汚染される可能性の高い場所はどこかをよく検討し、作業動線を最適化したうえで必要な場所に消毒ポイントを設置することが必要である。例えば、せっかく消毒したのに、再び汚染の可能性の高いエリアに戻ってから汚染させたくないエリアに行くような動線になっては意味がない。

もちろん、(1)を参考に適切な消毒方法を選択することが必ず必要である。実際に、これらの対策を前述の表1の養魚場で実施したところ、PaPV汚染状況が大きく改善された(施設や用具のPCR陽性率:50~90%⇒0~20%)。

### ②発症群や天然種苗とPaPVフリーの人工種苗の混養禁止

感染耐過魚はACGD発症から3ヶ月以上が経過してもPaPVを保有し続け、未発症魚と同居させると感染が拡がることわかっている。つまり、ACGDを発症した群は、症状が治まり、治療が終了した後であってもキャリアとなりえる。また、前述のように天然種苗もキャリアになっている可能性が高い。

したがって、発症群や天然種苗をPaPVフリーの人工種苗と混養するべきではない。さらに、少なくとも発症群を加工原料とするのも避けることが望ましい。

### ③早期診断、早期治療

AGGDの治療開始の遅れは、その池の被害を増大させるだけでなく、飼育水等を介して周辺の池や施設、用具へも汚染を拡大させる。つまり、異常を察知したら速やかに診断を受け、直ちに治療を開始することが重要である。

## (3) 予防に向けて

感染耐過魚である天然種苗を用いた養殖では本病の発生の報告がないことから、これらの魚はACGDに対して免疫を獲得していると推測される。つまり、ワクチンによる予防は可能であることを示唆している。PaPVは現時点では細胞を用いた分離・培養ができていないため、ウイルスを大量に培養して、ワクチンを作製することはできないが、PaPVの遺伝子塩基配列はほぼ解読できているため、これらのウイルスタンパク質遺伝子の塩基配列情報からDNAワクチンや組換えタンパク質ワクチンなどを作製することができる。いくつかのウイルス遺伝子での試験を行ったところ、感染防御が認められており、将来的にワクチンの実用化が可能と思われる。

### 3. 早期発見のポイント

#### (1) 観察に適した時間

その日最初の給餌と最後の給餌のときの魚の状態を特に注意して観察する。

その日最初の給餌前は 1 日のうちで最も溶存酸素量（以下 DO と表記）が多く、最後の給餌後は 1 日のうちで最も DO が少ない時間帯である（図 3）。ACGD は呼吸機能に障害が発生する病気であるため、朝、DO が多いにもかかわらず前日までと違う行動が見られる、あるいは夕方、DO が少なくなったときに前日までと違う行動が見られる、などに注意して観察をすると異常を見つけやすい。

タイマーと自動給餌機を併用して無人（観察できない状態）のまま給餌を行うと発見が遅れる。少なくとも、その日最初の給餌時は、アユの行動を慎重に観察するべきである。

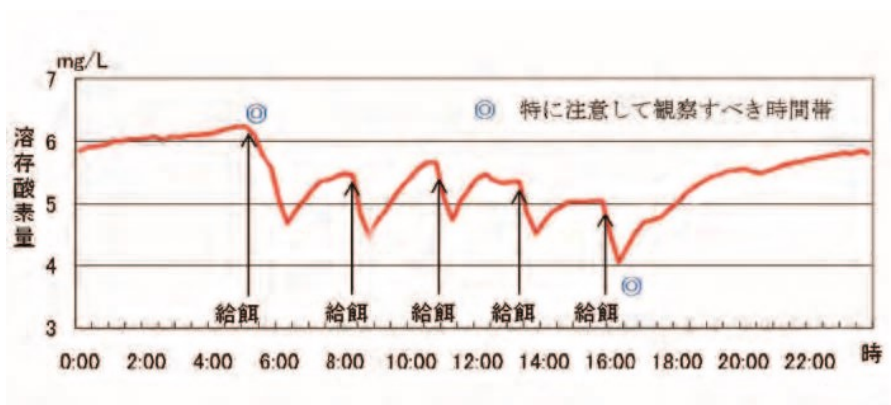


図 3 アユの養殖池における溶存酸素量の日変化

#### (2) 観察すべきポイント

下記のア)～ウ)に、ACGD が疑われるときの飼育魚の行動、発病魚の特徴、養魚池の飼育水の状態を示した。1 日の最初の給餌の際にこれらのポイントを観察し、1 つでも該当する項目があれば ACGD を疑って行動することが肝要である。なお、給餌前に DO を測定し、問題がないことを確認すること。

##### ア) ACGD が疑われるときの飼育魚の行動

###### 〈給餌前〉

- ・ 魚群の反応が鈍く、人が近づいても逃げない。
- ・ 注水部や水流の弱い水車の裏などに魚が集まる（図 4）。
- ・ 水流に流される個体や水面付近でくるくる回る個体がみられる。
- ・ 鰓蓋を開いている個体がみられる（図 5）。

### 〈給餌中、給餌後〉

- ・ 餌寄りおよび餌食いが悪い。
- ・ 摂餌後に飛び跳ねる個体が多く見られる。
- ・ 給餌してしばらくすると死亡個体が増える。



図4 水流の弱い場所に集まるアユ



図5 鰓蓋が開いたアユ

### イ) ACGD発病魚の特徴

- ・ 体色が黄変（トラ模様）、あるいは黒化する（図6）。
- ・ 体表がざらざら（鮫肌）している。
- ・ 鰓が充血して赤黒い（図7）。
- ・ 死亡していないのに死後硬直のように体が硬く感じられる。
- ・ 肝臓はうっ血して赤黒い。
- ・ 死亡魚は群の中で大型の個体が多い。



図6 体色が黄変（トラ模様）している死魚



図7 ACGDにより充血した鰓

### ウ) ACGDが疑われるときの養魚池の飼育水の状態

- ・ 給餌前の DO は正常値の範囲内。  
[DOが著しく低い値を示すときは、貧酸素による異常行動や死亡の可能性が疑われる。]
- ・ 通常よりも、飼育水の白濁や泡立ちが見られる。

### (3) 異常が観察された場合の対応

飼育魚に異常が観察された場合、速やかに以下の対応をとる。

- ① 直ちに餌止めを行う。
- ② PCR検査を実施する。  
[細菌性鰓病や細菌性冷水病についても同時に検査することが望ましい]
- ③ PCR 検査で PaPV 陽性の場合には、ACGD として処置する。
- ④ ACGD感染による被害を抑えるため、直ちに後述の塩水浴を実施する。

重要なことは、安易な自己判断をせずにPCR 検査の結果が出るまでACGD であることを疑い、準備を怠らないことである。

## 4. 診断方法

### (1) 鰓ウェットマウント標本の観察

〈生産者および魚病検査機関が実施〉

- ① 病魚の鰓を切り出し、汚れていないスライドガラス上に乗せ、水（水道水ないし飼育水）を数滴垂らしてからカバーガラスを被せる（ウェットマウント標本・図8）。
- ② 顕微鏡を用いて低倍率（ $\times 40 \sim \times 100$ ）で観察し、鰓薄板の癒合の程度、赤血球の塊（動脈瘤）および寄生虫の有無を観察する（図9）。
- ③ 高倍率（対物レンズ  $\times 20 \sim \times 40$ ）で長桿菌の有無を観察する（図10）。
- ④ 鰓薄板の癒合や長桿菌の付着・繁殖が観察されれば、この時点でBGDあるいは混合感染と判断する。
- ⑤ 長桿菌の付着・繁殖が観察されない場合は、ACGDが疑われる。



図8 鰓のウェットマウント標本

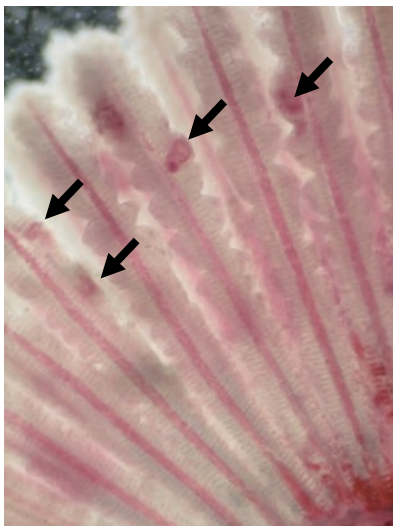


図9 ACGD病魚の鰓  
鰓薄板の癒合や赤血球の塊（→）が  
観察される

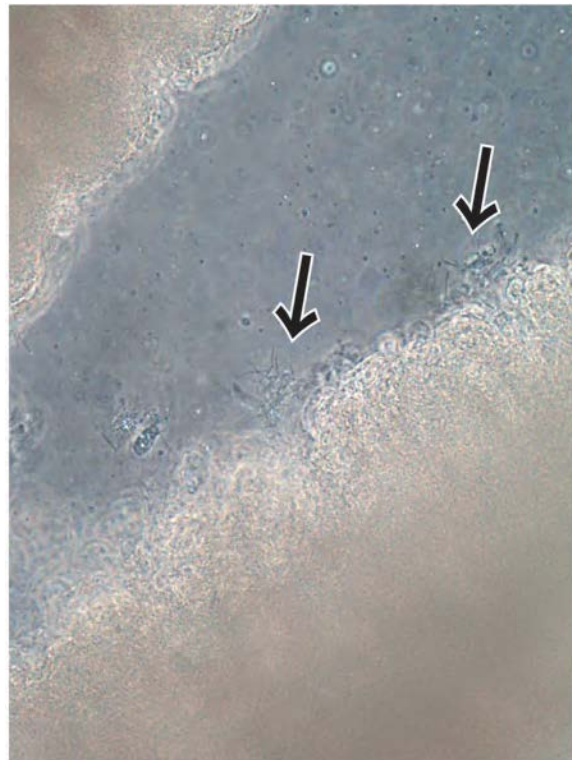


図10 鰓弁に細菌の繁殖が見られる例

## (2) 鰓スタンプ標本の作製とディフクイック染色による異型細胞および長桿菌の観察 (生産者および魚病検査機関が実施)

### a) 供試魚

- ・「3. 早期発見のポイント」に記載されている行動や症状を示す瀕死魚を、一池あたり最低 5 尾採取して実施する。
- ・必ず瀕死魚（難しい場合は死亡後 10 分以内の魚）を使用する。
- ・鰓を切除する前に、尾柄部を切断して脱血することが望ましい（図 11）。

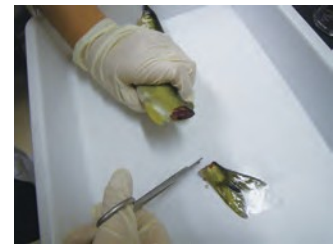


図 11 尾柄部を切断して脱血する

### b) ディフクイック (Diff-Quik 以下 DQ と表記) 染色の手順

- ① 瀕死魚の鰓蓋を除去し、鰓葉を 1 枚切り出す。
- ② 鰓をスライドガラス上に軽くスタンプするように 2 列で押し付ける（スタンプ標本・図 12）。
- ③ スタンプ標本を冷風で風乾させ、DQ 染色キットに付属する固定液（99.5%エタノールでも可）に 5 回出し入れして固定する。固定後は冷風で風乾させる。
- ④ キットの説明書に従って染色を施す。
- ⑤ 水道水で余分な染色液を流して冷風で風乾させる。

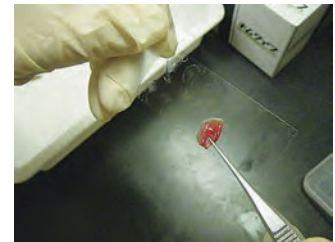


図 12 鰓弁のスタンプ



2～3列になるように作製

### c) 観察

光学顕微鏡により異型細胞および長桿菌の有無を観察する。

鰓スタンプDQ染色標本上で異型細胞を検出するには、ある程度の数の異型細胞が鰓弁上に形成されている必要がある。ACGDが軽症である場合、異型細胞を見落とす、あるいはスタンプ標本上に異型細胞を拾うことができないことが起こりうる。また、全国湖沼河川養殖研究会アユの疾病研究部会が平成 22年度にとりまとめたデータによると、検鏡による異型細胞の検出はPaPVのPCR検査に比べて感度が低かった。従って、異型細胞の検査結果が陰性でも必ずPaPVのPCR検査を実施する。

※「3. 早期発見のポイント」に記載されている行動や症状を示す瀕死魚の鰓スタンプ DQ 染色標本上で異型細胞が検出できず、PaPV-PCRが陽性の場合、軽症のACGDであると判定し、ACGDに対する塩水浴処置を実施する。



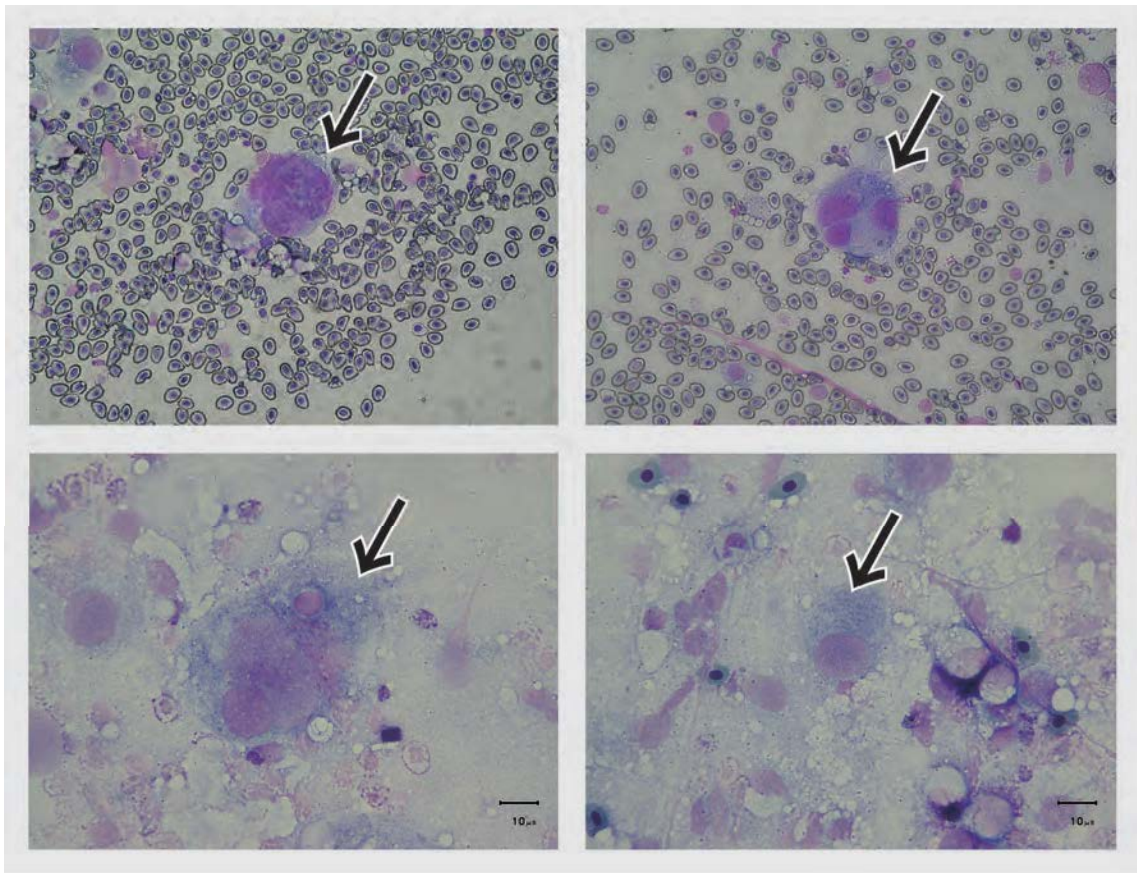


図 13 異型細胞の DQ 染色像

### 異型細胞の形態学的特徴（図 13）

- 大きさ**：赤血球の 7~8 倍から 10 倍以上にも達する大型細胞。赤血球の形態が不明瞭なスタンプでは判断しにくい。
- 色調**：細胞質は薄青色、核は赤紫色でしばしば染色性に不均一性がみられる。概ね正常なマクロファージに類似した色調である。
- 形態**：細胞質はしばしば周囲と境界が不明瞭で空胞が含まれることもある。核は大型（核／細胞質比が高い）であり、不整形で複数個存在する場合もある。また、数個の異型細胞が塊状をなす場合も多核に見える。核に切れ込みや空胞が観察されることがある。
- ※ 異型細胞はしばしば塊状に集まり、確認しにくいことがある。なるべく分散した箇所を観察するとわかりやすい。

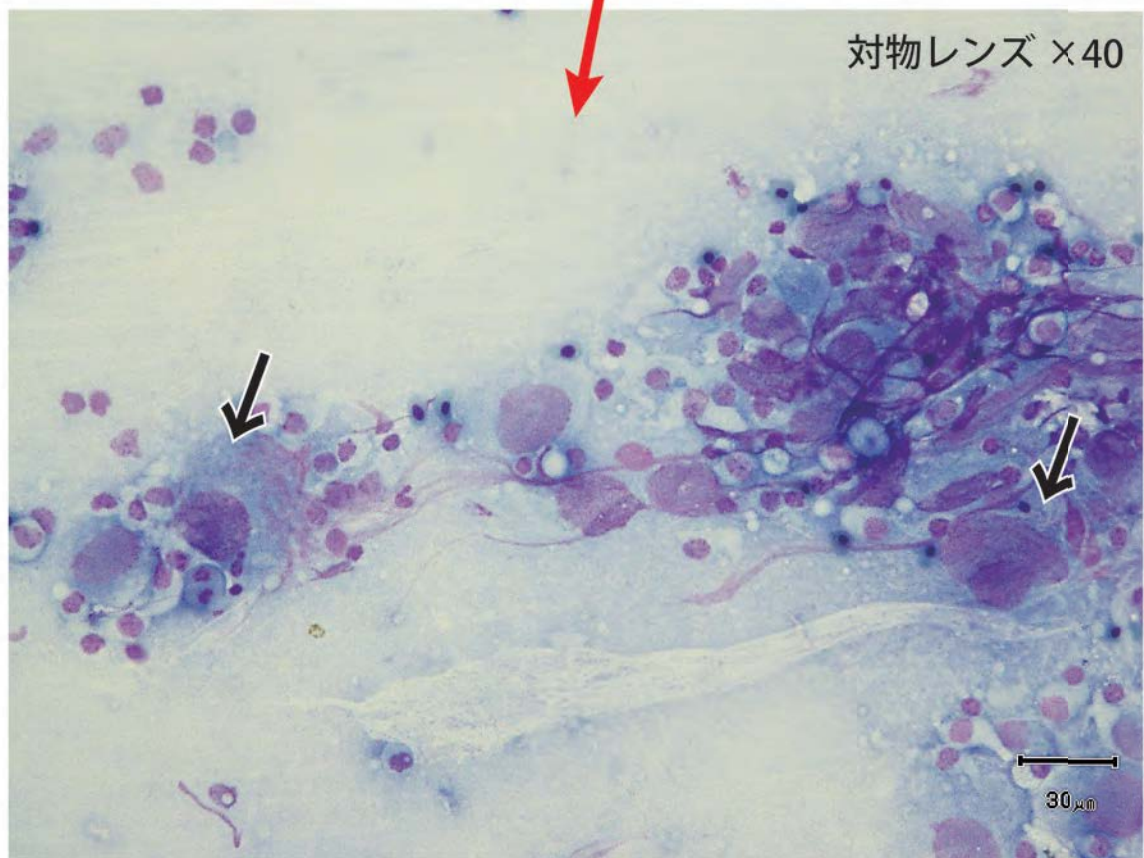
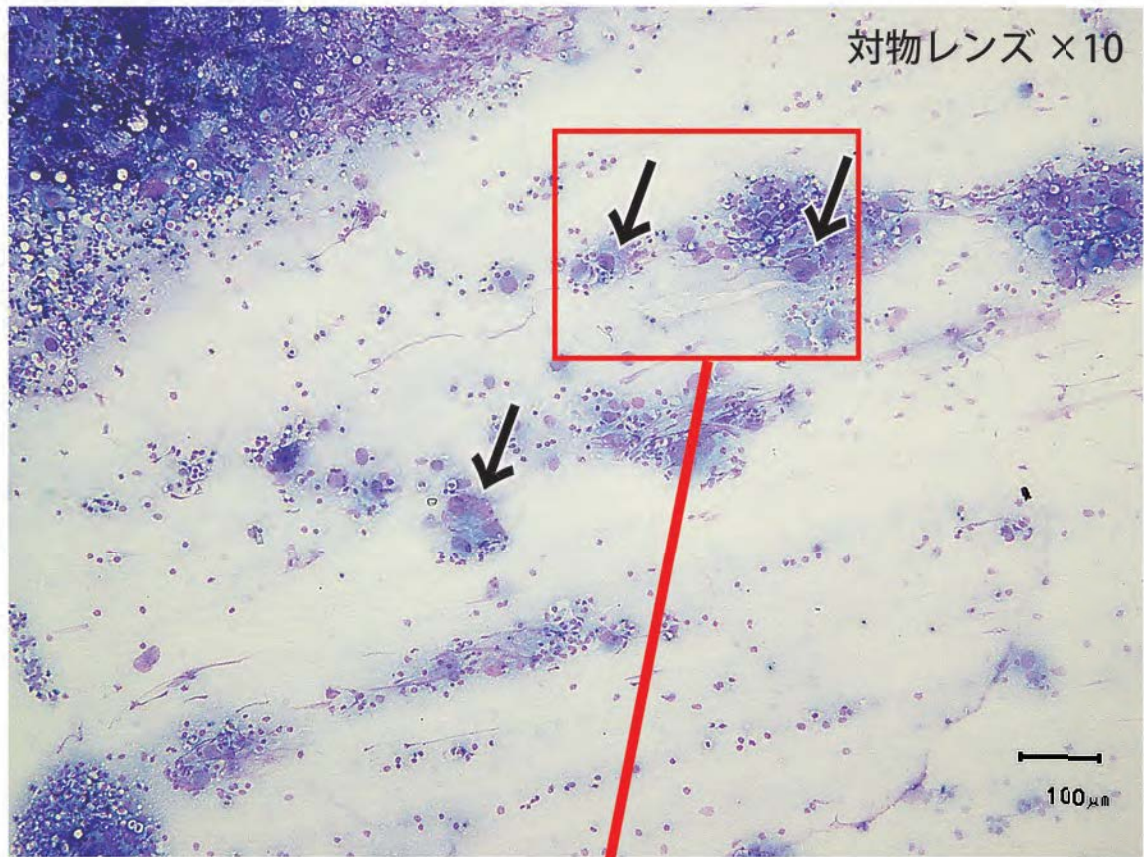


図 14 異型細胞（矢印）を低倍（対物×10）で探し、高倍（対物×40）で確認する。

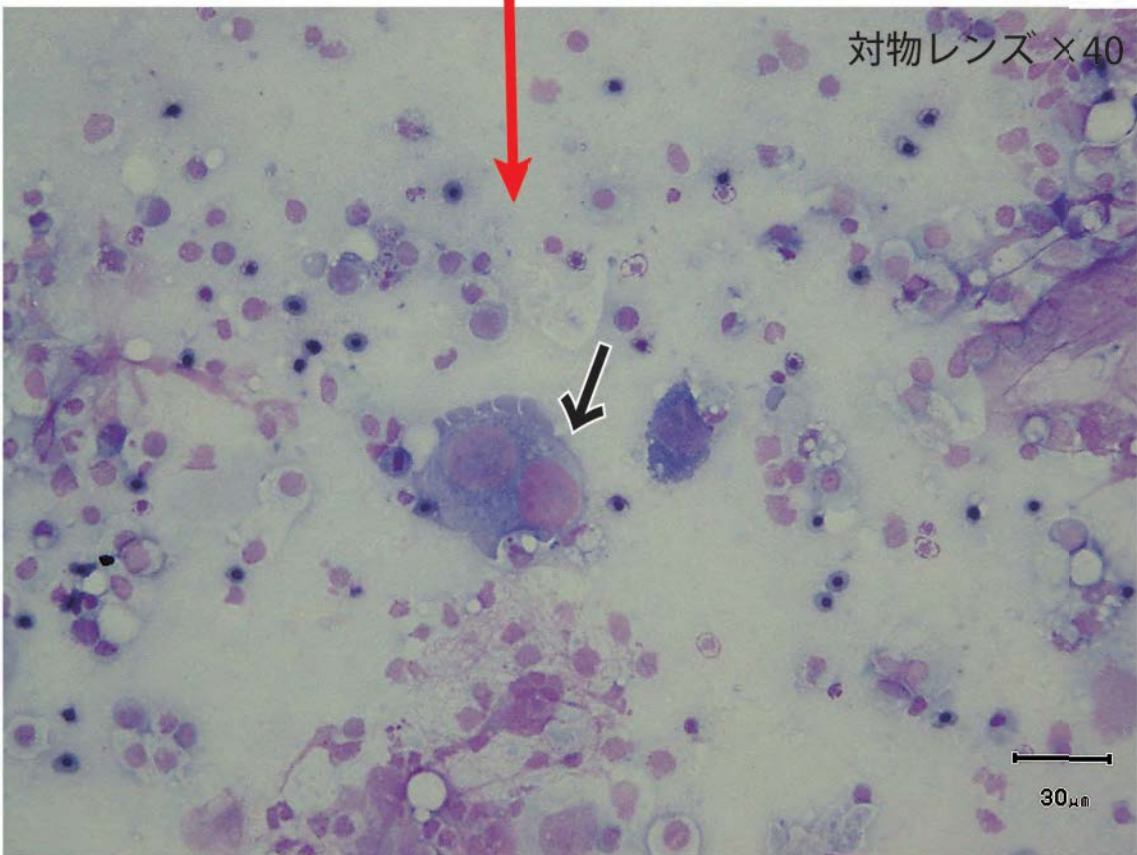
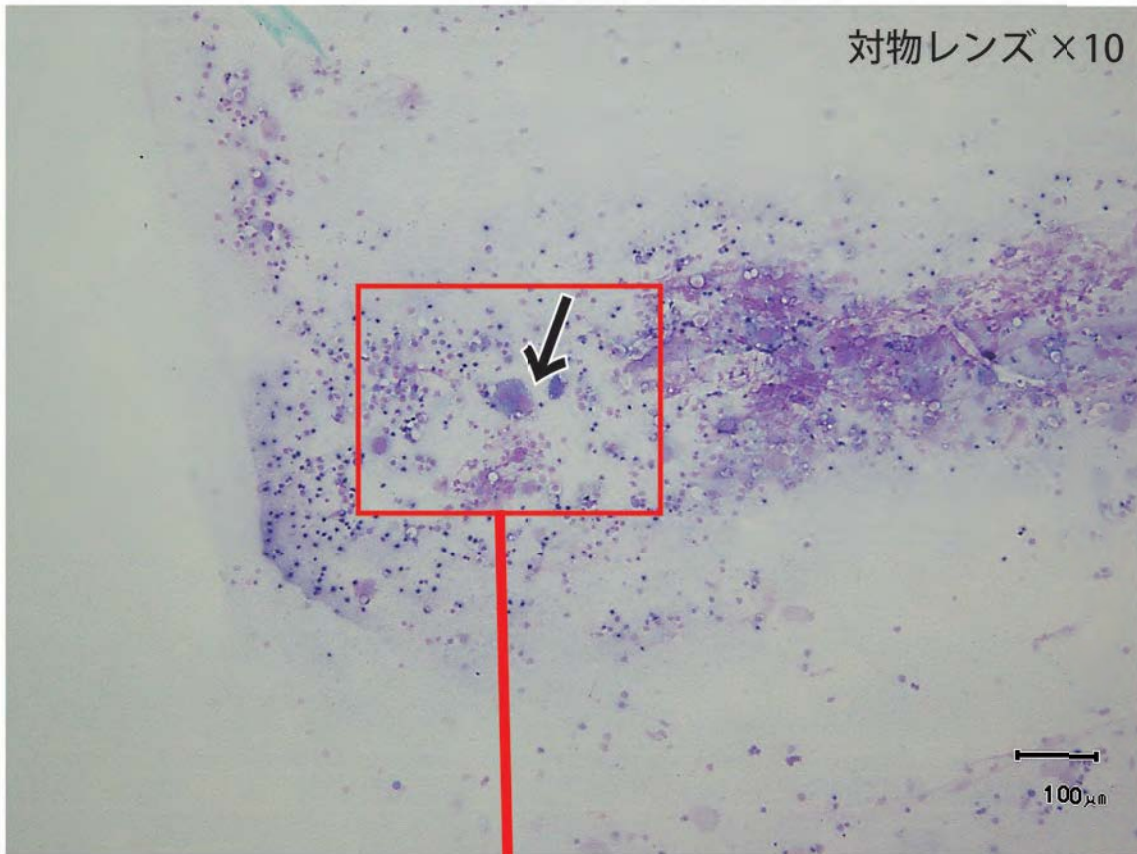


図 15 異型細胞（矢印）が 1 個だけ観察される視野。この異型細胞には核が 2 つ観察される。

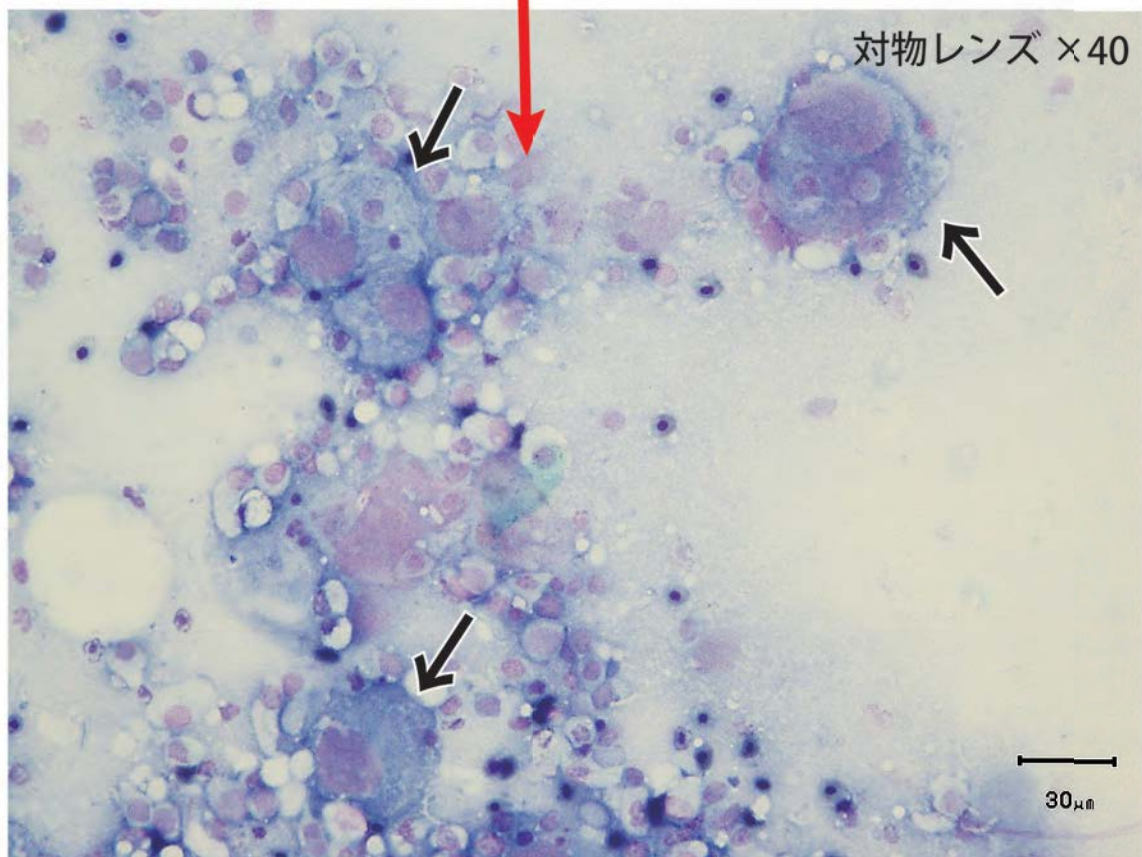
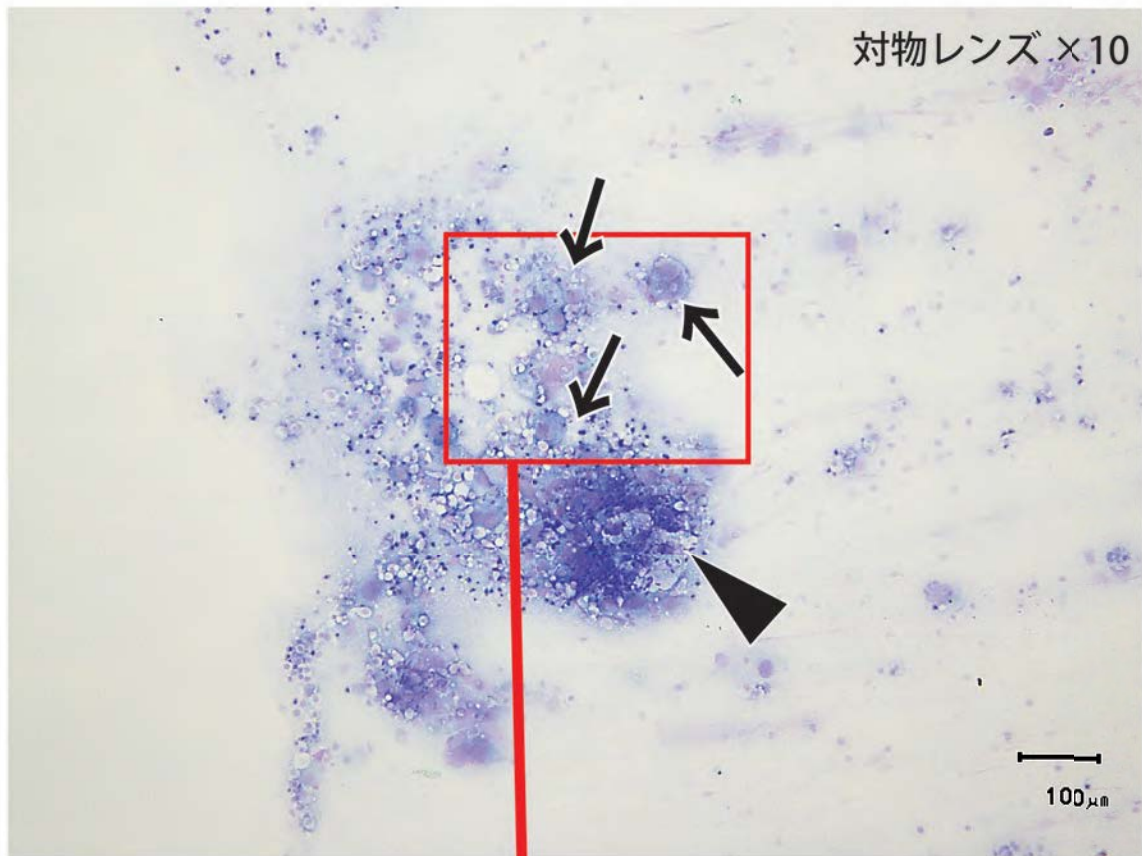


図 16 分散した異型細胞（矢印）は高倍で確認できるが、塊状となった異型細胞（矢頭）は識別しにくい。

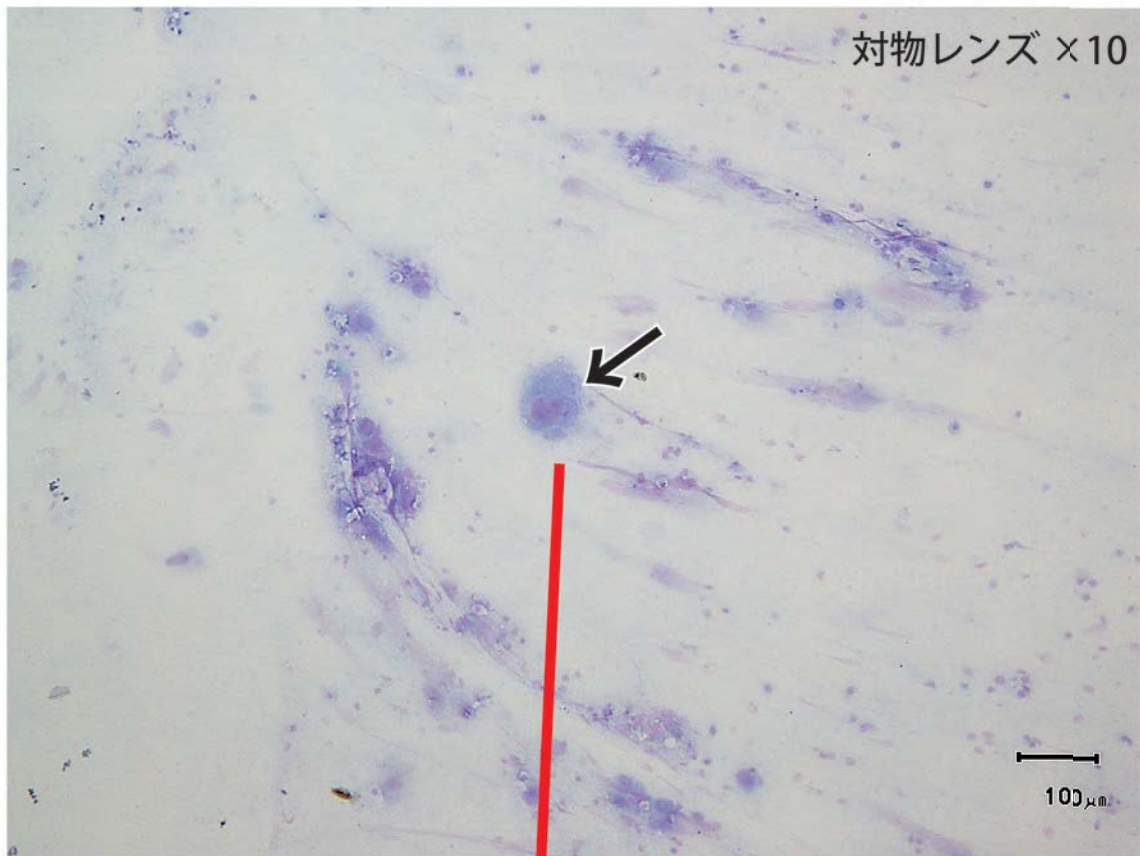


図 17 このスタンプでは赤血球は不明瞭であるが、異型細胞（矢印）がきわめて大型なので確認しやすい。

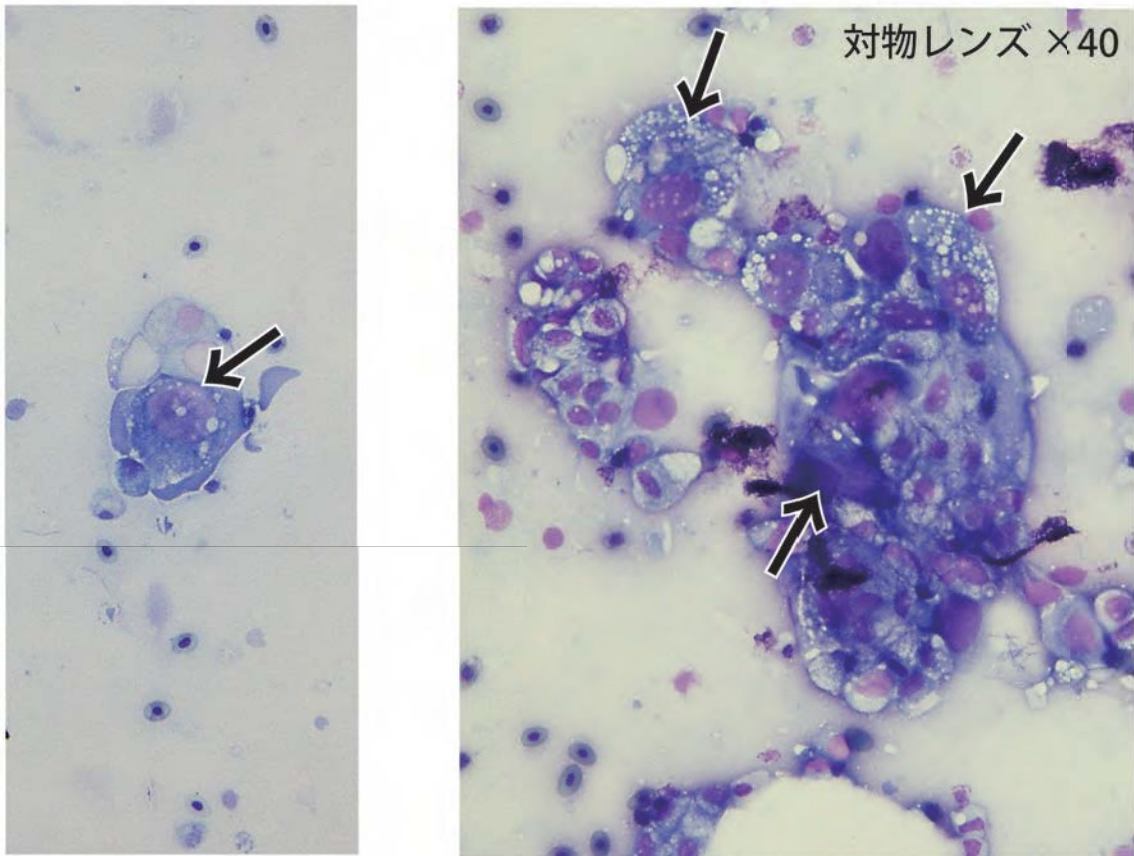


図 18 異型細胞（矢印）は細胞質内ないし核内に空胞が観察されることもある。分散した状態（左）および塊状（右）の異型細胞。

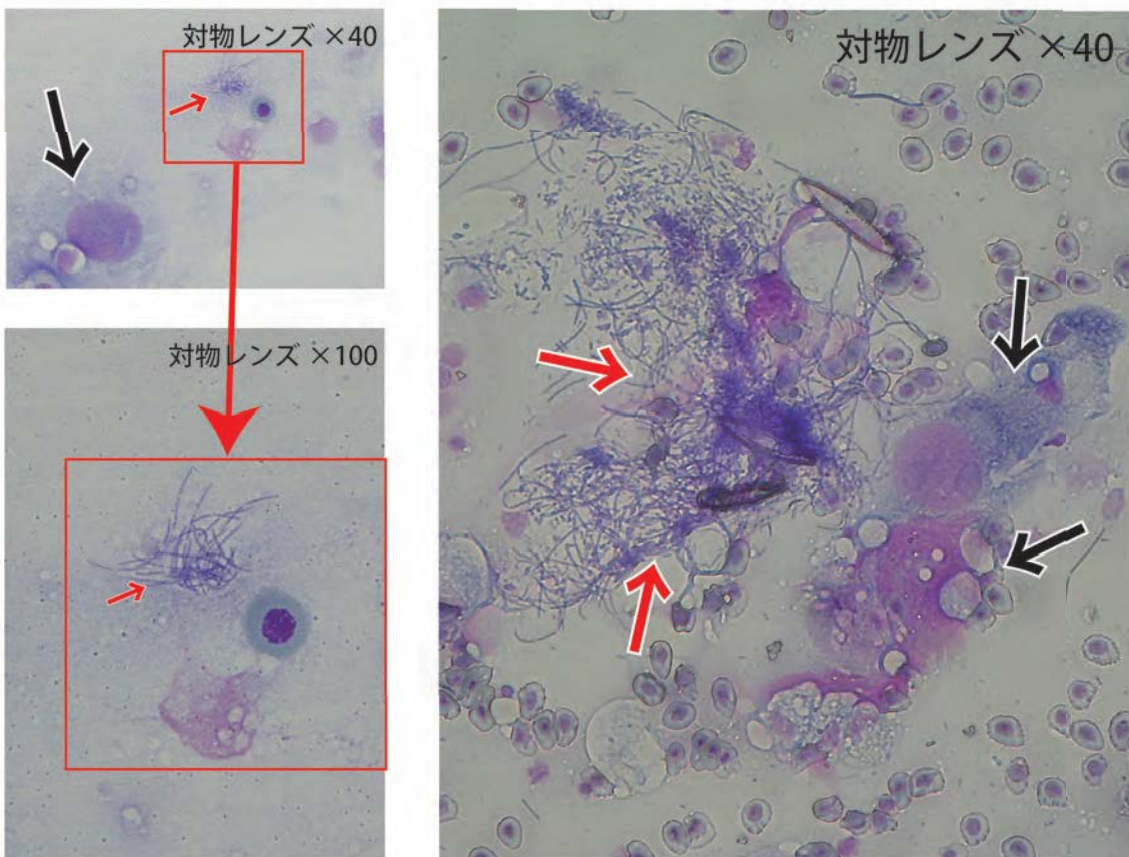


図 19 左：高倍で長桿菌（赤矢印）を見つけたら油浸レンズで確認する。  
右：鰓スタンプ標本で観察される長桿菌の例。黒矢印は異型細胞。

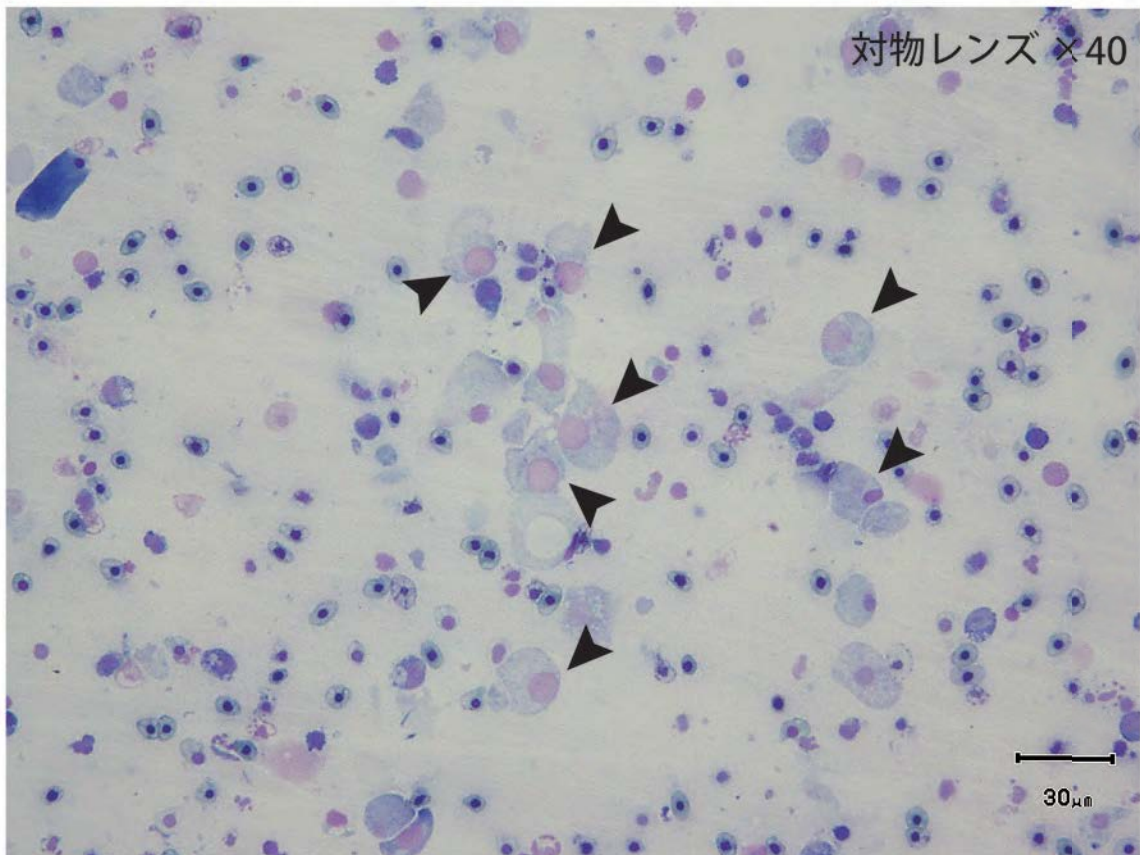
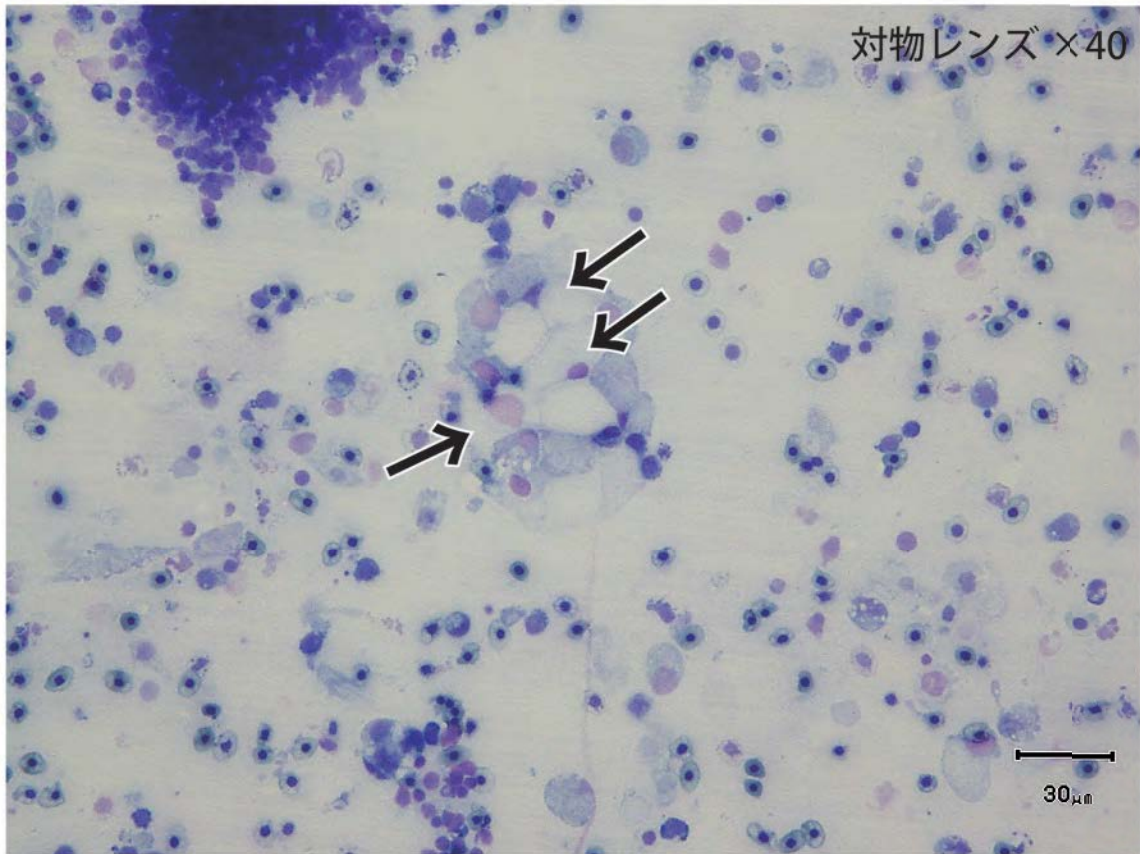


図 20 異型細胞と間違えやすい細胞。膨化した上皮（上）および変性したマクロファージ（下）。核はいずれも類円形であり、異型細胞のように大きくない。図 13~19 の異型細胞と比較。

### (3) PCR法・定量PCRによる PaPV の検出

〈魚病検査機関で実施〉

#### a) 核酸抽出

米粒大の鰓組織を採取し、市販の DNA 抽出キット等で DNA を抽出する。

#### b) PCR 法：

##### \* 古山ら(2020)の方法

##### ・ PCR 反応液組成の例

テンプレート DNA	2.0 $\mu$ L
10 x Taq buffer	2.0 $\mu$ L
2.5mM dNTPs Mixture	2.0 $\mu$ L
Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L
Takara Taq (5 unit / $\mu$ L)	0.1 $\mu$ L
滅菌 DW	13.1 $\mu$ L
合計	20.0 $\mu$ L

##### ・ プライマーセット

A16L-1 F : 5' - GCCATTATAACTGGAATACTGGGTA -3'

A16L-1 R : 5' - TAGCGTTAGTTCAGCTACTGGATTT -3'

##### ・ PCR 条件

プレヒーティング	95°C 2 分
熱変性	95°C 20 秒 <sup>1</sup>
アニーリング	57°C 30 秒 <sup>1</sup> - 35 サイクル
伸長	72°C 30 秒 <sup>1</sup>
最終サイクル	72°C 3 分
終了後は 4°C で保持	

##### ・ PCR 増幅産物の電気泳動

PCR 反応液 5  $\mu$ L を 2% アガロースゲルで電気泳動後、核酸染色剤 (Midori green など) で染色後、497bp の PCR 増幅産物のバンドを確認する。この方法の検出感度は、約 100 コピーである。病魚の検査では十分な感度であるが、モニタリング等でさらに高い検出感度を求めたいときには、後述の qPCR に用いるプライマーセットを用い、1/100 程度に希釈した増幅産物を鋳型として再度 PCR 反応を行う (semi-nested-PCR)。124bp の増幅産物を確認する。試料間のクロスコンタミネーションなどに十分注意する。



## \* 渡邊ら (2007) の方法

### ・ PCR 反応液組成の例

テンプレート DNA	1.0 $\mu$ L
10 x Taq buffer	1.0 $\mu$ L
2.5mM dNTPs Mixture	0.8 $\mu$ L
2.5 m M MgCl <sub>2</sub>	0.6 $\mu$ L
Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L
Takara Taq (5 unit / $\mu$ L)	0.05 $\mu$ L
滅菌 DW	5.55 $\mu$ L
合計	10.0 $\mu$ L

### ・ プライマーセット

BOKE30-F : 5' -CGA-TAT-CAT-ATC-TGT-GAT-CG-3'

BOKE30-R : 5' -AAT-GTT-GAT-GTG-TCC-AGG-AT-3'

### ・ PCR 条件

プレヒーティング	95°C 2 分熱
変性	95°C 15 秒 $\downarrow$
アニーリング	57°C 30 秒 $\uparrow$ 35 サイクル
伸長	72°C 30 秒 $\downarrow$
最終サイクル	72°C 3 分
終了後は 4°C で保持	

### ・ PCR 増幅産物の電気泳動

PCR 反応液 5  $\mu$  L を 1% アガロースゲルで電気泳動後、核酸染色剤 (Midori green など) で染色後、302bp の PCR 増幅産物のバンドを確認する。

※ PCR 用陽性対照が必要な場合は、(社) 日本水産資源保護協会に配布を依頼する。

## c) 定量 PCR 法 :

### \* 古山ら (2020) の方法

#### ・ qPCR 反応液組成の例

テンプレート DNA	2.0 $\mu$ L
THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix	10.0 $\mu$ L

Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ L
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ L
滅菌 DW	6.8 $\mu$ L
<hr/>	
合計	20.0 $\mu$ L

・プライマーセット

A16L-2F : 5' - TGTGGGAACTAATACACGGTTC -3'

A16L-1 R : 5' - TAGCGTTAGTTCAGCTACTGGATTT -3'

・qPCR 条件

プレヒーティング 95°C 30秒

熱変性 95°C 5秒  $\lrcorner$  35サイクル

伸長 60°C 60秒  $\lrcorner$

最終サイクル 50°C 30秒

\*増幅産物は124bp。この方法の定量限界は、約100コピーである。

## 5. 治療方法

### (1) 直ちに餌止めを行う

発症魚に対する給餌は被害を著しく増大させるため、ACGDが疑われる場合には、直ちに餌止めを行う。

#### 注意点①安易な自己判断はしない

現状では、生産現場においてACGDとBGDを判別することは非常に難しいことから、安易な自己判断は避ける。飼育魚の様子がおかしいと思ったら餌止めをして、直ちに水産試験場等の魚病検査機関へ診断を依頼し、治療に関する指導を受けることが望ましい。

#### 注意点②あせらずしっかり餌止め

不完全な餌止めで塩水浴を行う（例：当日の朝発見直後から開始するなど）とすぐに水質が悪化し、二次被害による死亡魚が増えるので、少なくとも24時間経過するまで餌止めを行う。

#### 注意点③過度な運動飼育を避ける

池の水流が強いと、魚が運動を強いられて酸素要求量が増加し、酸欠状態に陥りやすくなることから、できるだけ安静飼育になるよう、水車の向きを変えて、水流を壁に当て流速を弱くする（図21）。また、死亡魚を拾う作業を頻繁に行うと、魚を驚かせて運動負荷につながるため、まとめて行うようにする。

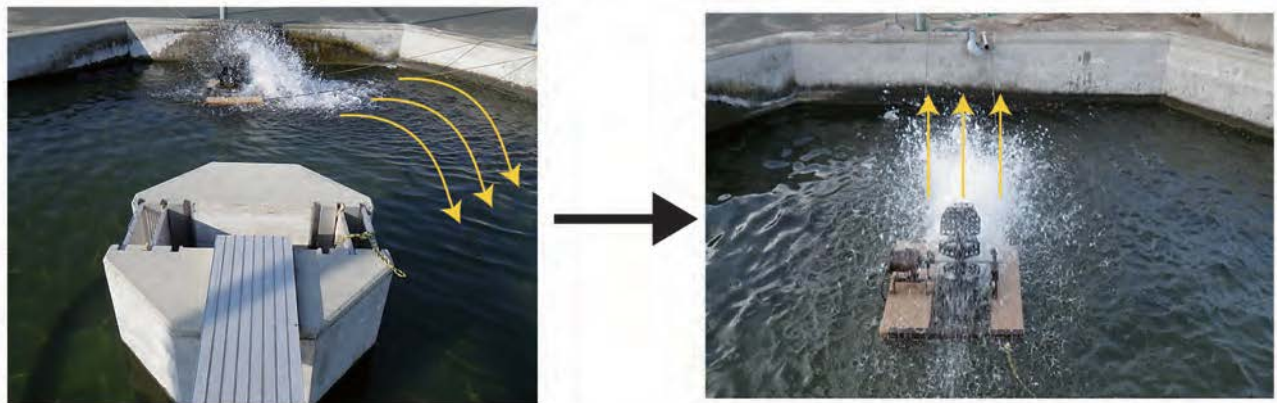


図 21 平常時の水車の方向（左）と治療時の水車の方向（右）

### (2) 塩水浴の実施

PaPVのPCR検査が陽性の場合には、塩を0.5～0.9%濃度となるように投入し、12時間程度の塩水浴を実施する。鰓の障害による酸欠が主因で死亡する疾病であるため、可能であれば酸素供給を行い、酸素の取り込みが容易な状態で治療することが望ましい。目安としては、治療中のDOが8mg/L以上で良好な効果、10mg/L以上で高い効果を得た事例が多い。

#### 注意点④塩分濃度は正確に

生産者は塩分濃度計を使用して塩分濃度を正確に測定し、適切な濃度で治療を行うべきである。目分量で実施すると、治療効果が得られなかったり、むしろ二次被害を引き起こしたりする恐れがある。

#### 注意点⑤水温の急上昇に注意

18~28℃の範囲内では、水温が高いほど被害量が小さくなりやすいことがわかっている。

しかし、水温の急上昇は魚に大きなダメージを与えるとともに、水中のアンモニアの毒性を高めてしまうため、水温をこまめに測定し、急激に上昇しないように注意する。

特に、気温が高く、塩水浴実施中に2~3℃の範囲を超えて水温上昇が見込まれる場合には、夜間に実施する。どうしても昼間に行う場合には0.9%濃度の塩水浴を2~4時間（魚が飛び跳ねなくなるまで）実施すると良い。

#### **注意点⑥大型魚の塩水浴実施時は水深を深めに**

ACGDにおける塩水浴は長時間に及ぶことが多い。そのため、水深が浅すぎると、腹部が池底に触れ、スレから内出血に至りやすい。著しく商品価値が低下してしまうため、出荷サイズに近いものに塩水浴を実施するときは、水深を深め（30~40cmくらい）にするとよい。

### **（3）治療終了の判断**

死亡状況や遊泳行動から本病の終息が推測されるようになったら、ごく少量の餌（魚体重の0.05%程度）を群全体にまんべんなく与える。死亡数の増加や異常遊泳が見られなければ、翌日は給餌量を2倍にして同様の観察を行い、1週間くらいかけて通常の給餌率にもどす。

#### **注意点⑦摂餌状況の改善＝治癒ではない**

治療中に魚群の動きが良くなり、摂餌活性が上がる（ノロハミする）ことがよくあるが、摂餌状況の改善は治癒のサインにはならない。また、給餌量を急激に増やすと大量死が発生することがある。あせらず、徐々に給餌量を増やしていくことが重要である。この間に、死亡数の増加や遊泳行動の異常が観察された場合には直ちに餌止めを行い、治療を再開する。

### **（4）その他**

PaPVは飼育水等を介して、周辺に伝染するので、周辺の池の飼育魚についても様子をこまめに確認すること。

## 6. 参考資料

### 報告書

- 平成19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  
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  
平成21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  
平成22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

### 書籍

- 「新魚病図鑑」(畑井喜司雄・小川和夫監修), (2006), 緑書房, 東京, 295.  
「新魚病図鑑 第3版」(小川和夫・佐野元彦・横山博・倉田修監修), (2022), 緑書房, 東京, 343.

### 学術論文

- Wada, S., O. Kurata, K. Hatai, H. Ishii, K. Kasuya and Y. Watanabe (2008). Proliferative branchitis associated with pathognomonic, atypical gill epithelial cells in cultured ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, 43, 89-91.
- Wada, S., H. Atami, O. Kurata, K. Hatai, K. Kasuya, Y. Watanabe and H. Fukuda (2011). Histopathology of gill lesions of ayu *Plecoglossus altivelis* clinically diagnosed with 'Boke' disease. *Fish Pathol.*, 46, 59-61.
- Nakayama, H., E. Uno, T. Ashizawa and S. Miwa (2016): PCR-detection of *Plecoglossus altivelis* poxvirus-like virus (PaPV) in wild ayu. *Fish Pathol.*, 51, 121-124.
- Koyama, T., D. Komatsu, T. Uchino, Y. Midorikawa, G. Kato, T. Ishikawa, T. Nishimura, K. Takeda, H. Fukuda, S. Wada and M. Sano (2020): Development of new PCR and quantitative PCR protocols for the detection of *Plecoglossus altivelis* poxvirus-like virus in atypical cellular gill disease of ayu. *Fish Pathol.*, 55, 84-87.
- Takanori Ishikawa, Daiki Komatsu, Shingo Nonaka, Tatsuya Mori, Korenori Takeda, Hitoshi Kubota, Shinpei Wada, Motohiko Sano (2022): Experimentally induced atypical cellular gill disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, 57, 69-75.

### その他

- 栃木県水産試験場, 日本獣医生命科学大学 (2009). 「養殖アユの「ボケ病」に特徴的な異型細胞鑑別のためのディフクイック染色とカラーアトラス」

【写真提供】 日本獣医生命科学大学 和田新平教授 (表紙 3~5, 図 1,2,11~20)  
栃木県水産試験場 (表紙 1,2, 図 4~10,21)

平成 23 年 3 月 初版

令和6年3月 第2版

公益社団法人 日本水産資源保護協会

〒104-0044 東京都中央区明石町 1-1

東和明石ビル 5F

TEL 03-6680-4277

FAX 03-6680-4128

<https://www.fish-jfrca.jp>