

低水温期に養殖トラフグで発症した肝機能障害と血中 ALT 値の上昇

松倉一樹・杉原志貴・山田敏之

Liver failure and increased ALT levels in the blood plasma of cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes*
during periods of low water temperature

Kazuki MATSUKURA, Yukitaka SUGIHARA and Toshiyuki YAMADA

We investigated the relationship between the results of a blood plasma biochemical test and the gross pathology of the livers of the cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes*, with respect to mortality during periods of low water temperature.

Our investigation shows that, increased levels of ALT occurred in the blood plasma and the reddish markings - like symptoms on the liver surface were frequently observed. We suggest that the abnormal increase in the ALT levels and the appearance of reddish markings - like symptoms on the liver surface are correlated to the occurrence of liver failure in the cultured tiger puffer. Additionally, the occurrence of reddish makings - like symptoms on the liver surface were observed for over eight months after tiger puffer mortality ceased.

トラフグ *Takifugu rubripes* は、長崎県においてクロマグロ *Thunnus orientalis*, ブリ *Seriola quinqueradiata* とならんで重要な養殖対象種であり、その生産量は全国生産量の 5 割以上を占めて日本一を誇る。¹⁾しかし、トラフグ養殖ではヘテロボツリウム症や白点病等の寄生虫性疾患、滑走細菌症等の細菌性疾患による魚病被害の他、肝機能障害による活力低下の影響も示唆されており、²⁾安定生産を行う上での課題が残されている。肝機能障害については、血液検査による診断の可能性を川代らが検討した報告があり、²⁾血液中の ALT 値及び AST 値が 12 月～2 月にかけて高い傾向を示すこと、その原因として、10 月以降の給餌量増加が関連していること等を考察しているが、これらの値とトラフグの肝臓の所見との関連性については明確に示されておらず、また肝機能障害に対する有効な対策についての知見も無い。そこで本研究では、低水温期にトラフグの肝臓で外観上の異常が認められ、へい死が発生した事例について、血液生化学的検査及び剖検による肝臓の観察等を行い、ALT 値、AST 値等と肝臓の肉眼的所

見の関連性を調べた。

材料と方法

へい死事例 2011 年 12 月から県内の陸上養殖漁場でトラフグ当歳魚のへい死が発生し、12 月 15 日に総合水産試験場へ魚病診断依頼があった。へい死魚 5 尾に対する魚病検査の結果、少数のヘテロボツリウム *Heterobothrium okamotoi* の寄生は認められたが、その他の寄生虫は観察されず、腎臓及び脳から細菌は検出されなかった。さらに、検査魚 5 尾のいずれにも、入鰓動脈内の油球が認められ、肝臓の表面に広範囲の赤色を呈する星芒状または網目状の紋理様外観（以下、赤色紋理³⁾⁴⁾様外観、Fig.1-A）が共通して観察されたことから、肝機能障害によるへい死が疑われた。その後もへい死は継続し、2011 年 12 月 5 日～2012 年 2 月 28 日までの期間の累積死亡率は飼育魚 3,150 尾に対して 1.8%（58 尾）となった。この間におけるへい死の原

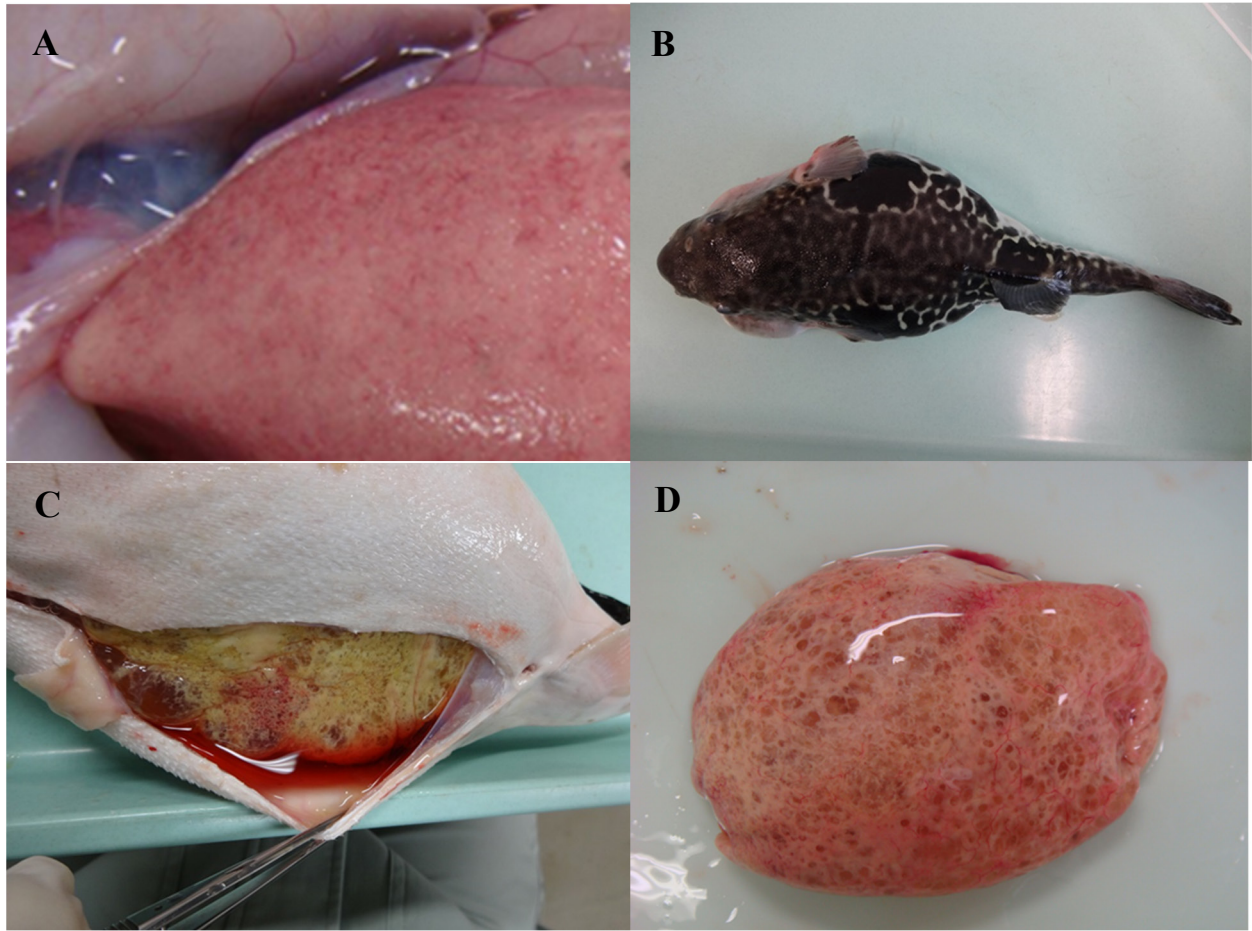


Fig. 1. Gross pathology of cultured tiger puffer.

A: Reddish markings - like symptoms on the liver surface of tiger puffer.

B: Tiger puffer with bloating.

C: Ascites storage and liver cysts - like symptoms of tiger puffer.

D: Liver cysts - like symptoms of tiger puffer.

因を明らかにすることを目的として、飼育水温、餌の種類、1週間あたりの給餌回数等の飼育条件等を養殖業者から聞き取るとともに、下記のとおりへい死が発生した群（以下、へい死群）の継続的なサンプリングを行い、剖検により肝臓等の観察を行うとともに、血液生化学的検査を行った。

供試魚 2011年12月～2012年11月にかけて、1～3ヶ月に1回の頻度で計8回、へい死群の水槽から1回あたり各5尾を取り上げ、剖検による肝臓等の観察および採血を行った。また、総合水産試験場の水槽で飼育中の疾病やへい死が確認されていなかったトラフグ当歳魚を対照群とし、へい死群と同時期に同様の頻度（期

間中7回）で1回あたり5～10尾から血液生化学的検査のための採血を行うとともに、2011年12月に15尾、2012年6月に6尾を取り上げ、剖検による肝臓等の観察を行った。対照群で採血した魚は、採血後水槽に戻し飼育を継続するとともに、以降の採血に使用した。なお、2011年12月は、両群の魚体情報を把握するために検体採取した魚以外についても魚体測定を行い、へい死群44尾、対照群37尾の体長及び体重を測定し、肥満度（体重（g）/体長（cm）³×10³）を求めた。

剖検による肝臓等の肉眼的所見の収集 採取した魚体は、直ちに氷蔵で保管し、当日中に体長、体重、肝臓重量の測定を行い、肥満度及び

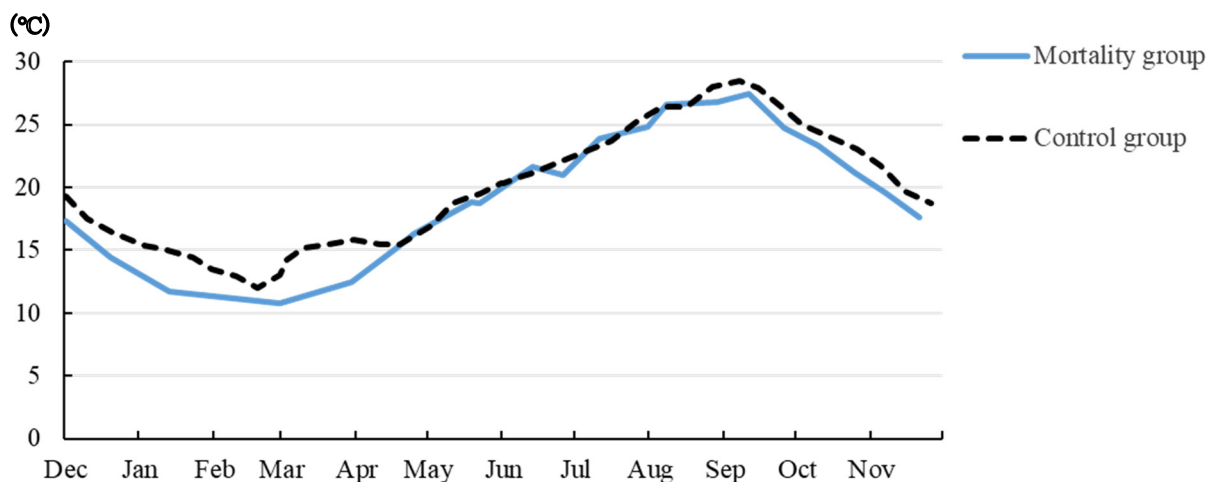


Fig. 2. Water temperature in each groups

比肝重値 (肝臓重量 (g) / 体重 (g) × 10²) を求めた。併せて、魚体を解剖後に肝臓の表面及び腹腔内を目視で観察し、肝臓における外観上の異常や腹水の有無を確認した。なお、対照群についても、取り上げた魚に対して、へい死群と同様の測定および剖検による観察を行った。

血液生化学的検査 へい死群については、剖検による肝臓の肉眼的所見の収集と同日に採血を行った。採血の際は、水槽からトラフグを1尾ずつタモ網で採取した後、直ちに両目及び尾部の周囲を濡れたタオルで覆って魚が暴れない状態として、尾部血管からへパリン処理済みの注射器 (容量 2.0 mL の注射筒及び 18G のシリンジ) を用いて採血を行った。採取した血液は直ちに冷蔵し、当日中に5分間の遠心分離により採取した血漿を試料として、自動生化学分析装置 (富士ドライケム 7000i, 富士フィルム) を用いて、説明書に従い ALT 値, AST 値, 総コレステロール (以下, TCHO) 値, 総タンパク (以下, TP) 値の4項目を分析した。なお、対照群から採取した血液サンプルについても、ALT 値, AST 値, TCHO 値, TP 値の分析を行った。

検定 両群の ALT 値, AST 値, TCHO 値, TP 値, 肥満度及び比肝重値は、統計処理ソフト Stat View 5.0 を用いて Mann-Whitney U 検定を行った。検定の際は、へい死が発生した12月を開始月として、3ヶ月毎に時期を分割し、それ

ぞれの時期について両群の比較を行った。

結果

飼育条件およびへい死状況 2011年12月～2012年11月における飼育水槽の水温は、へい死群が10.8°C～27.4°C, 対照群が12.0°C～28.5°Cで推移した (Fig.2)。

2011年11月～2012年4月における両群の給餌条件、12月の平均体長・体重・肥満度、及び累積死亡率は、Table 1 に示したとおりであり、両群とも市販のトラフグ用 EP 飼料 (粗タンパク 50%, 粗脂肪 9～10%) を毎回ほぼ飽食量給餌していた。へい死群の給餌回数は、11月上旬以降死亡が発生した12月上旬まで週5～6回 (1日1回) であったが、12月下旬に1週間の餌止めを行い、翌年1月上旬以降は週3～4回 (1日1回) に変更した。対照群の給餌回数は、11月上旬～12月下旬が週5回、翌年1月上旬以降は週4回であった。12月時点での平均体長・体重・肥満度は、へい死群が20.1 cm・264 g・31.7, 対照群が22.7 cm・405 g・33.8を示した。へい死群では、1日あたりの死亡数が12月上旬～12月下旬までは15～20尾認められていたが、12月下旬の給餌制限後に0～6尾へ減少し、2月下旬にはへい死が収束した。へい死が収束した後も

Table 1 Feeding frequency, average body length, average body weight, average condition factor and cumulative mortality rate of each group during November 2011 to April 2012

		Mortality group	Control group
Feeding frequency (times/week)	November - December 2011	5 or 6	5
	January - April 2012	3 or 4	4
Average body length (cm)	December 2011	20.1 ^{*1}	22.7 ^{*2}
Average body weight (g)		264 ^{*1}	405 ^{*2}
Average condition factor		31.7 ^{*1}	33.8 ^{*2}
Cumulative mortality rate (%)	December 2011 - April 2012	1.8	0.0

*1 *n* = 44

*2 *n* = 37

Table 2 Percentages of liver abnormalities or ascites in tiger puffer on visual examination

	Reddish markings - like symptoms on the liver surface		liver cysts - like symptoms		Ascites storage	
	Mortality group	Control group	Mortality group	Control group	Mortality group	Control group
December 2011 - February 2012	87% (<i>n</i> = 15)	0% (<i>n</i> = 15)	7% (<i>n</i> = 15)	0% (<i>n</i> = 15)	7% (<i>n</i> = 15)	0% (<i>n</i> = 15)
March - May 2012	20% (<i>n</i> = 5)	—	20% (<i>n</i> = 5)	—	20% (<i>n</i> = 5)	—
June - August 2012	30% (<i>n</i> = 10)	0% (<i>n</i> = 6)	0% (<i>n</i> = 10)	0% (<i>n</i> = 6)	0% (<i>n</i> = 10)	0% (<i>n</i> = 6)
September - November 2012	20% (<i>n</i> = 10)	—	0% (<i>n</i> = 10)	—	0% (<i>n</i> = 10)	—

4 月下旬までの間は群全体で摂餌活性の著しい減退、一部の魚が水槽の底面に横臥している状況が継続した。一方、対照群では、死魚及び水槽の底面に横臥している魚が終始観察されなかった。

剖検による肝臓等の肉眼的所見の収集 両群における肝臓等の肉眼的所見の収集結果 (Table 2) から、へい死が継続していた 2011 年 12 月～2012 年 2 月の間は、へい死群で肝臓における広範囲の赤色紋理様外観が 87%の割合で認められた。その後、赤色紋理様の外観の出現率は減少したが、調査を終了した 2012 年 9 月～11 月までは 20%～30%の魚で赤色紋理様の外観が認められた。また、赤色紋理様外観とは別に、2011 年 12 月～2012 年 5 月の間、腹部膨満及び腹水

貯留が認められ、肝臓が嚢胞様の外観を呈している魚が確認された (Fig.1-B～Fig.1-D)。肝臓における嚢胞様の外観及び腹水貯留の症状は、2011 年 12 月～2012 年 5 月の間に 7%～20%の割合で認められたが、2012 年 6 月～11 月の間は観察されなかった。両群における肥満度及び比肝重値の中央値及び四分位範囲を Fig.3, Fig.4 に示した。肥満度及び比肝重値は、両群の間で統計的な有意差が認められなかった (Fig.3, Fig.4)。

血液生化学的検査 両群における ALT 値, AST 値, TCHO 値及び TP 値の中央値及び四分位範囲を Fig.5～Fig.8 に示した。Fig.5 から、2011 年 12 月～2012 年 2 月及び 2012 年 9 月～11 月のへい死群における ALT 値の中央値は、対照群に比

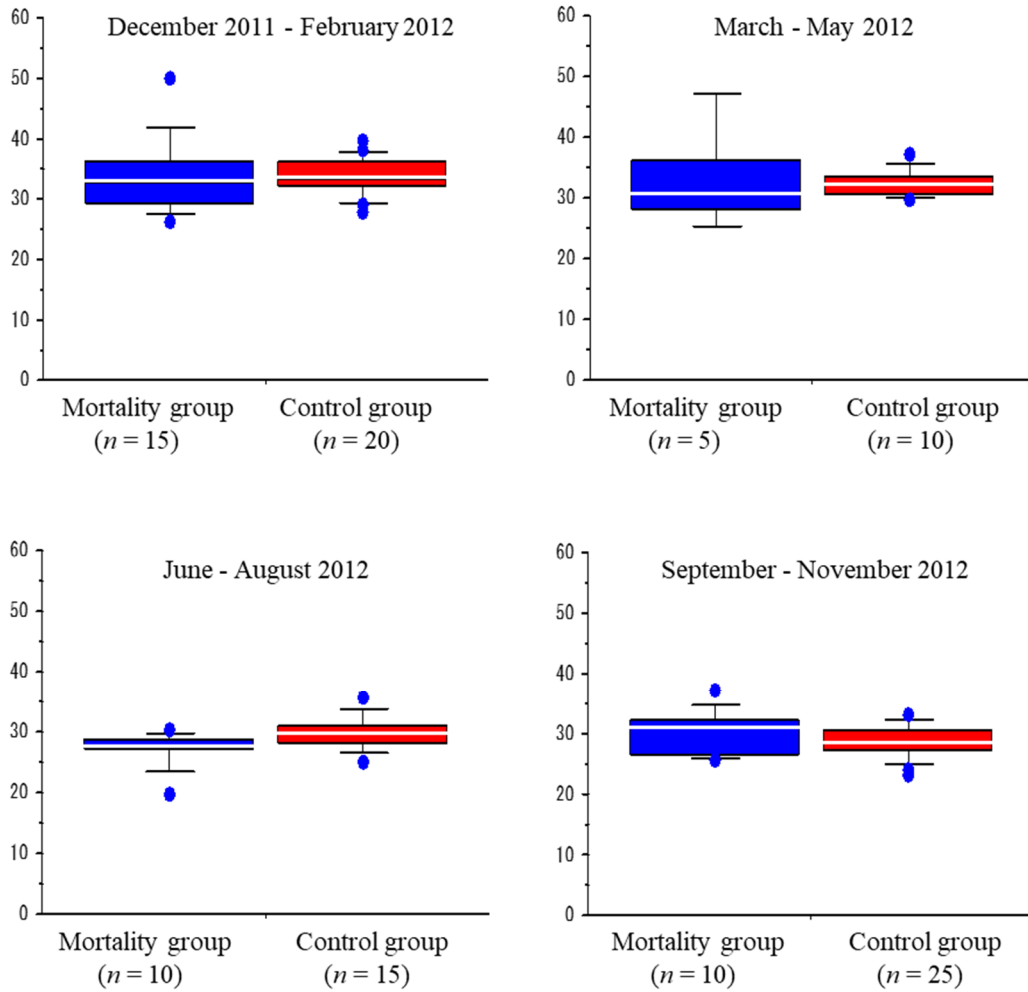


Fig. 3. Median and interquartile range of condition factor of tiger puffer in each group.

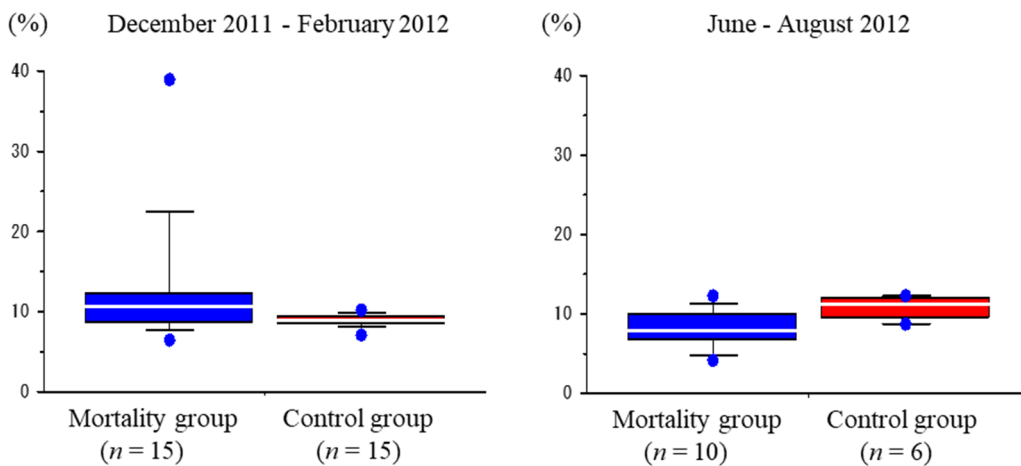


Fig. 4. Median and interquartile range of hepatosomatic index of tiger puffer in each group.

べて有意に高い値を示した。特に、2011年12月～2012年2月のへい死群におけるALT値は、

他の時期よりも高い傾向であった。AST値については、2011年12月～2012年2月のへい死群

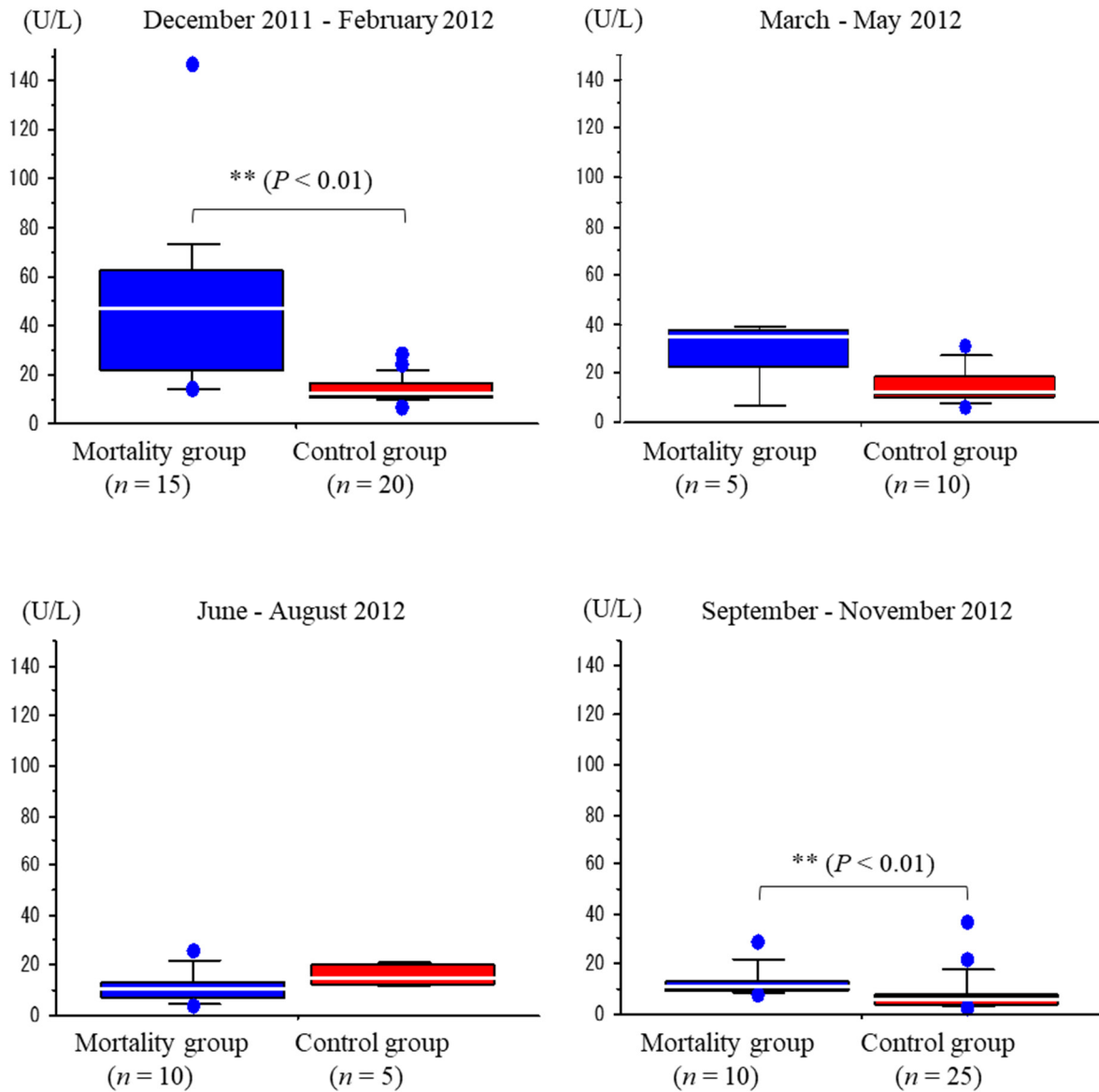


Fig. 5. Median and interquartile range of plasma ALT of tiger puffer in each group.

における中央値が対照群に比べて有意に高い値を示し、2012年3月以降は両群の間に差が認められなかった (Fig.6)。TCHO 値は、2011年12月～2012年8月の間は両群の中央値に差は認められなかったが、2012年9月～11月のへい死群の中央値が対照群に比べて有意に高い値を示した (Fig.7)。TP 値については、周年、両群の中央値に差が認められなかった (Fig.8)。

考察

死亡が継続していた2011年12月～2012年2月に採取した魚の肝臓は、へい死群で赤色紋理様の外観が87%の割合で認められたが、対照群では全く認められなかった。また、同時期のALT値は、へい死群が対照群に比べて高い値を示し、その中央値 (47 U/L) は、中内ら (1995)⁵⁾ が提唱した「当歳・12月」の参考値 (2～13

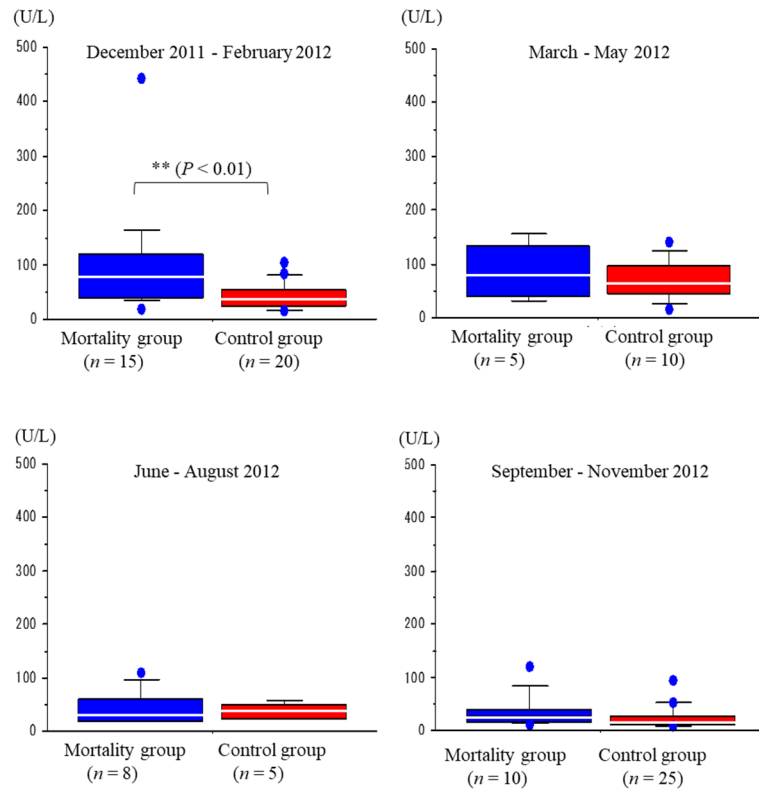


Fig. 6. Median and interquartile range of plasma AST of tiger puffer in each group.

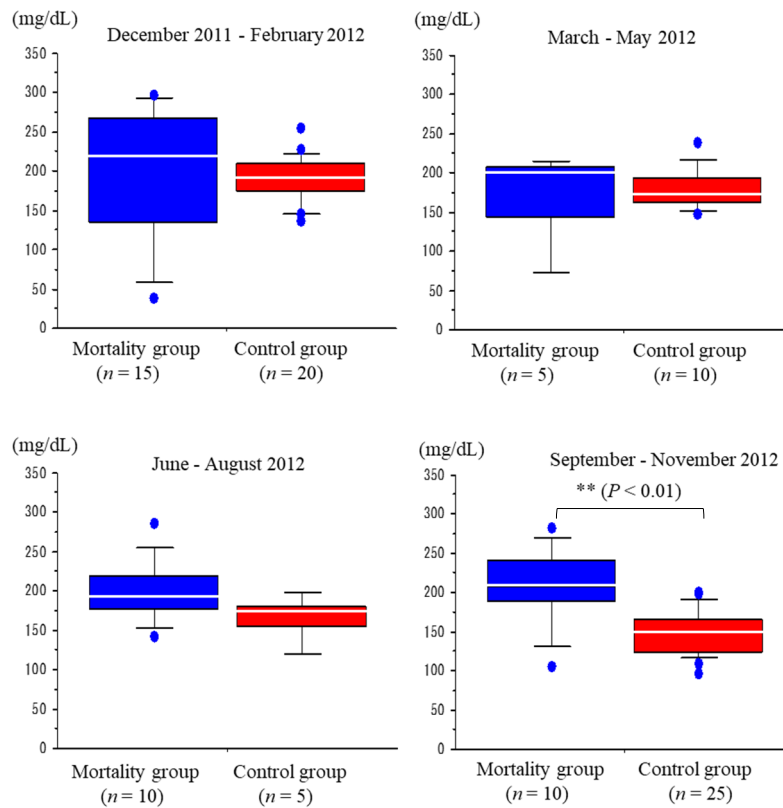


Fig. 7. Median and interquartile range of plasma TCHO of tiger puffer in each group.

U/L) の範囲を明らかに超えていた。一連のへい死が収束した 2012 年 3 月以降, 肝臓に赤色紋

理様の外観が認められた割合はへい死群で 30%以下に減少し, 対照群では全く認められな

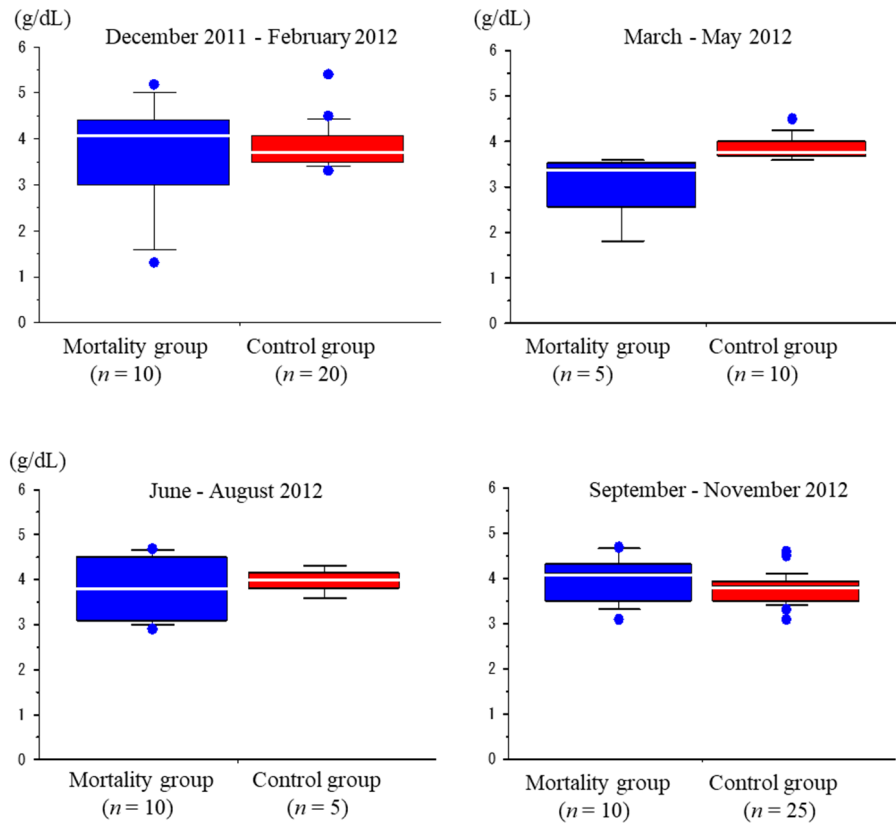


Fig. 8. Median and interquartile range of plasma TP of tiger puffer in each group.

かった。また、へい死群における ALT 値は、2012 年 3 月～8 月の間、対照群と同等の値に低下した。ALT はアミノ基転移酵素の一つであり、魚類においても肝臓に多く含まれるため、肝機能障害を反映して上昇することが知られている。⁶⁾ 以上のことから、へい死群では、2011 年 12 月～2012 年 2 月に何らかの原因で肝機能障害の状態となり、一部重篤化した魚が衰弱・死亡した可能性が強く示唆された。ヒトの肝臓で認められる赤色紋理は、慢性活動性肝炎の初期期ではなく、肝炎の持続により肝被膜直下肝実質に脱落・壊死を来した後に出現したこと、慢性肝疾患から肝硬変への移行期に出現したことが報告されている。⁷⁾ 今のところ、へい死群の肝臓で認められた赤色紋理様の外観については、形成される機序等が不明であるため、今後、トラフグの肝機能障害の際に現れる症状の一つとして着目し、さらなる検討が必要であると考えられた。

一方、AST 値については、ALT 値同様、2011

年 12 月～1 月にへい死群が対照群に比べて高い値を示したが、その中央値は 77 U/L であり、「当歳・12 月」の参考値 (4～78 U/L)⁵⁾ の範囲内であった。へい死が収束した 2012 年 3 月以降は、ALT 値と同様、へい死群の値が対照群と同等の値に低下した。このように、AST 値と ALT 値の推移は類似していたが、へい死が継続していた 2011 年 12 月～2012 年 2 月における中央値の上昇の程度は異なり、死亡数や肝臓における赤色紋理様の外観症状の出現率をより鋭敏に反映していたのは ALT 値の方であったと考えられた。魚類においても、AST は ALT と同様、肝臓に多く含まれるアミノ基転移酵素の一つであるが、肝臓以外の臓器、筋肉、血球中にも多量に含まれ、肝臓以外の組織が損傷した際にも上昇することがある。²⁾⁶⁾ したがって、トラフグで肝機能障害の有無を血液生化学的検査から推測する際は、ALT 値が指標として適している可能性が示唆された。

TCHO 値は、2011 年 12 月～2012 年 2 月に両

群の間で差は認められなかったが、2012年9月～11月にへい死群が対照群に比べて有意に高い値を示した。一方、TP値は周年、へい死群と対照群の間で有意差は認められなかった。血漿中におけるTCHO及びTPの濃度は、体外からの摂取量と体内での合成量等の和から、腸への排泄と組織での消費を差し引いたものであり、通常は肝臓を含む複数の臓器を循環する中で一定の範囲内に維持されている。⁶⁾2012年9月～11月にへい死群のTCHO値が対照群に比べて高い傾向を示した原因の一つとして、給餌量の違いによる影響も考えられるが、今回の結果からは不明である。少なくとも、へい死群の2011年12月～2012年2月におけるTCHO値は、対照群との間で差が認められなかったことから、血漿中のTCHO値及びTP値が肝機能障害の有無を鋭敏に反映していたとは考えにくい。

腹水が貯留していた個体および嚢胞様の外観症状が肝臓に認められた個体は、2011年12月～2012年5月のへい死群に限り7%～20%の割合で出現し、死亡が収束した2012年3月以降は、両群とも認められない状況が継続した。このことから、腹水貯留や肝臓における嚢胞様の外観は、へい死群で認められた肝機能障害の症状の一つとして現れたことが推察されるが、現段階ではその形成要因やトラフグに及ぼす影響も不明であるため、今後は組織学的な検討も含めて更なる検討が必要である。

両群において、2011年11月～12月の給餌回数、餌の種類、肥満度及び比肝重には明確な差が認められなかったことから、へい死群が対照群に比べて多量の餌を給餌していた可能性や、不適切な餌を選択していた可能性は考え難い。したがって、本研究で認められたトラフグの肝機能障害が起こった要因については、不明である。

ただし、へい死群で肝機能障害による死亡が発生して以降1週間の餌止めを行い、給餌回数を週5～6回から週3～4回に減少させた後、へ

い死が収束に至ったことについては、今後のトラフグの肝機能障害の対策に向けて、その原因等を更に検討する必要がある。

難波ら(1988)は、7月下旬から9月下旬の60日間、イカナゴやマダイ用配合飼料等複数の餌を連続給餌した結果、イカナゴ連続給餌区では肝細胞に脂肪が多く蓄積し、肥満度及び比肝重等が最大となったが、死亡率は0%であったことを報告している。⁸⁾このことから、単純にトラフグで給餌量を多くすることが原因で肝機能障害及びそれによるへい死が引き起こされるとは考えにくい。トラフグを含む魚類は変温動物であり、その脂質代謝は水温等に影響され、ブリでは、低水温期に肝臓の糖代謝酵素の活性化及び肝脂肪の増大も認められている。⁹⁾また、厚田ら(1988)は、養殖ギンザケの肝臓で認められた類脂肪変性症について、その発症要因は低水温期における過酸化物の多い餌料の過給餌等を考察している。¹⁰⁾このように、魚類の肝臓における脂質代謝及び肝機能障害の発症には、給餌量以外にも水温の低下等の要因が関連している可能性が推察される。また、ヒトでは、非アルコール性脂肪肝炎の予後について、5年後に10%～25%程度が肝硬変へ移行することが報告されており、肝機能障害の影響は長期にわたる要因の蓄積により発現する可能性も考えられる。¹¹⁾

以上のことから、本研究で認められた低水温期のトラフグにおける肝機能障害については、水温が低下する前から水温低下後にかけて、肝臓の所見及びALT値等の指標を長期間調査し、肝臓の組織学的な観察を併せて行うことにより、発症要因の究明及びその対策を更に検討する必要があると考えられた。

謝辞

本研究を行うにあたり、検体の採取時にご協力と助言をいただいた養殖業者の皆様と宮原治郎氏に厚くお礼申し上げます。

文献

- 1) 平成 30 年漁業・養殖業生産統計.農林水産省.2018.
- 2) 川代雅和, 渡智美. 血液性状から見たトラフグの診断手法の可能性について. 福井水試報告, 平成 22 年第 1 号 2011; 138-141.
- 3) 島田宜浩, 糸島達也, 太田亘, 福原純一, 井上武紀, 窪田政寛, 小林敏成. 腹腔鏡による肝表面像の新しい分類. 日本消化器内視鏡学会雑誌 1971; 13 (1): 68-76.
- 4) 西内明子. 肝表面像と組織所見 1 赤色紋理. 日本消化器内視鏡学会雑誌 1992; 34 (11): 2736-2737.
- 5) 中内良介, 松浦光信, 窪田三朗. 養殖トラフグの血液生化学標準値に関する研究 -3- 年齢および季節別血液生化学標準値を基にした病魚の診断. 獣医畜産新報 1995; 48: 361-366.
- 6) 池田彌生, 尾崎久雄, 瀬崎啓次郎. 血液性状による診断法. 魚類血液図鑑, 緑書房, 東京. 1986; 285-326.
- 7) 柴山隆男, 大竹寛雄, 比島恒和. 肝表面赤色紋理の形成と臨床的意義-慢性肝疾患の活動性との関係. 日本消化器内視鏡学会雑誌 2004; 46 (6): 1208-1216.
- 8) 難波憲二, 中川平介, 岡部正也, 角田出, 熊井英水, 中村元二, 笠原正五郎. トラフグの餌料に関する研究-II 餌料に起因する養殖トラフグの組織変化. 水産増殖 1988; 36 (1): 53-64.
- 9) 示野貞夫, 四方崇文, 細川秀毅. ハマチ肝臓の糖代謝酵素活性および脂質含量の季節変化. 水産増殖 1992; 40 (2): 201-206.
- 10) 厚田静男, 小林一裕, 酒井正博, 小林正典. 養殖ギンザケにおける肝臓の類脂肪変性について. 魚病研究 1988; 23 (3): 205-206.
- 11) 橋本悦子. NASH (非アルコール性脂肪肝炎) の最前線. 日本内科学会雑誌 2012;101 (8): 2316-2321.