

東水試出版物通刊 No. 282
調査研究要報 No. 135

昭和52年度 指定調査研究総合助成事業

病 害 研 究 報 告 書

(温水性淡水魚の穴あき病)

昭 和 5 3 年 3 月

東 京 都 水 産 試 験 場

指定調査研究総合助成事業 病害研究

(温水性淡水魚の穴あき病)

目 次

A 昭和49～51年度の結果の概要

B 昭和52年度の研究

I	ウロコの挿入法による穴あき病の魚種間伝染性確認試験	2
II	人工感染魚病患部ウロコを用いた感染試験	12
III	ウロコ挿入法による人工感染魚の経時的病理組織像	15
IV	ウロコ挿入法による穴あき病の原因究明	19
V	要 約	27
VI	文 献	27

研究実施機関 : 東京都水産試験場 温水魚研究部

研究担当者 : 主任研究員 高橋耿之介(試験設定、取りまとめ)

主 事 森 真朗(試験、研究、取りまとめ)

研究助言者 : 東京大学 農学部 教授 江草 周三

A. 49～51年度の結果の概要

病魚の発生状況

キンギョは48・49年度は10～20％程度の発生であったが、50年度は発病率が高く、多い池では70％にも達した。51年度は若干下火となった。天然水域では48・49年度に多摩川について調べ、主としてフナ類に病魚（約2％）がみられた。50年度に皇居外濠の魚について調べ、ハクレン、ゲンゴロウブナ、ギンブナ、コイ、カムルチーに病魚がみられた。ハクレンとゲンゴロウブナは約 $\frac{2}{3}$ が病魚であった。

疾病の特徴

病患部の位置は体表ならどこにでもみられるが、体軀幹後方にやや多かった。患部の観察から症状を初期・中期・終期に区別した。治癒過程では一般に患部の後側から治癒が始まり、前側は治癒しにくいことがわかった（49年）。内臓は肉眼観察では異常は認められなかった。また組織像でも内臓に菌巢が形成されていることはなかった。内臓にはこまかい病変が沢山みられたが、それらは対照にも同じようにみられ、穴あき病の特徴と断定できるものはなかった。皮膚患部の組織像では皮膚構造が破壊されていない段階では菌巢はみいだせなかった。初期にすでに表皮の肥厚が特徴的にみられ、鱗の周囲に破骨細胞がみられた。血液性状ではヘマトクリット、赤血球数、ヘモグロビン量、Ca、Mg、アルカリホスホターゼについて調べたが病魚に特徴はみいだせなかった（50・51年）。水温別の感染実験では12.5～30.0℃の範囲の8段階の設定ではすべて発病した。温度によって症状の進行速度は異なり水温が高いほうが早かった（51年）。自然治癒は20～30℃の範囲の5段階の設定では22.5℃までは悪く、30℃ではよく治癒した。25～27.5℃では他の要因により左右された。12・1・2月に冬期の発病をチェックしたが自然発病はみられなかった（50年）。

原因の追求

健康魚と病魚と同居させたり、患部を接触させると感染が成立することがわかったが、発病率は不安定であった（49年）。患部の鱗を抜いて健康魚の鱗の下に挿入することによりほぼ確実に発病することがわかった（51年）。患部のホモゲナイズ液の接種でも発病するが死亡率が高かった（49・51年）。ホモゲナイズ液を0.45μのミリポアフィルターに通して接種すると発病はおきず（49年）、また、ウイルスチェックを東京大学に依頼したがウイルスは検出されず（51年）、ウイルス単独による疾病の可能性は否定された。患部からの細菌の分離と復元実験の結果、患部には多種類の有毒株がみいだされ、特に*Aeromonas hydrophila*は検出頻度が高かった。それらの菌の接種によって潰瘍が形成される場合もあったが、それらの患部は良性で、自然発病魚と症状が異なったため原因菌と断定するにはいたらなかった（50・51年）。

予防法の追求

ビタミンC、麟酸塩、 α -トコフェロールの投与による予防を試みたところ α -トコフェロールに若干効果がみられた(51年)。

治療法の追求

早期治療として自然感染または人工感染させた魚を薬浴させ、発病をおさえるかどうかニフルブラジン、ニフルスチレン酸ナトリウムを用いて調べ、共に効果がみられた(50・51年)。中期または終期症状に達した病魚の治療を薬浴、経口投与、塗付、注射により試みた。ニフルブラジン、アルキルベンジルアンモニウムクロライドの薬浴、クロラムフェニコール、オキシテトラサイクリン、オキソリン酸、ナリジクス酸、スルフィソゾール、ニフルブラジン、フラゾリドン、ニフルスチレン酸の経口投与、カナマイシン、オキシテトラサイクリン、クロラムフェニコールの注射で効果がみられた。しかしながらこれらの効果は水温約20℃以上の場合にしかみられず、低水温時の効果はわずかであった(49～51年)。

B. 昭和52年度の研究

I ウロコ挿入法による穴あき病の魚種間伝染性確認試験

昭和51年度に行なった穴あき病に関する研究で、ウロコ挿入法という手法により、穴あき病を病キンギョから健康なキンギョへ、ほぼ確実に感染させ得ることが判明した。そこで、このウロコ挿入法を用いて、本疾病の魚種間の伝染性を確認するため、穴あき症状を呈するコイ、フナから健康なキンギョへの感染試験を試みた。

〔材料および方法〕

感染源として用いたコイ、フナの病魚は、いずれも当水産試験場で育成中に発病したもので、飼育池から取り上げ後、実験に供するまで屋外の1トン・パンライト水槽で蓄養した。

感染させた健康なキンギョ(ワキン)は、当水産試験場で育成したもので、外観的に異常のないことを確かめた後、実験水槽で数日間予備飼育し実験に供した。

実験水槽として、底面汙過式ガラス水槽(90×40×37cm)を使用し、ヒーターで水温を20℃前後に調整した。飼育水は脱塩素水道水を用いた。

ウロコ挿入操作は前報¹⁾と同様に行なった。挿入時間は4～5時間とした。

対照として、病患部と反対側の外観上異常の認められない部分のウロコを同様の方法で挿入した。

挿入操作後、14日間にわたり挿入部の変化を肉眼的に観察した。実験終了後、10%ホルマリン水で各組織を固定し、病理組織学的検索に供した。

以上の方法で実験を3回行ない、実験1、実験2、実験3とした。それぞれの実験で感染源として

用いた病魚の外観所見を表1に、試験の設定方法を表2に示した。供試キンギョの平均体重は、実験1、23g、実験2、15g、実験3、10gであった。

表1 感染源として用いた病魚の外観所見

実験番号	魚種	体長(cm)	体重(g)	外 観 所 見
実験 1	フ ナ	10.4	49	右体側背鰭基部中央および後部に病患部。 (写真1、2)
	コ イ	10.3	43	左体側背鰭基部中央および尻鰭基部に病患部。 (写真3、4)
実験 2	フ ナ	8.0	20	左体側中央に筋肉の露呈した病患部。 (写真5、6)
	コ イ	10.8	40	右体側腹鰭上方に筋肉の露呈した病患部。 (写真7、8)
実験 3	フ ナ	12.0	56	右体側背鰭後方に病患部。 (写真9、10)
	キンギョ	6.6	15	左体側鰓蓋上と体中央部に病患部。 (写真11、12)

表2 感染試験の設定方法

実験番号	試験区分	供試尾数	方 法
実験 1	フナ試験区	5	フナの病患部のウロコを挿入。
	フナ対照区	5	フナの外観上異常の認められない部分のウロコを挿入。
	コイ試験区	5	コイの病患部のウロコを挿入。
	コイ対照区	5	コイの外観上異常の認められない部分のウロコを挿入。
実験 2	フナ試験区	5	フナの病患部のウロコを挿入。
	フナ対照区	5	フナの異常の認められない部分のウロコを挿入。
	コイ試験区	5	コイの病患部のウロコを挿入。
	コイ対照区	5	コイの異常の認められない部分のウロコを挿入。
実験 3	フナ試験区	5	フナの病患部のウロコを挿入。
	フナ対照区	5	フナの異常の認められない部分のウロコを挿入。
	キンギョ試験区	5	キンギョの病患部のウロコを挿入。
	キンギョ対照区	5	キンギョの異常の認められない部分のウロコを挿入。

[結果および考察]

実験1の観察結果を表3に示した。フナ試験区の5尾のキンギョのうち、4尾に穴あき症状が再現された(写真13、14)。コイ試験区では、5尾とも病患部の形成は認められなかった。

実験2の観察結果を表4に示した。実験1とは逆に、コイ試験区で5尾のキンギョのうち4尾に穴あき症状が再現された(写真15、16)。フナ試験区では、5尾とも病患部の形成は認められなかった。

実験3の観察結果を表5に示した。フナ試験区で5尾のうち2尾に、キンギョ試験区では5尾すべてに穴あき症状が再現された。

実験1から実験3を通じて、外観上異常の認められない部分のウロコを挿入した対照区では、いずれの供試魚においても挿入部に異常が認められることはなかった。

実験1、実験2、実験3の結果から、コイおよびフナの穴あき病患部には、健康なキンギョに穴あき症状を呈せしめるような病原体が存在することが明らかとなった。また、これまで何度か実施したキンギョからキンギョへの感染試験の場合と、今回実施したコイ、フナからキンギョへの感染試験の場合を比較すると、肉眼的に観察した限り、患部の進行の様子に異なる点は見出せなかった。したがって、コイ、フナ、キンギョに発生する穴あき病は、恐らく同じ病原体による同一の疾病と思われた。

表 3 実験 1 の 観 察 結 果

試験区分	魚体番号	経 過 日													数
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
フナ試験区	1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
フナ対照区	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
コイ試験区	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
コイ対照区	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

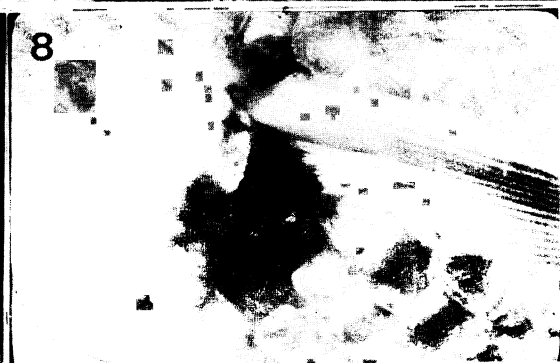
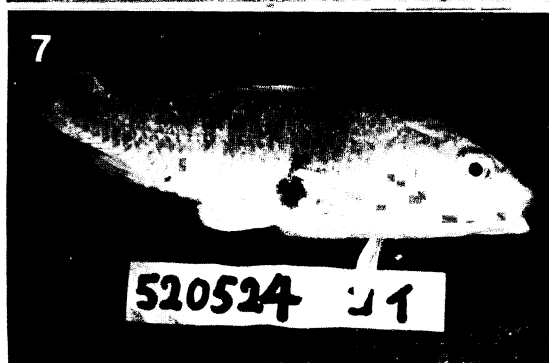
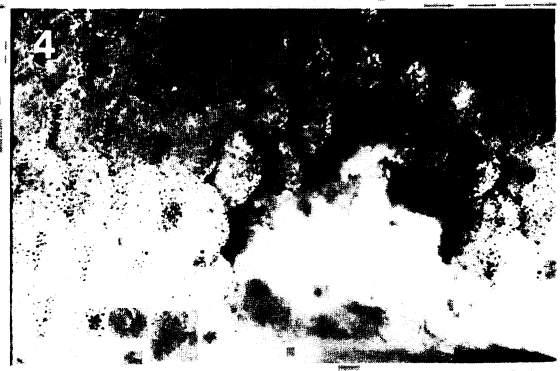
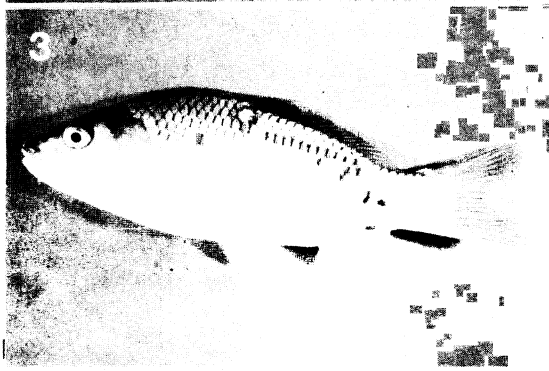
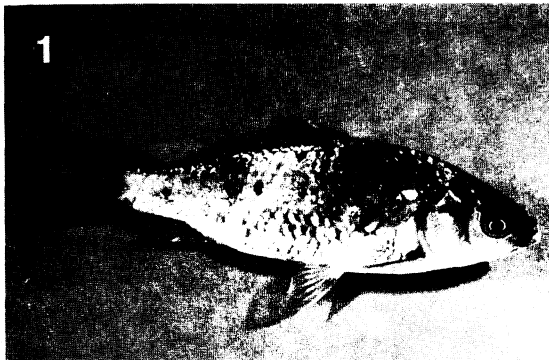
* (+) 挿入部を中心に発赤、腫脹。表皮と真皮の崩壊。
 (++) 表皮、真皮の崩壊・脱落。筋肉が一部露呈して見える。
 (以下、表 4、5、8 も同じ)

表 4 実 験 2 の 観 察 結 果

試 験 区 分	魚 体 番 号	経 過 日 数													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
フナ試験区	1	-			-		-		-		-		-		-
	2	-			-		-		-		-		-		-
	3	-			-		-		-		-		-		-
	4	-			-		-		-		-		-		-
	5	-			-		-		-		-		-		-
フナ対照区	1	-			-		-		-		-		-		-
	2	-			-		-		-		-		-		-
	3	-			-		-		-		-		-		-
	4	-			-		-		-		-		-		-
	5	-			-		-		-		-		-		-
コイ試験区	1	-			-		-	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-			-		+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	-			-		+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	-			-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-			-		+	+	+	+	+	+	+	+	+
コイ対照区	1	-			-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-			-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-			-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-			-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-			-		-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 5 実験 3 の 観 察 結 果

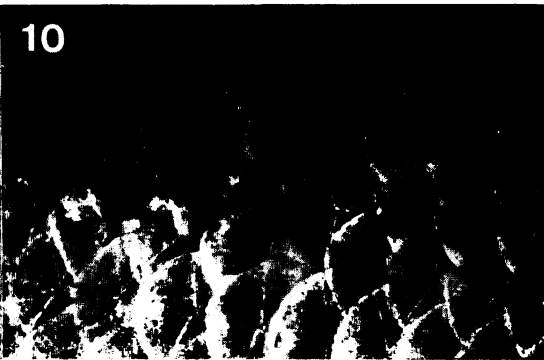
試 験 区 分	魚 体 番 号	経 過 日													数
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
フナ 対 照 区	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
フナ 対 照 区	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
キンギョ 試 験 区	1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
キンギョ 対 照 区	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



9



10



11



13



14



15



16



写 真 の 説 明

- 写真 1 実験 1 で感染源として用いたフナ病魚。
- 写真 2 同上、患部の拡大像。
- 写真 3 実験 1 で感染源として用いたコイ病魚。
- 写真 4 同上、患部の拡大像。
- 写真 5 実験 2 で感染源としたフナ病魚。
- 写真 6 同上、患部の拡大像。
- 写真 7 実験 2 で感染源としたコイ病魚。
- 写真 8 同上、患部の拡大像。
- 写真 9 実験 3 で感染源としたフナ病魚。
- 写真 10 同上、患部の拡大像。
- 写真 11 実験 3 で感染源としたキンギョ病魚。
- 写真 12 同上、患部の拡大像。
- 写真 13 実験 1、フナ試験区 № 5 の供試魚 感染操作 14 日後の症状 (＋)。
- 写真 14 同上、形成された患部の拡大像。
- 写真 15 実験 2、コイ試験区 № 1 の供試魚 感染操作 14 日後の症状 (＋)。
- 写真 16 同上、形成された患部の拡大像。

Ⅱ 人工感染魚病患部のウロコを用いた感染試験

前項の結果から、自然感染したコイ、フナ、キンギョの穴あき病患部には、健康なキンギョに穴あき病を呈せしめるような病原体が存在することが明らかになった。そこで、人工感染魚病患部のウロコを用いた場合の感染成立の有無および病患部の起病力の持続期間を明らかにするため、次のような感染実験を行なった。本実験を実験４とした。

〔材料および方法〕

試験水槽、試験水温、供試キンギョ、１区あたりの供試尾数、ウロコの挿入方法、観察期間等は、実験１～３と同様とした。

感染源として用いた人工感染魚の由来と外観症状を表６に、試験の設定方法を表７に示した。

表６ 感染源として用いた人工感染魚の由来と外観所見

魚体番号	体長(cm)	体重(g)	由来と外観所見
キンギョ 2W	6.7	12.0	ウロコ挿入操作１４日後の人工感染魚、病患部は発赤・腫脹が顕著で、筋肉が一部露呈して見えた。
キンギョ 4W	6.6	10.2	ウロコ挿入操作２８日後の人工感染魚、挿入部を中心に広い範囲で筋肉が露呈し、周辺部には発赤が認められた。

表７ 試験の設定方法

試験区分	供試魚数	操作方法
2W試験区	5	キンギョ 2Wの病患部周辺のウロコを挿入。
2W対照区	5	病患部と反対側の外観上異常の認められない部分のウロコを挿入。
4W試験区	5	キンギョ 4Wの病患部周辺のウロコを挿入。
4W対照区	5	病患部と反対側の外観上異常の認められない部分のウロコを挿入。

〔結果および考察〕

感染操作後、１４日間の観察結果を表８に示した。2W試験区では供試した５尾のうち３尾に穴あき症患部が形成され、１４日後には３尾とも筋肉の一部が露呈しているように見えた。4W試験区では、５尾すべてに病患部の形成が認められた。2W対照区、4W対照区では、挿入部に異常は認められなかった。

以上の結果から、ウロコ挿入法による人工感染魚の病患部を用いても感染が成立すること、病患部には感染操作後、少なくとも４週間起病力があることが明らかとなった。したがって、今後、ウロコ挿入法による人工感染試験を実施する場合、自然感染魚の病患部のみでなく、人工感染魚の病患

部も感染源として使用できると考えられた。

なお、4W試験区で、観察期間中、1尾の供試魚の体表にチヨウの寄生が認められた。穴あき病の発症要因として、外部大型寄生虫の関与が考えられているが、今回の観察では寄生部位に軽度の発赤と腫脹が認められたものの、そうした症状はチヨウが他の部位へ移動したあとでは、1～2日間で消退してしまい、穴あき症状へと進展することはなかった。

表 8 実験 4 の 観 察 結 果

試 験 区 分	魚体番号	経 過 日 数													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2 W 試験区	1	-				+	+	+	+		+	+	+		+
	2	-				-	-	-	-		-	-	-		-
	3	-				-	+	+	+		+	+	+		+
	4	-				-	-	-	-		-	-	-		-
	5	-				-	-	+	+		+	+	+		+
2 W 対照区	1	-				-	-	-	-		-	-	-		-
	2	-				-	-	-	-		-	-	-		-
	3	-				-	-	-	-		-	-	-		-
	4	-				-	-	-	-		-	-	-		-
	5	-				-	-	-	-		-	-	-		-
4 W 試験区	1	-				-	-	+	+		+	+	+		+
	2	-				-	+	+	+		+	+	+		+
	3	-				-	+	+	+		+	+	+		+
	4	-				-	-	-	-		-	-	-		-
	5	-				-	-	-	-		-	-	-		-
4 W 対照区	1	-				-	-	-	-		-	-	-		-
	2	-				-	-	-	-		-	-	-		-
	3	-				-	-	-	-		-	-	-		-
	4	-				-	-	-	-		-	-	-		-
	5	-				-	-	-	-		-	-	-		-

Ⅲ ウロコ挿入法による人工感染魚の経時的病理組織像

ウロコ挿入法により感染試験を行ない、人工感染魚を経時的に取り上げ、患部の進行・治癒の様子を調べ、穴あき病の原因について病理組織学的側面から検討を加えた。本実験を実験 5 とした。

〔材料および方法〕

感染源—実験 4 の結果から、人工感染魚の病患部のウロコを用いても自然感染魚と同様の症状が再現されることがわかったので、あらかじめウロコ挿入操作により感染発症させ、20℃前後の水温で約 1 カ月間飼育し、典型的な穴あき症状を呈する人工感染キンギョ 4 尾を感染源として用いた。これらキンギョの外観所見は、筋肉が広く露呈し、露呈部辺縁は発赤や軽い立鱗症状が認められた。

供試魚—外観上異常の認められない健康なキンギョ 40 尾を、ウロコ挿入操作に先立ち 4 日間予備飼育し実験に供した。供試魚の平均体重は 13g であった。

実験水槽—既述の底面濾過式ガラス水槽 4 基を使用し、1 基に 10 尾宛供試魚を収容した。実験期間中の水温は、19.6～21.5℃であった。

感染方法と取り上げ—ウロコ挿入法により感染操作を行ない、2・5・7・15・21・29・43 日後に 2 尾ずつ取り上げ、外観症状を肉眼的に観察したのち、固定した。

組織標本の作製—経時的に取り上げた人工感染魚は、挿入部の皮膚筋肉、鰓、肝臓、腎臓、脾臓、心臓の各組織を摘出し、10%中性ホルマリン水で固定した。皮膚筋肉は固定後ブランク・リクロー液で脱灰した。常法に従いパラフィン包埋し、厚さ 4～6μm のパラフィン切片を作製した。染色はヘマトキシリン・エオジン染色、ギムザ染色を施し検鏡した。

〔結 果〕

ウロコ挿入部皮膚筋肉の経時的な外観所見および病理組織学的所見は、次のようであった。

(2 日後)

外観所見

挿入部には、軽度の発赤と腫脹が認められた。健康部と比較するとウロコ 2～3 枚が光沢を失ない、にぶく濁って見えた。ウロコの後縁は半透明に白濁し、表皮が肥厚しているものと思われた(写真 17、18)。

組織所見

挿入部は表皮が部分的に崩壊・消失し、ウロコが直接体外へ露呈して脱落しやすい状態にあった。表皮は崩壊部に肥厚していた。真皮の疎結合組織も部分的に崩壊し、軽度の出血や炎症性円形細胞の浸潤が認められた。崩壊過程にある疎結合組織では、ウロコに沿うように長桿菌の密な繁殖が認められた。疎結合組織層の下に密結合組織層および体側筋組織には異常はほとんど認められなかった(写真 19、20)。

(5 日後)

外観所見

挿入部の発赤が顕著になり、ウロコ 1 ～ 2 枚が侵蝕されていた。侵蝕されたウロコの後縁は表皮の肥厚により半透明に白濁していた(写真 21、22)。

組織所見

表皮、ウロコは部分的に消失し、真皮の疎結合組織は壊死に陥り、一部は崩壊・消失していた。炎症性円形細胞の浸潤が疎結合組織に著明であった。肉眼的に認められたウロコ後縁の白濁は表皮の肥厚によるものと思われた。露呈したウロコの下方の疎結合組織に出血が認められた。真皮の密結合組織には大きな変化は見出せなかった。細胞浸潤が著明な疎結合組織に少量の短桿菌が認められた(写真 23、24)。

(7 日後)

外観所見

ウロコ 5 ～ 6 枚の範囲で顕著な発赤が認められた。ウロコの後縁は白濁し、侵蝕されていた。一部のウロコは透明化して見えた。ウロコが崩壊した部分では、小範囲ではあるが、真皮が露呈して見えた(写真 25、26)。

組織所見

表皮は肥厚し、一部は上皮細胞が萎縮し疎化していた。疎結合組織層には著しい出血と細胞浸潤が認められた。密結合組織も一部は壊死に陥り、崩壊していた。部分的に表皮、真皮の崩壊残渣が残存しており、そこには長桿菌の繁殖が認められた。侵蝕されたウロコ表面に破骨細胞と思われる多核巨細胞が認められる場合もあった(写真 27、28)。

(15 日後)

外観所見

患部は 7 日後より広がっていた。部分的に筋肉が露呈しているように見え、垂直方向へも進展していると思われた。ウロコ後縁の白濁、ウロコの侵蝕も認められた(写真 29、30)。

組織所見

表皮は著しく肥厚していた。真皮の疎結合組織は崩壊・消失し、密結合組織も壊死・崩壊が進行していた。疎結合組織から体側筋組織上部にかけて、出血と炎症性円形細胞の浸潤が著明であった。体側筋組織上部の筋線維は凝固壊死に陥っている場合もあった。真皮組織および体側筋組織上部に桿菌の旺盛な侵入・繁殖が認められた(写真 31、32)。

(21 日後)

外観所見

筋肉が広く露呈してみえた。露呈部周辺は発赤が顕著で、辺縁には軽度の立鱗症状が認められた（写真33、34）。

組織所見

患部中央は表皮、ウロコ、真皮が崩壊・消失し、体側筋組織が露呈していた。露呈部表面は線維素様の物質で覆われていた。比較的深部の筋線維も凝固壊死に陥っていた。壊死・崩壊した体側筋組織上部には、線維細胞の増殖、毛細血管の新生が認められた。筋肉露呈部の辺縁域では、壊死・崩壊過程にある疎結合織、密結合織に旺盛な長桿菌あるいは桿菌の繁殖が認められた。また、とり残されたような形で残存するウロコ表面付近に、長桿菌のおびただしい繁殖を伴う結合織の崩壊残渣が認められた。こうした辺縁域の所見から、患部はさらに拡大していくものと思われた（写真35、36）。

（29日後）

外観所見

体側筋組織が広い範囲で露呈していた。露呈部は淡桃色であった。辺縁域は21日後にくらべ、発赤・腫脹が軽度であった。辺縁域のウロコは表皮の肥厚により、半透明に白濁していた。表皮あるいは真皮の崩壊残渣が所々に残存していた（写真37、38）。

組織所見

表皮、ウロコ、真皮、皮下脂肪組織は崩壊・消失し、肋骨付近まで達する深い患部が形成されていた。露呈した体側筋組織の表層には線維素様の物質が析出し網状構造を示す部分も認められた。表層に近い部分の筋線維は凝固壊死に陥り、崩壊していた。筋線維の凝固壊死が比較的深部に及んでいる場合もあった。露呈部表層には細胞浸潤が著明で、出血も所々に認められた。細胞質が崩壊し、核だけとなった赤血球が数多く認められた。体側筋組織の間質にも激しい出血や、赤血球を満たし拡張した血管が所々に認められた。露呈部の辺縁域では、表皮が上皮細胞の萎縮により疎化し崩壊寸前であった。真皮の結合組織も壊死・崩壊し、皮下脂肪層には線維素様物質の析出が著明であった。種々の細菌がこうした患部に認められた。体側筋組織の露呈した部分では、表層の細胞浸潤や出血が著明な箇所および線維素様物質が析出している箇所に単桿菌、桿菌の繁殖が認められた。辺縁域では、壊死・崩壊過程にある真皮の結合織層や残存したウロコ片をとり囲むように存在する結合組織の崩壊残渣といった箇所に長桿菌の旺盛な繁殖が認められた。長桿菌は体側筋露呈部には比較的少なく、長桿菌とその他の菌が同一病巣内で住み分けているような所見が得られた（写真39、40）。

（43日後）

外観所見

患部は白～淡桃色を呈し、表皮の再生が進んでいるように見えた。

組織所見

患部は、ほとんど再生表皮によって覆われていた。再生表皮には棍棒状細胞は少なく、多面体上皮細胞により構成されていた。また粘液細胞の発達も悪く、少数のものが散在していた。真皮組織には、線維細胞の増殖と毛細血管の新生が認められ、肉芽組織の様相を呈していた（写真41、42）。

〔 考 察 〕

ウロコ挿入法による人工感染魚の経時的病理組織像の観察結果から、次のようなことが考えられた。ウロコ挿入操作2日後には挿入部の真皮疎結合組織に長桿菌が繁殖し、疎結合組織は崩壊する。7～15日経過すると真皮密結合組織も崩壊し、体側筋上部の筋線維も変性・壊死に陥る。この時点では、種類の細菌の侵入・繁殖が組織崩壊部に認められる。21～29日経過すると挿入部の表皮・真皮は崩壊・消失し、体側筋組織が露呈する。筋線維は比較的深部まで変性・壊死する。筋肉露呈部の辺縁域では、崩壊過程にある真皮の疎結合組織、密結合組織に長桿菌を主とした細菌の繁殖が観察される。変性・壊死に陥った体側筋組織には長桿菌の侵入・繁殖が認められることは稀で、主に短桿菌、桿菌が侵入している。43日程度経過すると挿入部は治癒が進み、再生表皮や肉芽組織が認められる。

こうした所見や自然感染魚患部の組織学的所見を合わせて考えると、ウロコ挿入法による穴あき病の感染成立に最も密接な関係をもつのは、挿入初期（2日後）の真皮疎結合組織で繁殖する長桿菌と考えられた。

宮崎ら（1973）²⁾は‘あなあき病’と称されるキンギョおよびニシキゴイについて病理組織学的に検討し、本質的にこの疾病の原因が*Chondrococcus columnaris* 感染病であることを明らかにした。さらに宮崎ら（1976）^{3), 4)}は、ニシキゴイに流行した‘あなあき病’の感染病巣を検討し、この疾病には*Flexibacter columnaris* よりは低温度域に成長適温をもつ未同定滑走細菌が最も密接に関与していることを明らかにした。本実験で得られた経時的病理組織像の観察結果は宮崎らの報告した滑走細菌性穴あき病の組織所見ときわめてよく似ていると思われた。病原性滑走細菌のもつ重要な属性として「膠原線維性結合組織に対する高度の侵襲性」を宮崎ら（1976）は指摘しているが、ウロコ挿入法という感染手法はこのような属性をもつ細菌にとって、格好の感染方法と思われた。

真皮や体側筋組織の崩壊部には短桿菌や桿菌も認められたが、こうした菌も病患部の拡大に働いていると思われた。予備的に行なったウロコ挿入法による感染試験で、12日後に斃死寸前に陥った人工感染魚を写真43、44に示した。表皮および真皮組織は崩壊・消失し、体側筋組織が露呈していた。筋肉組織の深部まで、筋線維の水腫様変性や凝固壊死が認められた（写真45、46）。筋肉

組織の間質部にはおびただしい数の桿菌の侵入・繁殖が認められた(写真47)。露呈部辺縁域の崩壊過程にある真皮結合組織には長桿菌の繁殖が観察された(写真48)。キンギョの穴あき病は死亡率の低い疾病と言われているが、このように二次的に患部に侵入したと思われる細菌が強い病原性を有する場合、恐らくは敗血病巣を形成し斃死することもあると思われた。病患部に二次的に侵入・繁殖する細菌の種類によって、穴あき病は少しずつ異なる様相を呈すると思われ、この点に体表に潰瘍性患部を形成する疾病の原因究明の困難さがあると考えられた。

Ⅳ ウロコ挿入法による穴あき病の原因究明

これまでに実施してきたウロコ挿入法による感染試験の結果から、穴あき病の原因は体表の病患部に繁殖し、なおかつ患部からウロコを抜き取った時、容易にそのウロコに付着して得られて来るような細菌と考えられた。経時的に作製した人工感染魚病患部の組織学的所見から、最も疑わしい細菌は真皮の結合組織に旺盛に繁殖する長桿菌と思われた。そこで、この点を確認するため、次のような方法で感染試験を実施した。本実験を実験6とした。

〔材料および方法〕

供試菌株—実験5のウロコ挿入5日後の人工感染魚病患部から Anaerobic and Rucker の *Cytophaga* 改変培地で分離された長桿菌を用いた。この菌は平板上で黄色、辺縁樹根状、扁平なコロニーを形成した。ブイヨン培養では液面に黄色の菌膜を形成した。グラム陰性の長桿菌で、長さ6~7 μ 、幅0.5~0.7 μ であった。ブイヨン培養菌は一端を地物に固定し、他端を旋回させる特有の運動を示した。生化学的性状検査を行っていないので断定はできないが、本菌は *Flexibacter columnaris* に近い菌と思われたので、F ℓ 菌と表示した。

感染方法—一次の手順によりウロコをF ℓ 菌懸濁液に浸漬し感染操作を行なった。

健康魚のウロコを抜き取る
|
70%アルコール液に浸漬
|
滅菌生理的食塩水で洗浄
|
ウロコを滅菌した改変 *Cytophaga* ブイヨンに投入
|
ブイヨンに平板より掻き取ったF ℓ 菌を微量接種
|
25℃で48時間培養、ウロコ辺縁にカラム状の菌集落形成を確認
|
ウロコ挿入法により健康魚のウロコ下へ挿入

実験水槽およびその他の条件は実験 1～5 と同様であった。

試験区の設定方法を表 9 に示した。

表 9 実験 6、試験区の設定方法

試験区分	供試魚数	操 作 方 法
試験区 1	5	F ₄₂ 菌懸濁液に浸漬したウロコを健康魚に挿入、経過を観察した。
試験区 2	10	適宜取り上げ、組織学的検索に供した。
対 照 区	5	滅菌生理的食塩水で洗浄後のウロコを挿入。

〔結果および考察〕

試験区 1 の肉眼的観察結果は次のようであった。3 日後、挿入部はウロコ 2～3 枚の範囲で発赤・腫脹が認められた。その部分のウロコ後縁は、わずかではあるが半透明に白濁していた(写真 49)。5 尾すべてにこうした症状が認められた。5 日後、表皮およびウロコが崩壊・消失し、真皮の密結合組織あるいは体側筋組織が露呈していた。露呈部辺縁は発赤が顕著であった(写真 52)。5 尾のうち 2 尾がこうした症状まで到達していた。病魚患部のウロコを直接挿入した場合(写真 33、34)と比較すると、外観上両者はよく似た症状を呈していると思われた。5 日以後、患部がさらに進行していくことはなかった。

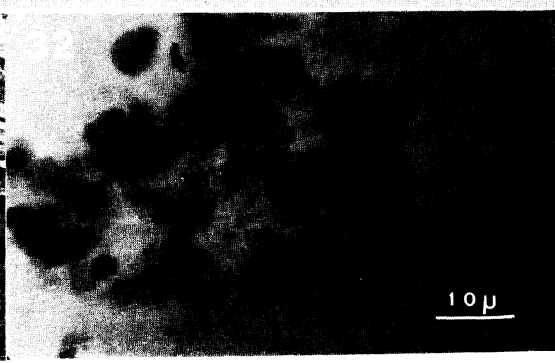
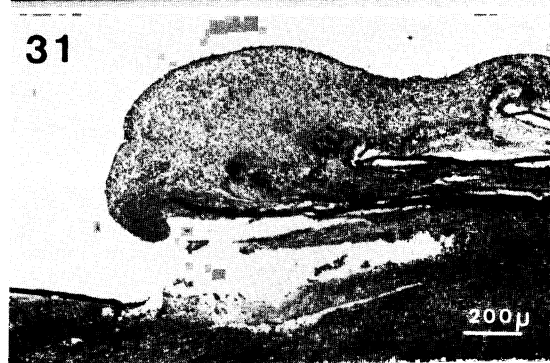
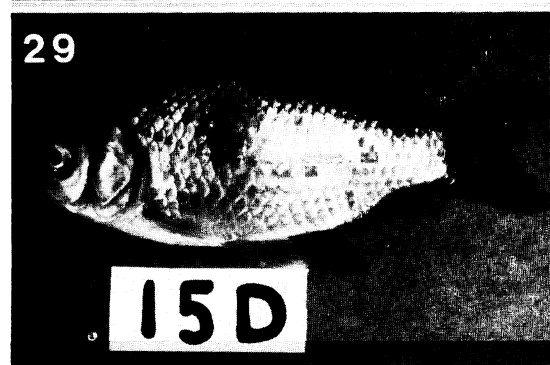
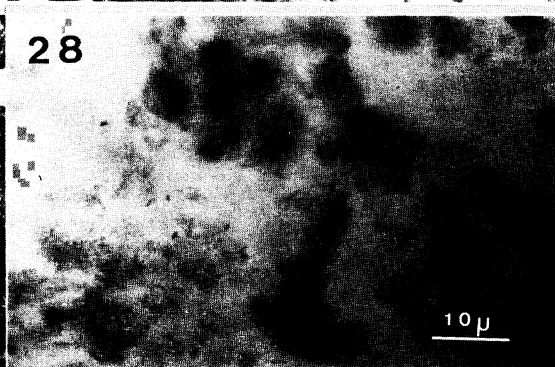
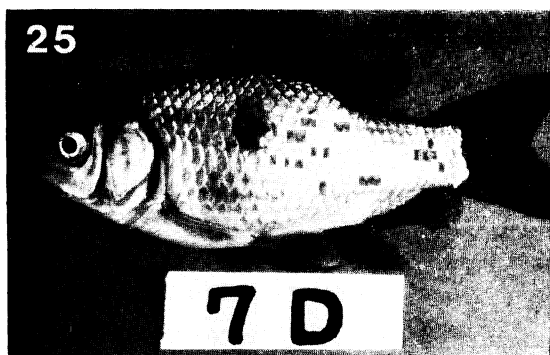
試験区 2 の発症魚の患部進行の様子も試験区 1 とほぼ同様であった。3 日後の組織学的検索結果は次のようであった。挿入部は表皮が消失し、ウロコが露呈していた。真皮疎結合組織には出血および細胞浸潤が認められ、一部は壊死・崩壊していた(写真 50)。崩壊過程にある疎結合組織には、長桿菌の密な繁殖が観察された(写真 51)。こうした所見も、病魚患部のウロコ挿入によって生じた病変(写真 19、20)と酷似するものと思われた。

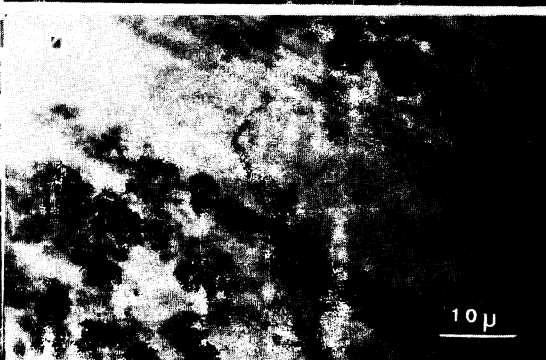
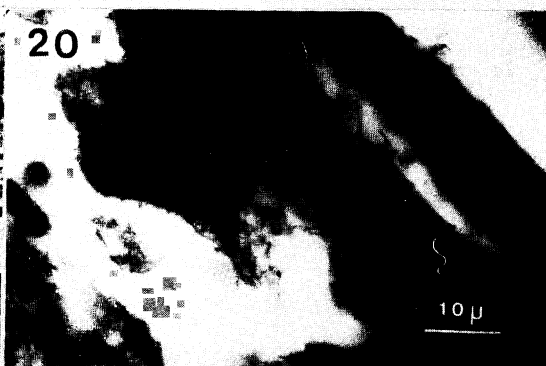
対照区は異常は認められなかった。

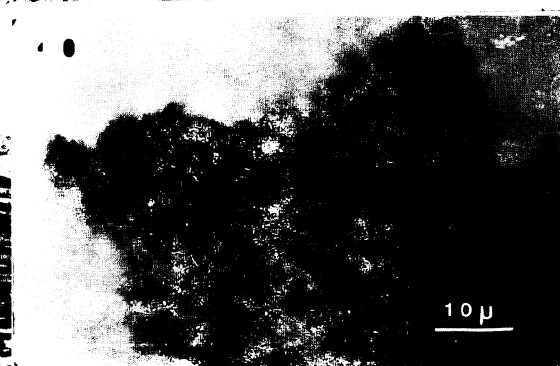
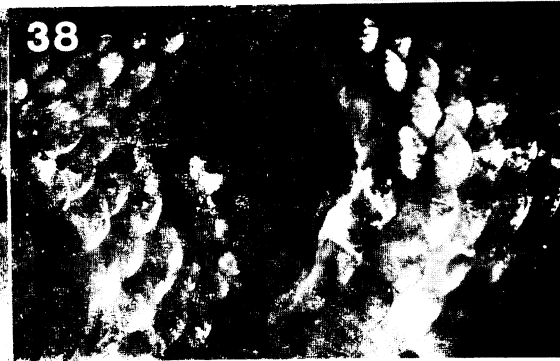
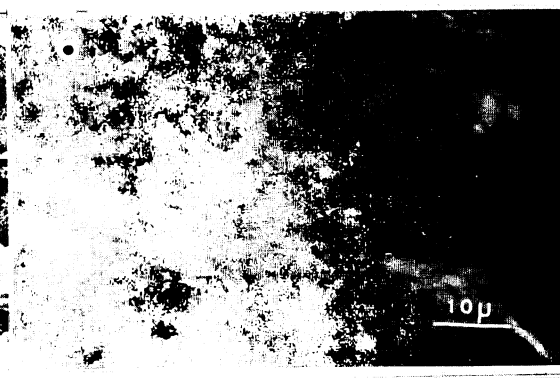
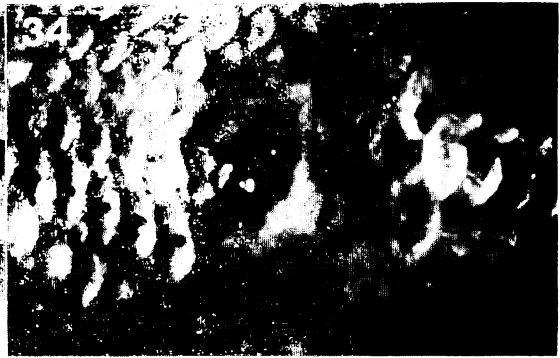
以上のように、*Flexibacter columnaris* に近いと思われる長桿菌を、ウロコ表面に純培養的に繁殖させ、それを健康魚のウロコ下に挿入すると、穴あき病病魚患部のウロコを直接健康魚に挿入した場合と似た症状が再現されることが判明した。

今後さらに菌量や菌株を変えて感染試験を行ない、病患部に認められる諸種の細菌の患部拡大に果たす役割りを明らかにしていく必要があると思われる。

ごく最近の情報として、アメリカの Elliott らがアメリカ、日本、ヨーロッパのキンギョを用いて、さらにオランダの Bootsma らがヨーロッパのコイを用いて、ともに潰瘍症状を呈する体表患部から、*Aeromonas salmonicida* に分類される菌を分離し、復元実験の結果よく似た潰瘍を形成させることに成功したということが伝えられており、この点についても今後慎重に検討していく必要があろうと思われる。







41



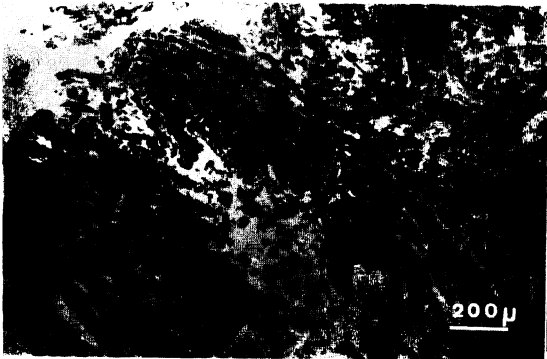
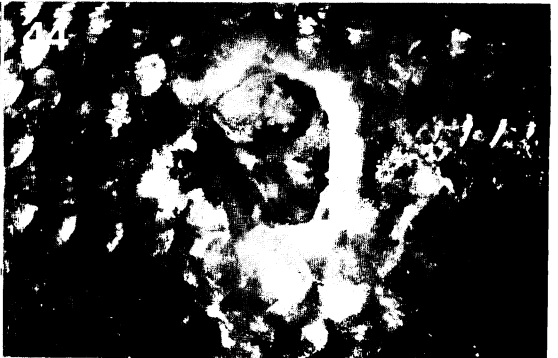
42



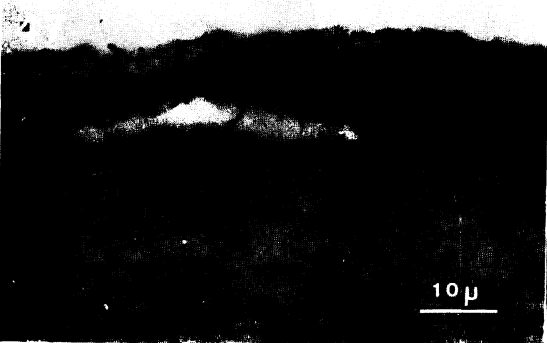
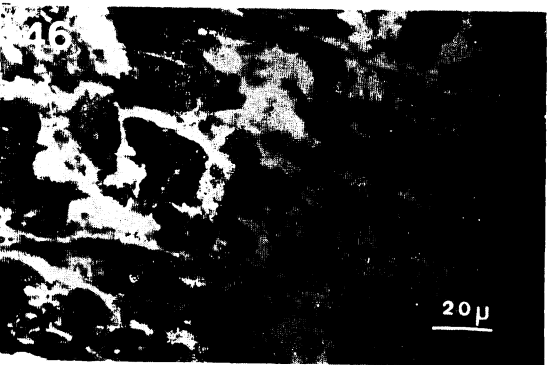
43



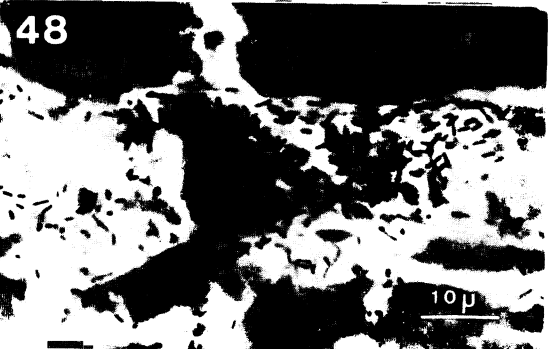
44

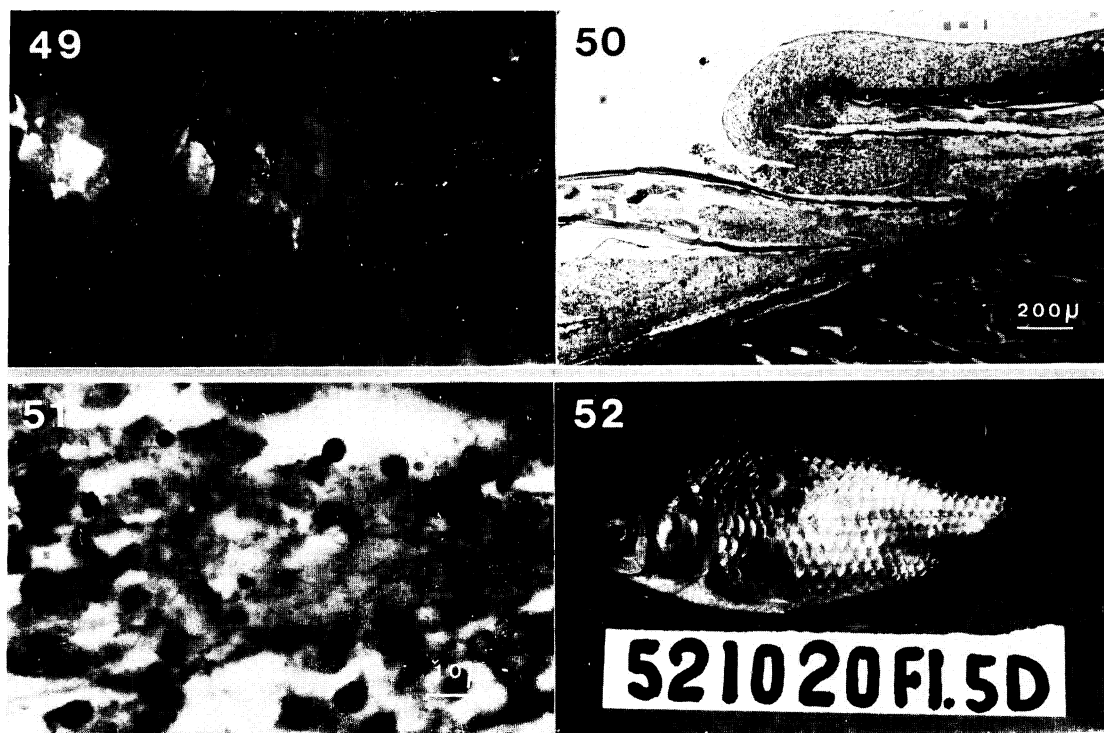


46



48





写真の説明

写真17 ウロコ挿入2日後の外観症状。

” 18 同上、挿入部の拡大。

” 19 ウロコ挿入2日後の挿入部組織像。H E 染色。

” 20 同上、崩壊した疎結合織に密に繁殖する長桿菌。ギムザ染色。

” 21 ウロコ挿入5日後の外観症状。

” 22 同上、ウロコの崩壊と後縁の半透明の白濁。

” 23 5日後の挿入部組織像。H E 染色。

” 24 同上、細胞浸潤と少量の単桿菌。ギムザ染色。

” 25 挿入7日後の外観症状。

” 26 同上、患部の拡大像。

” 27 7日後の挿入部組織像、真皮の出血と炎症性細胞浸潤。H E 染色。

” 28 同上、表皮あるいは真皮の崩壊残渣に繁殖する長桿菌を主とした細菌。ギムザ染色。

” 29 挿入15日後の外観症状。

” 30 同上、発赤・腫脹、ウロコの侵蝕。

” 31 15日後の挿入部組織像、表皮の肥厚と真皮および体側筋組織上層の壊死・崩壊。H E 染色。

” 32 同上、真皮組織に侵入・繁殖する桿菌。ギムザ染色。

写真 33 挿入 2 1 日後の外観症状。

〃 34 同上、体側筋組織の露呈。

〃 35 2 1 日後の挿入部組織像、真皮の崩壊、筋線維の凝固壊死、出血および炎症性細胞浸潤。H E 染色。

〃 36 同上、崩壊した真皮結合組織中で繁殖する長桿菌。ギムザ染色。

〃 37 挿入 2 9 日後の外観症状。

〃 38 同上、体側筋組織の広範な露呈。

〃 39 2 9 日後の挿入部組織像。表皮、真皮は崩壊・消失し、体側筋組織が露呈、筋線維は凝固壊死に陥り、
間質に出血が顕著。H E 染色。

〃 40 同上、真皮結合組織の崩壊残渣に認められた菌塊。ギムザ染色。

〃 41 挿入 4 3 日後の挿入部組織像、再生表皮と肉芽組織の形成。H E 染色。

〃 42 同上、H E 染色。

〃 43 ウロコ挿入操作 1 2 日後、斃死寸前に陥った人工感染魚。

〃 44 同上、ウロコ挿入部の拡大像。

〃 45 同上、挿入部の組織像。深部までおよぶ筋線維の水腫様変性および凝固壊死。H E 染色。

〃 46 同上、筋線維の水腫様変性と間質におびただしく繁殖する細菌。ギムザ染色。

〃 47 同上、崩壊過程にある真皮結合組織に繁殖する長桿菌。ギムザ染色。

〃 48 同上、深部体側筋組織に繁殖する桿菌。ギムザ染色。

〃 49 F ℓ 菌を純培養的に表面に繁殖させたウロコを挿入、3 日後の外観症状。

〃 50 同上、表皮崩壊によるウロコの露呈、真皮疎結合組織の壊死・崩壊。H E 染色。

〃 51 同上、疎結合組織の部分に繁殖する F ℓ 菌と思われる長桿菌、細胞質が崩壊し、核のみとなった円形細胞。
ギムザ染色。

〃 52 挿入 5 日後の外観症状、筋肉組織あるいは真皮密結合組織が一部露呈。

V 要 約

1. ウロコ挿入法による穴あき病の魚種間伝染性確認試験を行なった結果、コイ、フナ、キンギョに発生する穴あき病は同一の疾病と考えられた。
2. 人工感染魚の病患部を用いて感染試験を行なった結果、人工感染魚の病患部も感染源として使用できることが判明した。
3. ウロコ挿入法による人工感染魚を経時的に取り上げ、病理組織学的に観察した結果、本手法による感染成立に、真皮結合組織に好んで繁殖するある種長桿菌が密接に関与していると考えられた。
4. 人工感染魚の病患部より得られた *Flexibacter columnaris* に近いと思われる長桿菌を、純培養的にウロコに繁殖させ感染試験を行なった結果、穴あき病病魚患部のウロコを直接挿入した場合とほぼ同様の症状が再現された。

VI 文 献

- 1) 東京都水産試験場：病害研究報告書 調査研究要報 №129、(1977)。
- 2) 宮崎照雄・江草周三：キンギョおよびフナのいわゆる“穴あき病”と“エピスティリス着生ゴイ”について 魚病研究、7(2)、115—124 (1973)。
- 3) 宮崎照雄・窪田三朗・江草周三：ニシキゴイの滑走細菌性穴あき病の病理組織学的研究—I 感染病巣について 三重大水産研報、3、49—58 (1976)。
- 4) 宮崎照雄・窪田三朗・江草周三：ニシキゴイの滑走細菌性穴あき病の病理組織学的研究—II 治癒段階の潰瘍病巣 三重大水産研報、3、59—66 (1976)。

Publication of The Tokyo Metropolitan

Fisheries Experiment Station No.282

Memoir of The Tokyo Metropolitan

Fisheries Experiment Station No.135

昭和52年度
指定調査研究総合助成事業
病害研究報告書
(温水性淡水魚の穴あき病)

昭和53年3月1日 発行

編集・発行 東京都水産試験場 技術管理部

〒125 東京都葛飾区水元小合町3374番地

電話 03 (600) 2873

印刷 株式会社 東 邦

印刷物規格表第2類
印刷番号(52)1635
刊行物番号(K)76