

マス類のウィルス病に関する研究—Ⅶ

ニジマスにおけるIHN不活化ウィルス接種による経卵移行免疫

荒井 真・田代文男

Studies on the Viral Disease of Salmonoid Fishes—Ⅶ

Immunization by Egg Transmission with Inactivated IHN Virus
in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*)

MAKOTO ARAI・FUMIO TASHIRO

We examined a possibility of egg-transmission immunization. Inactivated IHN (Infectious Hematopoietic Necrosis) virus were injected 3 times into body cavities of mature female rainbow trouts. Afterward, we checked their neutralization antibody titer in their serum when their egg have taken.

Eggs from each ovulated female were hatched separately, and fryes were used to challenge test with a dip method.

Mortalities of each group were not concerned with their mother's neutralization antibody titer. It seems that their resistivities for IHN would be concerned with hereditary factor.

現在、ウィルスに起因する疾病に対する確実で、安全な制禦方法は、不活化ウィルス、あるいは弱毒化ウィルスの接種による免疫学的方法であることは例をあげるまでもない。魚類において、不活化抗原を接種して、免疫を賦与しようとする試みは、我国においては、在来マス類のせつそう病¹⁾・アユのピブリオ病²⁾などの細菌

性疾病に対して、試みられており、特に、アユのピブリオ病については、かなり有望な結果が得られている。しかし、魚類のウィルス性疾病に対しては、我国では、まだ研究の緒についたばかりで、目立った報告がないのが現状である。

母体が保有している抗体が、胎盤を通して、新生子に移行する現象は、イヌ・マウス・ラッ

ト・モルモット・ウサギ・ニワトリ・ヒトなどで知られている。魚類と同じ卵生であるニワトリでは、抗体は卵黄によって移行し、孵卵の後期から、孵化短時日のうちに卵黄中の抗体が、雛の血中に移行する。中でも鶏脳脊髄炎の移行抗体は、約8週間持続するので、産卵前に母鶏に生ウィルスを与えて、感染免疫を施し、移行抗体によって若令雛の鶏脳脊髄炎を防いでいる。³⁾

そこで著者らは、IHN (Infectious Hematopoietic Necrosis ; 伝染性造血器壊死症) について、ホルマリンで不活化したIHNウィルスを親魚に接種することによって、親魚の血清中和抗体価を上昇させ、それが、卵に移行し、その孵化仔魚が、IHNに対する抵抗性を獲得しているかどうかを、ニジマス (*Salmo gairdneri*) について検討した。

本試験は、昭和52年度、53年度水産庁総合助成事業指定研究「病害研究」として、実施された。

材料及び方法

各年度における、供試魚、不活化ウィルス、接種方法、飼育条件、効果の判定方法等について、第1表に示した。

親魚の血清中和抗体価の測定は、マイクロプレートを用い、次の手順により行った。

- 1) 試験実施の20～24時間前に RTG - 2 細胞を $2 \sim 3 \times 10^5$ 個/ml宛、マイクロプレートに植え込む。

- 2) 中和反応は、4～128倍に2段階希釈した血清0.5mlに、 $10^{3.5}$ TCID₅₀/mlのウィルス液0.5mlを加え、60分間20℃以下の室温で反応させた。反応中、数回振とうさせた。
- 3) 血清とウィルスの反応液0.05mlを、マイクロプレートに接種し、15℃で5日間培養し、観察した。

結 果

昭和52年度における、供試親魚の血清中和抗体価及び仔魚の攻撃結果を第2表に、昭和53年度のそれらを第3表に示した。

昭和52年度の餌付時の攻撃結果の中で一部の群で、攻撃ウィルス量が増えたのに斃死率が逆に下るという現象がみられた。

考 察

親魚の血清中和抗体価は、昭和52年度、53年度とも、IPN (Infectious Pancreatic Necrosis ; 伝染性膵臓壊死症) ウィルスを接種した場合に^{4), 5)} 較べて全体に低い値 ($< 4 \sim 256 \leq$) しか得られなかった。しかし、静岡県富士養鱒場の例では、⁶⁾ 本試験と同一ロットの不活化ウィルスを接種して、高いものでは7290 $\leq$ という値が得られている。このように中和抗体価の値に差がついたのは、飼育環境 (水温条件)・親魚の産地・個体差等の違いが影響しているのではないかと

第1表 供試魚及び試験方法

	昭和52年度	昭和53年度
供 試 魚	岐阜水試産3年魚（初産） ♀ 31尾 ♂ 11尾 平均体魚 1,000 g	長野水指産2年魚（初産） ♀ 55尾 体重 700~1,500 g ♂は接種せず
不活化ウィルス	長野水指分離株 HV-7601 ($10^{7.2}$ TCID ₅₀ /ml) 0.1%ホルムアルデヒド不活化 水酸化アルミニウムゲル添加 （北里研究所製）	同 左
接 種 方 法	ウレタン麻酔 腹腔内接種 初回 77.7 1 ml/kg BW 2回 77.8 2 " 3回 77.9 4 "	オイゲノール麻酔 腹腔内接種 初回 78.9.6 1 ml/kg BW 2回 10.3 2 " 3回 10.24 5 "
飼 育 条 件	河 川 水 13.5×3.3×1.0m コンクリート池 2面	同 左
効 果 の 判 定	・ふ化稚魚をHV-7601株で攻撃， その生残率を比較することによっ て効果を判定 ・NaCl 5.32% 2分浴の前処理後， $10^{3.2}$ ， $10^{2.2}$ ， $10^{1.2}$ TCID ₅₀ /mlのウ ィルス液に1時間浸漬 ・餌付時（積算水温603℃，0.18 g） 餌付後 36日目（平均0.40 g） " 70日目（平均0.77 g） の3つの段階で攻撃 ・餌付時については自然水温（5.8~ 7.9℃ 平均6.9℃），後の2つにつ いては，10℃前後に加温して飼育 した。	同 左 ・NaCl 5.32% 2分浴の前処理後， $10^{3.5}$ ， $10^{2.5}$ TCID ₅₀ /mlのウィルス液 に3分間浸漬 ・餌付後（積算水温612℃，0.20 g） 餌付後 38日目（平均0.43 g） の2つの段階で攻撃 ・加温により飼育水を10℃前後に保 った。

第2表 昭和52年度 攻撃結果

(斃死率)

供試魚	攻撃時期 ウイルス濃度 中和抗体価	餌 付 時			餌付後36日目			餌付後70日目		
		$10^{3.2}$	$10^{2.2}$	$10^{1.2}$	$10^{3.2}$	$10^{2.2}$	$10^{1.2}$	$10^{3.2}$	$10^{2.2}$	$10^{1.2}$
77-V-1	≤ 8	% 97.8	% 72.5	% 2.0	% 77.1	% 46.0	% 66.0	% 43.3	% 36.7	% 3.4
77-V-2	16	82.0	4.2	31.3	70.5	72.2	51.0	44.4	3.3	6.9
77-V-3	≤ 8	92.0	98.0	18.4	78.0	55.3	63.2	46.7	41.9	0
77-V-4	64	36.2	16.3	18.9	34.0	72.5	31.4	33.0	0	6.9
77-V-5	≤ 8	27.9	25.0	21.8	73.5	51.0	64.7	23.3	24.1	6.7
77-C-1	≤ 8	18.0	44.0	36.4	95.9	86.3	94.0	96.6	71.4	65.5

考えられ、今後、追試を行う必要があると思われる。

槽谷⁷⁾によれば、IPNの場合1:1000以上に中和抗体価の上昇したニジマスに、 $10^6 \sim 10^7$ TCID₅₀/mlのIPNウィルスを、キュービエ氏管より注入しても完全に中和してしまい、ウィルスを再分離することができない。従って、実用上、1:数百程度に中和抗体価を上昇させれば、自然感染を防ぎうるのではないかと、としている。IHNにおいても、自然感染の際の被曝ウィルス量は極くわずかと考えられるところから、同様と思われるが、本試験では、中和抗体価が少くとも100以上に上昇した個体は、昭和52年度⁵⁾、53年度⁷⁾と非常に低い割合であった。従って、今後、親魚群を免疫していく際に、感受性の低い個体をどのように排除して、群としての免疫効果をあげていくかが問題となってくる。

一方、得られた稚魚に対する攻撃の結果をみ

ると、昭和52年度は、全体に親魚の血清中和抗体価が低いなかで、一番値の高かった77-V-4から得た稚魚が、他の親魚から得られた稚魚より、IHNの攻撃に対して、抵抗性がみられ、親魚の中和抗体価と稚魚の低抗性との間に関連が認められるような結果となった。また、その持続も、餌付後36日目までは存在するような結果となった。しかし、同様な試験を行っている東京・静岡・長野・群馬^{5) 7) 8) 9)}の各県の結果は、親魚の中和抗体価と稚魚の抗病性の間に関連は認め難いとしている。

また、攻撃試験の結果の中で、特に77-C-1の餌付時の攻撃結果が、攻撃ウィルス濃度と斃死率とが、 $10^{3.2}$ TCID₅₀/mlのとき18.0%、 $10^{2.2}$ TCID₅₀/ml、44.0%、 $10^{1.2}$ TCID₅₀/ml 36.4%と、攻撃ウィルス量が増えたのに斃死率が下ってしまっているが、この試験に先だって行った予備試験でも、菌浴法で攻撃した場合、ウィ

第3表 昭和53年度 攻撃結果

(斃死率)

供試魚	攻撃時期 中和抗体価 ウィルス濃度	餌 付 時		餌付後38日目	
		$10^{3.5}$	$10^{2.5}$	$10^{3.5}$	$10^{2.5}$
78-V-1	64	N D*	N D	34.0%	28.6%
78-V-2	181	55.1% 68.2%	38.0% 46.0%	66.0	63.9
78-V-3	<16	24.5 20.4	11.4 13.6	N D	
78-V-4	90	N D	N D	N D	
78-V-5	45	N D	N D	N D	
78-V-6	64	82.4 87.5	56.0 59.6	90.0	88.7
78-V-7	90	N D	N D	N D	
78-V-8	128	N D	N D	N D	
78-V-9	256 $\leq$	84.0 96.0	62.8 68.0	71.0	69.4
78-V-10	<16	88.0 80.4	N D	N D	
78-V-11	90	85.7 83.7	N D	N D	
78-V-12	256 $\leq$	80.0 81.0	N D	N D	
78-V-13	<16	N D	N D	N D	
78-V-14	45	91.7 85.9	N D	N D	
78-C-1	<16	66.7 78.7	36.7 58.9	53.9	55.6
78-C-2	22	62.0 60.0	N D	N D	
78-C-3	45	N D	N D	N D	

※ ND ; 攻撃試験実施せず

ルス量が少ないほど、斃死率にバラツキが出る結果が得られており、この点については更に試験を重ねる必要がある。

昭和53年度は、前年度に較べて、親魚の中和抗体価は上昇していたが、得られた稚魚の抗病性との間に関連は認められず、他県の結果と同様となった。これらのことから、稚魚の抗病性は、親魚の中和抗体価の値よりも、親魚そのもの

の差によるものと考えられ、今後は、抗病性の強弱が、遺伝によるものかどうかを更に検討していく必要があると思われる。

要 約

1. ニジマス親魚に不活化IHNウィルスを接種

し、中和抗体が、卵を通して稚魚に移行するかどうか検討した。

2. 親魚の中和抗体価は高いもので $256 \leq$ と、不活化IPNウィルスを接種した場合にくらべ全体的に低かった。

3. 稚魚の抗病性は、親魚の中和抗体価の高低よりも、親魚そのものの持つ抗病性の強弱によるのではないと思われる。

文 献

- 1) TAKESHI HARA et al, 1976; Vaccination Trials for Control of Furunculosis of Salmonids in Japan; Fish Pathology 10(2), 227-235
- 2) 青木宙ら, 1978; アユのヒブリオ病魚病研究 13(1), 19-24

3) 北里研究所編, 1974; 動物のワクチン, 1-20

4) ます類の病害研究班, 1977; 昭和51年度指定研究総合助成事業病害研究報告書, 20-24

5) 東京都水産試験場奥多摩分場, 1978; 昭和52年度指定研究総合助成事業病害研究報告書, 2-5

6) 静岡県富士養鱒場, 1978; 昭和52年度指定研究総合助成事業病害研究報告書, 12-16

7) 糟谷浩一; 私信

8) 長野県水産指導所, 1978; 昭和52年度指定研究総合助成事業病害研究報告書, 17-26

9) 群馬県水産試験場, 1977; ます類のウィルス病研究会資料