

## 伝染性造血器壊死症（IHN）に関する研究—I

大型魚由来分離株のニジマスに対する病原性

中居 裕

Studies on Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN) — I

Virulence of IHN Virus Strains from Large Sized Salmonid  
Fishes to Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*

Yutaka NAKAI

養殖サケ科魚類の病害のうち伝染性造血器壊死症（以下IHN）の被害は最も大きいものの一つである。IHNは国内での発生当初（1974～77年）は仔稚魚にのみ発生する<sup>1・2)</sup>とされていた。

しかし、岐阜県では1977年に200gのアマゴでIHNの発生<sup>3)</sup>が見られたのを初めとして、現在では岐阜県全域のニジマス・アマゴで従来よりかなり大型の魚でIHNが見られるようになった。なおこの状況は全国に広がっている（第17回全国養鰻技術協議会資料：1992）。

IHNは発症後の対策がないため予防面に力が注がれている。その方策としてヨード剤による発眼卵消毒、飼育水の紫外線殺菌及び隔離飼育

施設内の化学的消毒があげられ、仔稚魚期の発症防止に効果をあげている。しかし実際上隔離飼育の難しい稚魚期以降の防疫対策の実施は困難であるため、大きな問題となりつつある。

本研究では本症対策の基礎資料を得ることを目的とし、ニジマス・アマゴ・ヤマメ大型魚から分離された株を用いた感染実験から、従来のIHNとの比較を行なった。なお本研究は（社）日本水産資源保護協会委託事業「平成3・4年度魚病対策技術開発研究（養殖サケ科魚類の伝染性造血器壊死症に関する研究）」の一部として実施した。

## 方 法

### 1. 供試ウイルス

以下の5株を使用した。

- (1) GHV7701株：1977年4月、当場で飼育中のアマゴ200gより分離<sup>3)</sup>されたもの。クローニング済み（TCID<sub>50</sub>法）。
- (2) 89-24-12株：1989年4月、本県の民間養魚場で飼育中のニジマス500gより分離されたもの（IHN発病魚）。クローニング済み（TCID<sub>50</sub>法）
- (3) H-40-1株：1990年4月、当場で飼育中のヤマメ297gより分離されたもの。クローニングは行なっていない。
- (4) H-44-1株：1990年11月、本県の民間養魚場で飼育中のニジマス60gより分離されたもの。クローニングは行なっていない。
- (5) HV7601株：1976年、長野県で発生したニジマス稚魚より分離されたもの。1987年長野県水産試験場より分与された。本株は国内のIHN研究に数多く用いられているため、本研究では比較のため供試した。

供試ウイルスはKAMEI *et al*<sup>4)</sup>の作製したモノクロナル抗体（抗IHN Virus[以下IHNV]3種[5HG-1・6HG-27・6HM-7]・抗Infectious Pancreatic Necrosis Virus[IPNV]2種[4PG-3N・4PG-4]・抗Hirame Rhabdoviruses[HRV]2種[4HRG-6・4HRG-10]）を用いたImmunoperoxidase法<sup>5)</sup>により同定を行い、IHNVであることを確認した。

### 2. 供試ウイルス調製法

EPC細胞を150cm<sup>2</sup>プラスチックフラスコで20

°C・24時間培養した。その後供試ウイルスをM·O·I=10<sup>2</sup>～10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>/cellとなるように接種した後、15°Cで培養した。5～7日後、CPEが全体の80%以上になったとき、-80°Cで凍結した。その後、急速解凍し遠心沈殿処理（4°C）により細胞残滓を取り除き-80°Cで保存した。ウイルス力値はEPC細胞を用いてTCID<sub>50</sub>法により測定した。

### 3. 供試魚

当場で累代飼育されているニジマスを供試した。平均体重および供試尾数は以下のとおりである。

実験1：0.3g（91年11月産）各区200尾

実験2：16.5g（91年3月産）各区 25尾

実験3：16.5g（91年3月産）各区 25尾

実験4：31.5g（91年3月産）各区 20尾

実験2と3の供試魚は同一魚群、実験4の供試魚は実験2で用いた魚群の成長を待って実施した。

### 4. 感染方法

実験1・2・4（浸漬法）：飼育水10ℓに第1表のとおりの力値となるようにウイルス原液を混合し、通気しながら1時間浸漬した。対照区は飼育水のみを使用した。

実験3（注射法）：(1)・(2)・(4)・(5)の各ウイルス原液をHank's BSSを用いて10<sup>6.0</sup> TCID<sub>50</sub>/mlに調製したウイルス液を0.05ml/尾ずつ腹腔内接種した。対照区には同量のHanks' BSSを接種した。供試魚は接種時に2-phenoxyethanol 50ppmで通気しながら麻酔<sup>6)</sup>した。

### 5. 飼育方法

第1表 実験1・2・4（浸漬法）の供試ウイルスおよび感染力価

区 株	GHV7701	89-24-12	H-40-1	H-44-1	HV7601	対 照
実験1(0.3g)	10 <sup>5.05</sup>	10 <sup>5.05</sup>	10 <sup>5.05</sup>	— —	10 <sup>5.05</sup>	飼育水
実験2(16.5g)	10 <sup>4.55</sup>	10 <sup>5.05</sup>	— —	10 <sup>5.05</sup>	10 <sup>4.80</sup>	飼育水
実験4(31.5g)	10 <sup>5.05</sup>	10 <sup>5.05</sup>	— —	— —	— —	飼育水

(単位: TCID<sub>50</sub>/ml)

接種後の飼育は以下のように行なった。

21日、16.5gでは30日とした。

水槽: 20ℓプラスチック水槽（実容18ℓ）を用いた。水質保持と曝気を兼ねて上部濾過器を設置した。

用水: 水道水を活性炭カートリッジを用いて脱塩素したものと飼育用水（注水量: 200ml/分）とした。

給餌: 少量を適宜給餌した。

水温: 12°C ± 1に設定した。水温を保持するため二重水槽とし、外側の水槽に循環式冷却装置と投げ込み式ヒーターを用いて調節した。

#### 6. 観察項目

斃死魚は毎日取り上げ、斃死数・症状等を記録し、-20°Cで保存した。その一部はウイルス分離を行なった。観察期間は0.3g・31.5gでは

#### 結 果

実験1・2・4（浸漬法）の結果を第2表に示し、実験2・3（浸漬法・注射法）の結果を第3表に示した。実験1の累積斃死状況を第1図に、89-24-12株における実験1・2・4の累積斃死状況を第2図に示した。

ニジマス0.3gではGHV7701株・89-24-12株・H-40-1株は約90%あるいはそれ以上の累積斃死率であったが、HV7601株では54.1%にとどまった。

ニジマス16.5gではGHV7701株・89-24-12株

第2表 実験1・2・4（浸漬法）の結果（IHNによる累積斃死率）

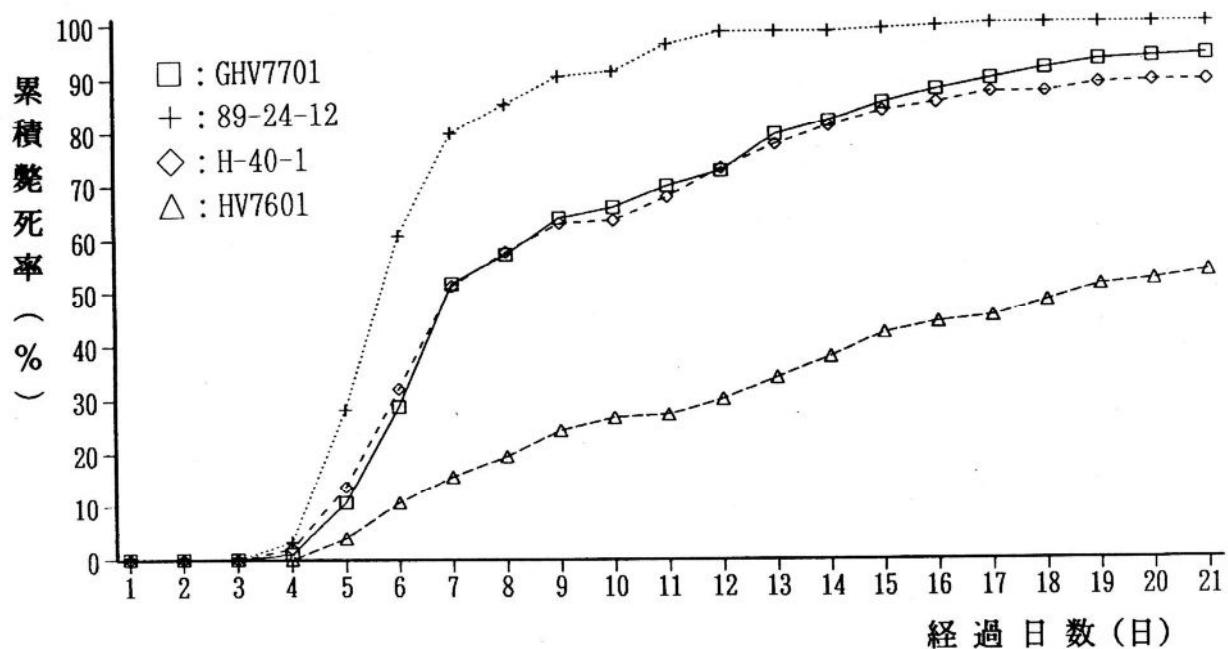
区 株	GHV7701	89-24-12	H-40-1	H-44-1	HV7601	対 照
実験1(0.3g)	94.1	100	89.3	— —	54.1	0
実験2(16.5g)	64.0	61.5	— —	8.0	0	0
実験4(31.5g)	31.6	35.0	— —	— —	— —	0

(単位: %)

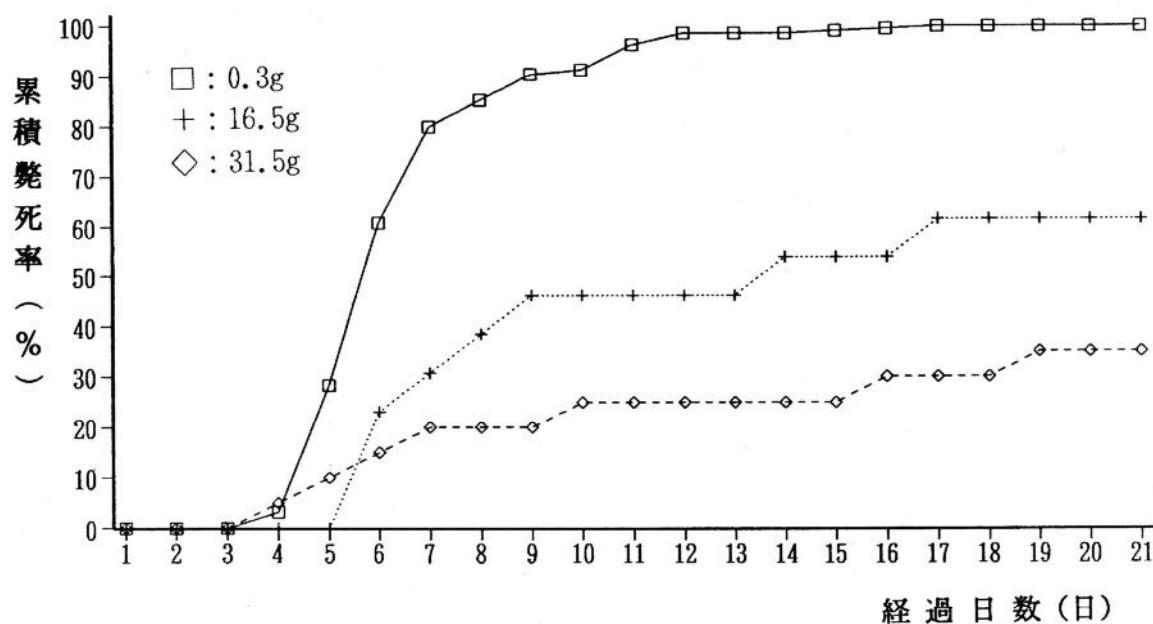
第1表 実験2（浸漬法）と3（注射法）の結果（IHNによる累積斃死率）

区 株	GHV7701	89-24-12	H-44-1	HV7601	対 照
実験2（浸漬法）	64.0	61.5	8.0	0	0
実験3（注射法）	44.4	76.9	61.5	0	0

(単位: %)



第1図 IHNV4株に対するニジマス0.3gの感受性



第2図 89-24-12株に対するニジマス(0.3g・16.5g・31.5g)の感受性

ともに浸漬法・注射法とともに高い斃死率を示した。しかし、H-44-1株では注射法は高い斃死率を示したが、浸漬法の斃死率が8%と低いものであった。HV7601株では浸漬法・注射法とともに斃死は認められなかった。

GHV7701・89-24-12の両株は、ニジマス31.5gでも30%台の斃死率を示したが、供試魚の体重

の増加とともに斃死率は低下した。

各区の斃死魚のうち数尾をウイルス分離した結果、いずれの区からもウイルスが分離され、CPEの形態からすべてIHNVと判断した。また、斃死魚の症状は鰓の退色、肝臓の退色、腎臓・脾臓の肥大等、IHNの定型的症状が観察されたため、斃死原因はIHNVによるものと判断した。

なお0.3g対照区もわずかな斃死が認められたが、ウイルスは分離されず、IHNによる斃死ではないと判断した。

## 考 察

大型魚から分離した3株 (GHV7701・89-24-12・H-44-1) の感染実験結果から、これら分離株のニジマス大型魚に対する病原性が確認された。このことは河西ら<sup>7)</sup>、鈴木・坂井<sup>8・9)</sup>、鈴木ら<sup>10)</sup>が指摘しているとおりである。これに対して、HV7601株では浸漬法・注射法ともにニジマス16.5gを斃死させることはできなかった。したがってHV7601株の大型魚に対する病原性はほとんどないものと考えられた。このことは稚魚由来株は大型魚に対する病原性が高くないとする鈴木・坂井<sup>8)</sup>の報告と一致する。HV7601株はニジマス稚魚に対して強い病原性を有する<sup>11)～13)</sup>。花田ら<sup>1)</sup>、荒井・田代<sup>2)</sup>はIHN発生当初の状況を記載しており、約2gまでの稚魚に発生が見られるとしている。したがってHV7601株は分離時のIHNの発生状況をよく反映しており、これら3株とは大型魚に対する病原性において大きく異なっていると考えられた。

GHV7701・89-24-12株ではニジマスの魚体重が大きくなるにしたがって斃死率の低下が見られた。体重の増加に伴う感受性の低下は、河西ら<sup>7)</sup>、鈴木・坂井<sup>8・9)</sup>の報告と一致する。また、大型魚の自然発病例ともよく符合する<sup>14)</sup>。IHNは成長に伴い宿主側の抵抗性の増加<sup>15・16)</sup>が指摘

されている。今回の結果は大型魚由来分離株においても当てはまる事を示している。

GHV7701・89-24-12・H-44-1の3株はニジマス16.5gに強い病原性を示した。その3株を見ると、注射法・浸漬法とともに高い斃死率を示したもの(GHV7701株・89-24-12株)と、注射法での斃死率は高いが、浸漬法での斃死率は他の2株に比べ著しく低いもの(H-44-1)とに分かれた。浸漬法が注射法よりもより自然感染に近いことを考えると、後者の病原性は前者に比べて劣るものと考えられた。このことは株間の病原性を比較する場合、注射法よりも浸漬法を用いた方が適していると考えられる。ところでGHV7701株は注射法の方が浸漬法よりも斃死率が低かった。通常はこの逆である。静岡県水産試験場富士養鱒場<sup>12・13)</sup>は注射法の場合、斃死率にはばらつきが多いことを指摘している。今回の結果もばらつきの範囲内かもしれない。このことからも、浸漬法で感染可能な時はこの方法を用いるべきと考える。

鈴木・坂井<sup>17)</sup>はニジマスとサクラマス由来のIHNV分離株の病原性を検討し、由来魚種に強い病原性を示し、他魚種の病原性はそれより低いことを報告している。本研究ではニジマス・アマゴ・ヤマメ大型魚から分離された株を用いたが、ニジマス由来株が特に強い病原性を示したわけではなかった。今後アマゴを用いて感染実験を行い、魚種特異性の異なる株の検索を行なう予定である。

荒井・田代<sup>18)</sup>は当場累代飼育のニジマス0.40gを用いて、HV7601株の感染実験を行なって

いる。 $10^{3\cdot 2}$ TCID<sub>50</sub>/ml (RTG-2による力価測定) 浸漬法 (5.32%NaCl 2分前処理) による結果は一例 (34.0%) を除いて70.5~95.9%の斃死率であった。この実験の供試魚は一腹仔6群を用いている。34.0%の例は腹仔によるIHNVの感受性の差<sup>7・11・13)</sup>によるものと考えられることから、実験当時 (1978年) の当場累代飼育のニジマスはHV7601株に対して高い感受性を有していたことがわかる。供試細胞のIHNV感受性の相違<sup>19)</sup>を考慮しても感染力価 ( $10^{5\cdot 05}$ TCID<sub>50</sub>/ml : EPCによる力価測定) は本研究のほうが高いものと考えられる。今回のニジマス0.3gの結果 (54.1%) から、HV7601株に対する感受性は1978年当時に比べて低下 (今回の実験実施は1991年) しているものと考えられた。ところで、GHV7701株のニジマス0.3gの斃死率は94.1%と非常に高い。本株は1977年、当場で飼育中のアマゴ200gより分離されたことを考えると、当場累代飼育のニジマスはその時期からGHV7701株の感染に曝され続けていたにもかかわらず、高い感受性を維持し続けていることになる。また1990年に当場で飼育中のアマゴ297gより分離されたH-40-1株にもGHV7701株と同等の感受性をしたことから、長期間にわたり大型魚由来株の感染耐過を経た場合は、稚魚由来株に対して抵抗性を獲得することを示唆しているものと考えられる。

## 要 約

1. 大型魚由来のIHNVは16.5~31.5gのニジマスに病原性を示したが、稚魚由来のHV7601株では斃死は認められなかった。
2. 大型魚由来のIHNVに対するニジマスの感受性は、体重の増加とともに低下した。
3. 大型魚由来のIHNVは、16.5g以上のニジマスに浸漬法・注射法ともに高い斃死率を示す株と、注射法だけに高い斃死率を示す株とに分かれた。

今回の研究に際し、IHNV同定用のモノクローン抗体を分与して下さったサッポロビール株式会社亀井勇統氏 (現佐賀大学海浜台地生物生産研究センター助教授) に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 花田博・平野正義・佐野宜八郎・植松久夫・稻葉繁雄・渡辺佳一郎, 1978; 静岡県に発生したニジマスの伝染性造血器壊死症 (IHN) について. 静岡富鱈研究, 2, 59-84.
- 2) 荒井真・田代文男, 1975; マス類のウイルス病に関する研究-III IHNの岐阜県内の発病状況について. 岐水試研報, 21, 139-144.
- 3) 森川進・荒井真・田代文男, 1979; マス類のウイルス病に関する研究-IV アマゴ(*O. rhodurus*) 1年魚におけるIHNの発病例. 岐水試研報,

- 24, 63-68.
- 4) KAMEI, Y, J. L. POTEY, M, YOSHIMIZU, T. KIMURA, S. SHIRAHATA, and H. MURAKAMI, 1990 ; Antigenic Analysis of Fish viruses with Monoclonal Antibodies. Trends in Animal Cell Culture Technology, Kodansha Tokyo, 201-204.
- 5) KAMEI, Y, M. YOSHIMIZU, T. KIMURA, and H. MURAKAMI, 1991; Comparative Antigenic Analysis of Two Fish Rhabdoviruses, Hirame Rhabdoviruses(HRV)and Infectious Hematopoietic Necrosis virus (IHNV) with Monoclonal Antibodies. 1991 ; Proceedings Second International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates, Oregon State University, 73-81.
- 6) 隆島史夫・河西晴之・浅川治・山田善章, 1982 ; 魚類麻酔剤としての 2 -phenoxyethanol. 水産増殖, 30 (1), 48-51.
- 7) 河西一彦・米沢純爾・小野淳・長谷川敦子・本間智晴・福田穎穂, 1993 ; ニジマスの成長に伴う伝染性造血器壊死症(IHN)に対する感受性の変化. 魚病研究, 28 (1), 35-40.
- 8) 鈴木邦夫・坂井勝信, 1989 ; IHN ウィルスのニジマスに対する病原性の差異・北海道水産孵化場研報, 44, 57-
- 62.
- 9) —————, 1991 ; IHN ウィルスのサクラマス稚魚および幼魚に対する病毒性の差異. 北海道水産孵化場研報, 45, 23-27.
- 10) 鈴木裕之・伊藤靖志・岡本信明・佐野徳夫 1984 ; 30~40 g の異常斃死魚より分離されたInfectious Hematopoietic Necrosis ウィルスについて - II . 昭和57年度山形県内水面水産試験場事業報告, 183-189.
- 11) 静岡県水産試験場富士養鱒場, 1986 ; 昭和55年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 8 pp.
- 12) —————, 1987 ; 昭和56年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 9 pp.
- 13) —————, 1988 ; 昭和57年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 13pp.
- 14) 中居裕・小野淳・河西一彦・田原偉成・山本聰・水野正之, 1993 ; 養殖サケ科魚類大型魚のIHN発生例. 平成5年度日本魚病学会春季大会講演要旨.
- 15) AMEND, D. F., W. T. YASUTAKE, J.L.FRYER, K.S.PILCHER and W.H.WINGFIELD, 1973 ; Infectious hematopoietic necrosis(IHN). In "Symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their con

- trol" (ed. by W.A.Dill) . FAO EIFAC Tech. Pap.17 (Suppl. 2), pp. 80-87.
- 16) AMEND,D.F.,1974 ; Infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus disease. U.S.,Fish Disease Leaflet 39.
- 17) 鈴木邦夫・坂井勝信, 1992 ; サクラマスおよびニジマスに対するIHNウイルスのワクチン効果. 北海道水産孵化場研究報, 46, 1-8.
- 18) 荒井真・田代文男, 1975 ; マス類のウイルス病に関する研究-VII ニジマスにおけるIHN不活化ウイルス接種による経卵移行免疫. 岐水試研報, 26, 47-52.
- 19) 荒井真・田代文男・岡本信明・西村定一・佐野徳夫, 1982 ; 各種魚類由来株化細胞のサケ科魚類ウイルスに対する感受性の違いについて. 昭和57年度日本魚病学会講演要旨.