

ニジマスにおけるIPNV(伝染性臓臓壊死症ウイルス)に対する移行抗体の検討

中居 裕・荒井 真・森川 進

Studies on the maternal antibody to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout, *Salmo gairdneri*

Yutaka NAKAI · Makoto ARAI · Susumu MORIKAWA

養殖対象魚類のウイルス病対策としては魚卵のヨード剤消毒、隔離飼育、飼育用水の紫外線殺菌等が行われているが、家畜では親からの移行抗体によって新生直後のウイルスおよび細菌性疾病を防除することが実用化されている。¹⁾養殖サケ科魚類のIPN(伝染性臓臓壊死症)では怪卵感染が重要な感染経路となっており²⁾、その防止策の1つとして移行抗体による感染防除が考えられている。移行抗体の存在については哺乳類および鳥類について馬場が総述しており³⁾、魚類についても佐野・鈴木がニジマスにおいてIPNVに対する中和抗体が卵黄中に存在していることを、長林・伊沢がIHNV(伝染性造血器壊死症ウイルス)で同様のことを、高橋・河原がグッピー(卵胎生魚)で*Aeromonas hydrophila*の移行抗体を証明している。⁴⁾⁵⁾⁶⁾

そこでニジマス親魚にIPNV不活化ウイルス液を接種した場合、卵へ抗体が移行するかを調べ移行抗体による感染防除の可能性を検討した。

なお本研究の一部は、養殖サケ科魚類の防疫技術に関する研究および近海漁業資源の家魚化システムの開発に関する研究として実施した。

材料および方法

供試ウイルス

供試したIPNV(86-42-7株)は1987年に岐阜県水産試験場で飼育中のアマゴ0年魚の自然発病群より分離したものである。分離後-80°Cで凍結保存し供試に際しては1回継代したウイルス液を-80°Cで凍結したものを利用した。なお分離後魚体通過は行っていない。

供試魚 岐阜県水産試験場産ニジマス 3年魚の雌12尾（平均体重1,373 g, 標準偏差289）を用いた。

抗原液調製 SANO *et al.*⁷⁾ の方法にいくつかの変更を加えた調製法は以下のとおりである。⁸⁾

培養面積250cm²のガラス製培養びんを用いて100mlのEagle MEM(ニッスイ①)に1%の割合で牛胎児血清(GIBCO)を加えた培地でBF-2細胞30°Cで5~7日培養し約80%繁茂状態の同細胞単層にM.O.I.10⁻²TCID/cellでIPNVを接種し20°Cで培養した。細胞変性効果(CPE)が出現し細胞が剥がれつつある状態(接種後24~48時間)の培地と細胞を回収しウイルス原液とした。この原液から5,000rpm・20分の遠心沈殿(遠心はすべて4°Cで行った)で細胞残査を除いた上清にポリエチレングリコール#6,000を7.5%(W/V)、NaClを2.3%(W/V)を加え溶解後4°Cで2時間以上マグネチックスターラーで攪拌した。その液を5,000rpm・20分の遠心沈殿にかけ上清を捨て沈殿を上清の1/20容のPBS(-)に再浮遊させた。その液に1/19容の4%ホルマリン液を加え(全体として0.2%ホルマリン濃度となる)4°C下で5日間静置した。その後この溶液の1/20容の1.4%チオ硫酸ナトリウム溶液を加えホルマリンを中和し、不活化ウイルス液とした。この溶液に等量のフロインドの完全アジュバント(DIFCO)をよく混合し抗原液とした。

ウイルス不活化の確認 不活化ウイルス液0.5mlを25cm²プラスチックフラスコに培養したCHSE-214細胞に接種し15°Cで2週間観察した。

抗原液接種

第1回接種：抗原液を供試魚1尾当たり1mlずつ1987年1月29日に腹腔内に接種した。なお対照区には0.2%ホルマリン液(4%ホルマリン液をPBS(-)で希釈)をチオ硫酸ナトリウム溶液で中和したものを実験区と同様に1回接種した。

第2回接種：第1回接種の4週後に新たに調製した抗原液を前回と同様に接種した。対照区にも新たに調製した液を前回と同様に接種した。ただしこの時すでに採卵可能となっている供試魚については接種を中止した。

試験区及び飼育池 抗原液を接種した後、河川水飼育池に実験区(A区)として4尾、対照区(B区)として2尾、12°C恒温水飼育池に実験区(C区)として5尾(ただし3池を用い1池当たり1又は2尾収容した)、対照区(D区)として1尾収容した。

飼育池の大きさは河川水飼育池は縦400cm×横140cm×水深60cm、恒温水飼育池は縦140cm×横52cm×水深35cmである。河川水の温度は第1回接種日には4.5°C、第2回接種日には3.5°Cでありその4週後には5.9°C(いずれも該当日の平均水温)であり恒温水の温度は実験開始から終子まで11.8~12.2°Cの範囲内にあった。なお注水量は河川水飼育池では毎秒5.8lであった。恒温水飼育池では水温保持のため飼育池内の水を循環させた。すなわちポンプで毎秒0.7lの飼育池内の水を吸い上げ濾過材に通した後、飼育池内にその水を戻した。ただし補給水とし新鮮水(井戸水、水温4~7°C)を毎秒0.1l注水した。

試料採取

血液：抗原液接種前後の血清中和抗体価の測定に供するため血液を次のように採取した。まず第1回抗原液接種（以後1回接種）の直前に尾部より注射筒を用いて採血した。次の採血は第2回抗原液接種（以後2回接種）の4週後に前回と同様の方法で行った。ただし2回接種時に採卵可能となった供試魚はその時に採血した。

卵および体腔液：卵は卵黄中和抗体価測定に、体腔液はウイルス検査に供する目的で、2回接種の4週後にそれぞれを採取した。ただし2回接種時に採卵可能となった供試魚はその時に採卵した。採卵した卵・体腔液は分析に供するまで-20℃に保存した。

血清・卵黄の中和抗体価測定 採取した血液は4℃に一昼夜静置後、3,000rpm・20分の遠心沈殿により血清を分離し分析に供するまで-20℃に保存した。卵は卵黄をMEM-2 HEPESで10倍に希釈後、 $0.45\mu m$ のメンブレンフィルターで濾過滅菌したものを供試した。中和抗体価の測定はマイクロタイマー法で行った。試料はMEM-2 HEPESで20~2,560倍の2倍段階希釈し1希釈当たり4穴を使用した。細胞はCHSE-214で細胞浮遊液にはMEM-5 HEPESを使用した。中和抗体価(ND₅₀/0.05ml)の算出は各希釈血清の中和陽性率からKÄRBER法で行った。培養温度は15℃、観察期間は14日間とした。

体腔液のウイルス検査 体腔液はMEM-2 HEPESで10倍に希釈し、その中にペニシリンを1,000IU/ml、ストレプトマイシンを $1,000\mu g/ml$ となるように添加し、4℃下に一夜静置した。

その液をさらに10倍に希釈したものを受け種試料とした。ウイルス検査はCHSE-214細胞を用いたマイクロタイマー法で行い、培養温度は15℃、観察期間は14日間とした。

結 果

実験経過及び結果を表に示した。

恒温水飼育池に収容した供試魚のうちC区3尾、D区1尾が実験途中で斃死した。原因はC区の1尾が外へ飛び出したため、残りは水カビ病によるものであった。この理由として魚体に比して恒温水飼育池が小さかったために外へ飛びやすかったことと、そのために体表のすれが発生してそこに水カビが寄生したものと考えられた。以上の4尾から採取した血清は分析に供しなかった。生残した供試魚のうちA区3尾・B区1尾・C区1尾は2回接種時に採卵可能であったので接種を中止した。従って、2回接種を実施したのはA区・B区・C区各1尾ずつであった。そのうちC区1尾は試料採取日になつても成熟しなかつたため卵及び体腔液は採取できなかった。

河川水飼育池(A・B区)に収容した供試魚の血清中和抗体価は1回接種前では80が最高で4尾が14(検出限界)以下であった。2回接種を行ったA・B区各1尾についてはその4週後の血清中和抗体価は14以下であった。又2回接種を行わなかつた4尾(A区3尾・B区1尾)についてその時点での血清中和抗体価は最高が

表

供試魚の血清中和抗体価及び卵黄中和抗体価と飼育経過

| 区分 | No. | 体重(g) | 抗原液接種前 血清中和抗体価 | 第2回抗原液 接種の有無 | 試験終了時 血清中和抗体価 | 卵黄中和 抗体価 | 経過等 | 備考 |
|----|-----|-------|-------------------|-----------------|------------------|-------------|--------|------------|
| A | 1 | 1,590 | 80 | 無 | 47 | ≤14 | | |
| | 2 | 1,370 | ≤14 | 無 | ≤14 | ≤14 | | 河川水 実験区 |
| | 3 | 1,650 | ≤14 | 有 | ≤14 | ≤14 | | |
| | 4 | 1,490 | ≤14 | 無 | 28 | ≤14 | | |
| B | 1 | 910 | ≤14 | 無 | ≤14 | ≤14 | | |
| | 2 | 1,680 | 56 | 有 | ≤14 | ≤14 | | 同対照区 |
| C | 1 | 1,150 | — | — | — | — | 2/21斃死 | |
| | 2 | 960 | 80 | 無 | 47 | ≤14 | | |
| | 3 | 1,340 | 538 | 有 | 1522 | — | 未成熟魚♀ | 12°C |
| | 4 | 1,280 | — | — | — | — | 2/21斃死 | 実験区 |
| | 5 | 1,220 | — | — | — | — | 2/2斃死 | |
| D | 1 | 1,840 | — | — | — | — | 2/17斃死 | 同対照区 |

47で2尾が14以下であった。

恒温水飼育池(C区)に収容した供試魚の血清中和抗体価は1回接種前では80と538であった。

2回接種を行った1尾についてはその4週後の血清中和抗体価は1,522(前回538)へ上昇した。ただしその供試魚はその時点で成熟していなかった。2回接種を行わなかった1尾についてはその時の血清中和抗体価は47と低下した。なお対照区(D区)は実験途中で供試魚が斃死した。

全体として血清中和抗体価は1回接種前から低水準で、接種後横ばい又は低下したが2個体が上昇した。

卵黄中和抗体価は測定した7個体分すべてが14以下であった。

又、不活化ウイルス液および体腔液からウイ

ルスは分離されなかった。

考 察

ニジマス親魚にIPNV不活化ウイルス液を接種して冬期の低水温の河川水で飼育した状態と水温をほぼ12°Cに保った状態とで卵黄に抗体が移行するかどうか検討したが、親魚の血中中和抗体価は上昇せず卵黄中の中和抗体価の上昇も認められなかった。

血中中和抗体価が上昇しなかった原因としては成熟による影響が考えられる。その理由としては本実験においても成熟魚の血中中和抗体価が上昇しなかったのに対し、未成熟魚1尾の

血中中和抗体価は約3倍に上昇したこと、採卵期のIPNVに対するそれについてニジマスで岐阜水試が産卵時に、同じく佐野・糟谷が採卵後に低下することを報告していることがあげられる。

しかしIHNVの場合、長林がニジマスに採卵前にアジュバント添加IHNV不活化ウイルス液を2回接種後、採卵時に得た血清の中和抗体価が対照区の30以下に比べ270~7,290に上昇したと報告しており、また佐野・鈴木はアジュバント添加IPNV不活化ウイルス液4mlを採卵前に2回接種したニジマスにおいて採卵時の血清中和抗体価が採卵前より上昇していることを示し、その個体の腹腔内にアジュバントがかなり残存していたことからこの時期においても抗原刺激が続いているために抗体産生が行われたと考えられると報告しており、環境条件等免疫応答に強い影響を及ぼす条件が良好であった上に抗原刺激を続けると採卵期においても血中中和抗体価が上昇する可能性があるものと考えられる。

次に水温による影響が考えられる。長林・伊沢は魚類の抗体産生は至適水温以下の環境水温のもとでは一般に著しく阻害されるがもともと低水温下に生息するものにはそれほど強く阻害されないと述べている。ニジマスは低水温を好む魚類であるが河川水飼育における実験期間中の水温はかなり低かったので抗体産生が著しく阻害されたものと思われる。

そのほかに飼育条件の及ぼす影響が考えられる。恒温水飼育池の大きさ・注水量・水質はい

ずれも河川水飼育池の飼育条件に比べて著しく劣っており、そこに収容された供試魚にとっては劣悪な条件であったと考えられる。MANNING and TURNER¹²⁾はメクラウナギでは劣悪な条件で飼育されていると免疫応答を起こさないという報告から魚類でも同様であるとしており恒温水飼育池の供試魚は水温が約12°Cであったにもかかわらず飼育条件が劣悪であったために血中中和抗体価が上昇しなかったものとも考えられる。

卵黄中和抗体価が上昇しなかった点については親魚の血中中和抗体価を十分に上昇させることがまず必要であると考えられ、長林の例ではニジマス親魚の血清中和抗体価を270~7,290とした後得られた卵黄の中和抗体価は40~150を示したこと、両者のゲル濾過による蛋白分画では中和抗体価を有するピークが極めて類似していることから卵黄中の中和抗体が血中のそれから移行した可能性を示唆している点からも理解できる。¹³⁾また隆島は卵黄前駆物質は肝臓で合成され血流によって卵黄球期に卵巣へ送り込まれると述べているので少なくとも卵黄球期までに血中中和抗体価を十分に上昇させておかないと卵黄への抗体の移行はむずかしいのではないかと思われる。

今後の問題としては本実験と同様の方法でニジマスにIPNV不活化ウイルス液を接種し(水温11~12°C)血清中和抗体価を200,000倍まで上昇させた例⁸⁾もあるので供試魚の個体差およびIPN感染歴の相違、飼育条件の差等について検討する必要があろう。

要 約

1. IPNV不活化濃縮ウイルス液にフロインドの完全アジュバントを添加した抗原液を接種したニジマス親魚で卵黄への抗体の移行を調べた。
2. 親魚の血清中和抗体価は抗原液接種前後で比較したところ上昇は見られずその水準も低かった。ただし未成熟の1尾(12°C恒温水飼育池収容)は538から1,522へと上昇した。
3. 卵黄中和抗体価はいずれも14以下で移行抗体は検出できなかった。
4. 親魚の血中中和抗体価が上昇しなかった原因として成熟・水温・飼育条件の影響が考えられた。
5. 卵黄の中和抗体価が上昇しなかった原因としては親魚の血中中和抗体価が十分に上昇していなかったためと考えられた。

文 献

- 1) 熊谷哲夫・椿原彦吉・中瀬安清・伊沢久夫, 1981; 獣医領域における免疫学, 近代出版, 東京, 660-674.
- 2) 江草周三, 1983; 魚病学〔感染症・寄生虫病編〕, 恒星社厚生閣, 東京, 23-30.
- 3) 馬場威, 1984; 比較免疫学からみた魚類の免疫応答, 魚病研究, 18(4), 209-219.
- 4) 佐野徳夫・鈴木雄策, 1974; ワクチン接種による魚類ウイルス病の防除に関する基礎的研究, 昭和49年度静岡水試

- 魚病対策に関する研究報告, 38-43.
- 5) 長林俊彦・伊沢久夫, 1981; 獣医領域における免疫学, 近代出版, 東京, 397-413.
- 6) 高橋幸則・河原栄二郎, 1987; 卵胎生魚グッピーの母子免疫, 日水誌, 53(5), 721-725.
- 7) SANO, T., K.SUZUKI and S.FUKUZAKI, 1981; Immune response in adult trout against formalin killed concentrated IPNV, International Symposium on Fish Biologics.: Serodiagnostics and Vaccines, Leetown W.Va.U.S.A, 1981 Develop. biol. Standard, 49, 63-70 (S. KARGER BASEL 1981).
- 8) 西村定一, 私信.
- 9) 岐阜県水産試験場, 1986; 養殖サケ科魚類の防疫技術に関する研究, 昭和60年度魚病対策技術対策研究成果報告書, 20-30.
- 10) 佐野徳夫・糟谷浩一, 1977; IPNVに対するニジマスの免疫効果に関する基礎的研究, 昭和51年度静岡水試魚病対策に関する研究報告, 25-30.
- 11) 長林俊彦, 1986; 魚類の免疫学考, 北里大学水産学部だより, (7), 12-13.
- 12) MANNING, M.J. and R.J.TURNER, 1979; 比較免疫生物学, 初版(村松繁・大西耕二訳), 共立出版, 東京, 64-92.
- 13) 隆島史夫, 1982; 淡水養殖技術 恒星社厚生閣, 東京, 11-45.